

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

Doktorský studijní program
Hygiena, preventivní lékařství

**Kinetika vybraných látek při dermální expozici
(Polycyklické aromatické uhlovodíky)**

**Kinetics of selected substances during dermal exposure
(Polycyclic aromatic hydrocarbons)**

MUDr. Lenka Kotingová

Školitel: prof. Ing. Zdeněk Fiala, CSc.

Hradec Králové, 2015

Obhajoba dne:

Prohlášení autora:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

.....
MUDr. Lenka Kotingová

Hradec Králové, 7. dubna 2015

Poděkování:

Děkuji svému školiteli a přednostovi Ústavu hygieny a preventivní medicíny prof. Ing. Zdeňku Fialovi, CSc. za cenné rady, podporu a finanční zajištění vědecké práce po dobu postgraduálního studia.

Děkuji Ing. Ludkovi Šišperovi a PharmDr. Viktoru Voříškovi za analýzy receptorové tekutiny získané při testování absorpce PAU in vitro.

Velký dík patří Mgr. Aleši Bezroukovi, Ph.D. a RNDr. Evě Čermákové za pomoc s hodnocením a statistickým zpracováním získaných výsledků.

Poslední poděkování je určeno doc. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. za trpělivost, rady a konzultace všech problémů, které se vyskytly v průběhu testování a hodnocení transdermální absorpce.

K financování práce byly použity prostředky následujících projektů: Výzkumný záměr MZO 00179906, Specifický výzkum SVV-2011-262901, SVV-2012-264901 a SVV-2013-266901 a projekt Univerzity Karlovy v Praze, Lékařské fakulty v Hradci Králové PRVOUK P37/09.

Obsah

Prohlášení autora	1
Poděkování	2
Obsah	3
Použité zkratky	5
CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	7
TEORETICKÁ ČÁST	8
1. Stavba kůže	8
1.1 Epidermis	10
1.2 Dermis	24
1.3 Hypodermis	27
2. Transdermální absorpce	28
2.1 Mechanismus transdermální absorpce	30
2.2 Testování transdermální absorpce in vitro	34
2.2.1 Testovaná látka	34
2.2.2 Rozpouštědlo	35
2.2.3 Absorpční membrána	36
2.2.4 Testování integrity kůže	42
2.2.5 Difúzní komůrky	45
2.2.6 Receptorová tekutina	47
2.2.7 Postup provádění testu transdermální absorpce	47
2.2.8 Laboratorní zpracování výsledků	48
2.2.9 Matematické hodnocení absorpce	49
2.2.10 Statistické hodnocení výsledků	52
2.3 Matematické modelování dermální absorpce	53
2.4 Standardizace	54
3. Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU)	56
3.1 Zdroje PAU	56
3.2 Cesty vstupu do organismu	57
3.3 Metabolismus PAU	61
3.3.1 Metabolismus PAU v kůži	63
3.4 Účinky PAU	63
3.4.1 Účinky PAU na kůži	66
3.4.2 Systémové účinky PAU	68
4. Základní charakteristika vybraných zástupců PAU	75
PRAKTICKÁ ČÁST	79
5. Materiál a metodika	79
5.1 Chemikálie a spotřební materiál	79
5.2 Přístroje	79
5.3 Testovací zařízení	81
5.4 Kůže	82
5.5 Receptorová tekutina a rozpustnost PAU	83
5.6 Metodika testování transdermální absorpce in vitro	86
5.7 Laboratorní analýzy	90
5.8 Vyhodnocování dat a statistická analýza	91

6. Metodika jednotlivých experimentů, výsledky	95
6.1 Transdermální absorpce kofeinu (validace metodiky)	95
6.2 Transdermální absorpce PAU	96
6.2.1 Fáze I. Transdermální absorpce pyrenu: vliv typu rozpouštědla a koncentrace na parametry absorpce	96
6.2.2 Fáze II. Transdermální absorpce naftalenu: vliv rozpouštědla na parametry absorpce	97
6.2.3 Fáze III. Transdermální absorpce vybraných PAU: vliv způsobu podání testované látky (samostatně nebo ve směsi) na parametry absorpce	99
6.2.3.1 Transdermální absorpce naftalenu, fenantrenu, pyrenu a benzo[a]pyrenu	99
6.2.3.2 Transdermální absorpce fluorenu, fluorantenu, antracenu a benz[a]antracenu	105
7. Diskuse	113
7.1 Zavádění metodiky	113
7.2 Experimentální část	124
8. Závěr	138
9. Použitá literatura	140
10. Přílohy	155
Příloha 1 – Matematický model k hodnocení absorpce látky Iteration tool	156
Příloha 2 – Vliv rozpouštědla na dermální absorpci pyrenu in vitro	157
Příloha 3 – Vliv koncentrace na transdermální absorpci pyrenu in vitro	163
Příloha 4 – Porovnání fluxu a lag time při individuální a směsné aplikaci jednotlivých testovaných zástupců PAU	168

Použité zkratky

ACP	acenaften
AhR	arylhydrokarbonový receptor
angl.	anglicky
ANT	antracen
AQP	aquaporin
BaA	benz[a]antracen
BaP	benzo[a]pyren
CE	buněčná obálka (angl. cell envelope)
CLSM	konfokální laserová skenovací mikroskopie (angl. confocal laser scanning microscopy)
COLIPA	The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association
CYP	cytochrom
Da	Dalton (jednotka molekulární hmotnosti)
Dsc	desmocolin
Dsg	desmoglein
EU	Evropská unie
FLR	fluoren
FLT	fluoranten
FN	Fakultní nemocnice
HBsAg	antigen virové žloutenky typu B
HRT	náhradní hormonální terapie (angl. hormone replacement therapy)
IL	interleukin
IS	vnitřní standard (při HPLC analýze)
ITG	integrin
J	flux
KLK	kalikrein
K _{O/W}	rozdělovací koeficient oktanol/voda
lat.	latinsky
LPP	proužky s delší periodicitou (angl. long periodicity phase)
MK	masná kyselina
mRNA	informační RNA (angl. messenger RNA)
MFA	mobilní fáze A
MFB	mobilní fáze B
NAP	naftalen
NMF	přírodní zvlhčující faktor (angl. natural moisturising factor)
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (angl. Organisation for Economic Co-operation and Development)
OEL	occupational exposure limit (limit pro pracovní expozici)
OHP	hydroxypyren
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky

PHE	fenantren
PYR	pyren
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní kyslíkové radikály (angl. reactive oxygen species)
RT-PCR	reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce (angl. reverse transcription polymerase chain reaction)
S	sfingosin
SB	vrstva základní (lat. stratum basale)
SC	vrstva rohová (lat. stratum corneum)
SG	vrstva zrnitá (lat. stratum granulosum)
SL	vrstva světlá (lat. stratum lucidum)
SPP	proužky s kratší periodicitou (angl. short periodicity phase)
SS	vrstva ostnitá (lat. stratum spinosum)
TER	elektrická rezistence kůže (angl. transcutaneous electrical resistance)
TEWL	ztráty vody kůží (angl. transepidermal water loss)
TNF	tumor nekrotizující faktor (angl. tumor necrosis factor)
UK	Univerzita Karlova
VE	„živá“ epidermis (angl. viable epidermis)
US EPA	The United States Environmental Protection Agency
WHO	Světová zdravotnická organizace (angl. World Health Organisation)

Cíle disertační práce

Ústav hygieny a preventivního lékařství, kde je autorka práce zaměstnána, se dlouhodobě zabývá zdravotními dopady vlivu expozice PAU, a to jak v životním a pracovním prostředí (Vyskočil 1997, 2000, Fiala 2001), tak při terapeutickém použití (Goeckermanova metoda léčby psoriázy). Výsledky získané v minulých letech při klinických studiích ve spolupráci s Klinikou nemocí kožních a pohlavních Fakultní nemocnice v Hradci Králové (Borská 2006, 2009, 2010a,b, Fiala 2006) vyvolávaly potřebu zjistit více o mechanismech transdermální absorpce PAU. Studium literárních zdrojů se však ukázalo být nedostatečným, neboť problematika dermální expozice PAU nebyla příliš soustavně sledována a lze dohledat pouze částečné informace, většinou týkající se profesionální expozice osob (např. Jongeneelen 1990, 2001, Angerer 1997, Hansen 2008, Serdar 2012). Bližší informace o dermální kinetice PAU z in vitro pokusů byly spíše vzácností (Ng 1992, Moody 1995, vanRooij 1995, Sartorelli 1998, 1999, 2001, Kanikkannan 2001, Payan 2008) a zabývaly se většinou pouze některými zástupci skupiny PAU.

Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto zabývat se danou problematikou podrobněji formou doktorského postgraduálního studia a pro vypracování disertační práce byly stanoveny následující cíle:

1. Zavedení nové metodiky testování transdermální absorpce látek in vitro s použitím statické vertikální difúzní komůrky
2. Použití této metodiky k získání základních poznatků o vlivu koncentrace, rozpouštědla a formy aplikace (individuální/směsná) na průběh dermální absorpce vybraných zástupců PAU

TEORETICKÁ ČÁST

1. Stavba kůže

Pro porozumění mechanismům účastnících se procesu transdermální absorpce má zásadní význam pochopení stavby kůže a zde přítomné kožní bariéry.

Vývoj primitivní bariéry mezi vnitřním a zevním prostředím multiceulárních organismů začal před 500–600 miliony let. Jedním z nejstarších organismů s povrchovou „kůží“ je Cnidaria – organismus podobný medúze skládající se ze dvou vrstev cylindrických buněk, z nichž vytvořil povrchový ektoderm (epidermis) a vnitřní endoderm (gastrodermis). Tato jednovrstevná epidermis je považována za nejstarší formu kůže (Campbell 1999).

Kůže je největším orgánem lidského těla. Její hmotnost dosahuje zhruba 16 % celkové tělesné hmotnosti. Jen epidermis a dermis u dospělého člověka váží zhruba 4 kg, hmotnost hypodermis se mění v závislosti na množství podkožní tukové tkáně člověka. Zevní povrch kůže se pohybuje mezi 1,2 – 2,3 m² (Záruba 1994).

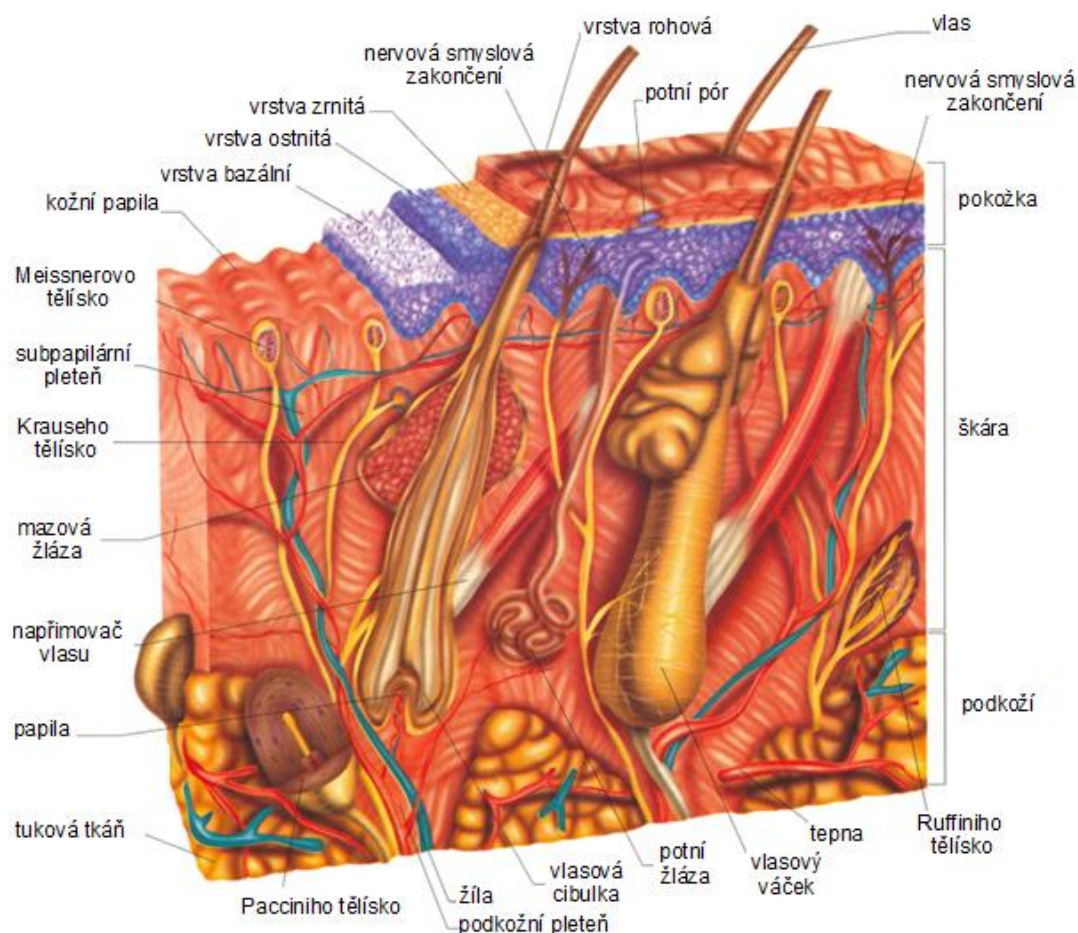
Kůže (cutis, integumentum commune) má pro organismus životní důležitost, bez kůže není život možný. Má mnoho funkcí – chrání proti vlivům okolního prostředí (ochrana mechanická, chemická, mikrobiální, proti záření), pomáhá termoregulaci těla, brání ztrátě vody z organismu (normální množství vody denně ztracené kůží je 0,5 l, při poškození kožní bariéry, např. u generalizované psoriázy, to může být až 6 l/den); (Marks 2004), podílí se na metabolismu (tvorba vitamínu D, syntéza a exkrece určitých látek), je součástí imunitní obrany organismu (buněčné i humorální). Je též významným receptorovým a senzorickým orgánem. Díky své elasticitě pokrývá v téměř nezměněné podobě tělo i při mimořádných situacích, jako jsou otoky a těhotenství. Na její vlastnosti má též vliv pohlaví, zejména rozdílné pohlavní hormony, které modulují tloušťku kůže (androgeny ji zvyšují), ovlivňují imunitní funkce (estrogeny stimulují, testosteron inhibuje), ovlivňují stárnutí kůže (estrogeny ho zpomalují) a hojení ran (Zouboulis 2007). Rozdíly dané pohlavím jsou u alopecie, akné, kožních nádorů (melanomy častěji u mužů), u žen jsou častější autoimunitní kožní nemoci (systémový lupus erythematosus, sklerodermie, revmatoidní artritida), psoriáza a atopická dermatitida (Dao 2007).

Kůže (Obr. 1) se skládá z pokožky (epidermis), škály (dermis, corium) a podkoží (hypodermis, tela subcutanea, subcutis). Epidermis a její deriváty (mazové a potní žlázy,

vlasové folikuly a nehty) jsou ektodermového původu, dermis a hypodermis pochází z mezodermy.

Spojení epidermis a dermis je nepravidelné. Epidermis vytváří směrem dolů výběžky zvané epidermální čepy, dermis vybíhá směrem nahoru výběžky zvanými papily. V prostoru mohou tyto do sebe zapadat dvojným způsobem – buď jako čepy do děr (u tenkého typu kůže), nebo jako hřebeny a brázdy (u tlustého typu kůže). Tenký typ kůže se nachází na většině lidského těla a je ochlupený, tlustý typ kůže je typický pro dlaně rukou a plosky nohou a je lysý. Rozlišení je na základě tloušťky epidermální vrstvy, která u tenké kůže měří 75–150 μm , u tlusté kůže 400–800 μm . Celková tloušťka epidermis a dermis se mění podle lokalizace, např. na zádech je přibližně 4 mm, na vlasaté části hlavy 1,5 mm (Wickett 2006).

Obr. 1. Stavba kůže



Zdroj: <http://blog.online-avon.cz/119-serial-o-peci-o-plet/517-dil-1--co-je-to-vlastne-kuze.html>

1.1 Epidermis

Epidermis se skládá z pěti (podle některých autorů jen čtyř) vrstev, směrem od povrchu do hloubky jsou to vrstva rohová (stratum corneum, SC), vrstva světlá (stratum lucidum, SL, některými autory je považována za dolní část SC), vrstva zrnitá (stratum granulosum, SG), vrstva ostnitá (stratum spinosum, SS), vrstva základní (stratum basale, SB); (Záruba 1994). Povrchové stratum corneum má tloušťku přibližně 10–20 μm , pod ním ležící zbývající vrstvy epidermis pak 50–100 μm (Bouwstra 2003a).

Stratum basale spolu se stratum spinosum jsou označovány jako germinativní nebo Malpighiho vrstva (stratum germinativum Malpighi). Tyto dvě vrstvy jsou odpovědné za neustálou výměnu epidermálních buněk. Dochází zde k množení buněk, 12 % mitóz probíhá ve stratum basale, 88 % ve stratum spinosum (zde mitózy probíhají převážně v noci). Buňky ze základní vrstvy odrůstají směrem k povrchu kůže a mění svůj charakter. K jejich odloučení z povrchu kůže dochází většinou za 14–28 dní, na obličejí a přední části krku již za 7 dní (Záruba 1994), na dlaních rukou za 32–36 dní (WHO 2006).

V epidermis se nachází čtyři základní typy buněk – keratinocyty, melanocyty, Langerhansovy a Merkelovy buňky.

Nejpočetněji (95 % buněčné populace pokožky) jsou zastoupeny **keratinocyty**, jež jsou hlavními buňkami epidermis, tj. epitelu vrstevnatého plochého rohovatějícího, skládajícího se z pěti anatomicky odlišných vrstev:

- *vrstva základní (stratum basale, SB)* je tvořena jednou vrstvou cylindrických nebo kubických buněk sedících na bazální membráně oddělující epidermis od dermis. Část těchto buněk tvoří tzv. kmenové buňky – nediferencované buňky sloužící k obnově a množení keratinocytů. K bazální membráně jsou keratinocyty připevněny pomocí hemidesmozomů, v horních a bočních partiích jsou sousední buňky spojeny pomocí desmozomů, tight junction a gap junction.

Tight junction představují pevné spojení sousedních buněk, kontrolují paracelulární cestu průniku exogenních látek (bariérová funkce) a separují horní a basolaterální části buněk. V lidské epidermis bylo identifikováno větší množství tight junction proteinů např. occludin, caludiny 1, 4, a 7, junctional adhesion molecule-1 (JAM-1), multi-PDZ protein-1 (MUPP-1). Defekty těchto proteinů vedou k poruše bariérových funkcí kůže (Proksch 2008).

Spojení typu gap junction je tvořeno transmembránovým proteinem connexinem a formuje drobné kanálky, které dovolují pasáž iontů a malých molekul mezi sousedními buňkami (Mese 2007). Tento typ spojení je tudíž velmi důležitý v mezibuněčné komunikaci (Proksch 2008). Poškození této komunikace je jedním z charakteristických znaků karcinogeneze epitelálních buněk (Upham 2008).

- *vrstva ostnitá (stratum spinosum, SS)* se skládá z několika vrstev (čtyř až osmi) kubických nebo polygonálních buněk, které se směrem nahoru oplošťují. Mezi buňkami jsou poměrně široké mezibuněčné prostory, navzájem jsou buňky spojeny četnými desmozomy, což jim dává ostnitý vzhled. Desmozom (adhering spot, macula adherens) je typ buněčného spoje, pro nějž je charakteristická přítomnost kadherinů a intermediárních filament. Tato filamenta, která mohou být různé chemické struktury (např. keratinová či desminová), se napojují zvnějšku, zatímco na povrchu obou membrán se nachází různé proteiny sloužící jako kotva (plakoglobin, desmoplakin) a v prostoru mezi membránami obou spojených buněk jsou přítomny různé kadheriny (např. desmoglein, desmocolin), které drží obě membrány pohromadě.

- *vrstva zrnitá (stratum granulosum, SG)* je tvořena třemi až pěti vrstvami oploštělých polygonálních buněk, v jejichž cytoplazmě se nachází velké množství keratohyalinových granulí. Tato granula nemají obalovou membránu, jsou bazofilní, obsahují fosforylovaný protein bohatý na histidin a proteiny bohaté na cystein. Keratinocyty zde obsahují též malá lamelární granula (Odlandova tělíska), která mají obalovou membránu a splývají s cytoplazmou a svůj obsah (lamelární disky tvořené lipidovou dvojvrstvou) vylučují do mezibuněčného prostoru, kde je ukládán ve formě tenkých listů obsahujících lipidy a tvoří potom mezibuněčný tmel, bránící průniku látek přes epidermální bariéru (zejména významné ve stratum corneum).

- *vrstva buněk světlých (stratum lucidum, SL)* je patrná v kůži tlustého typu (na dlaních rukou a ploskách nohou), je tvořena 1–2 vrstvami plochých eozinofilních buněk, které již postrádají jádro a buněčné organely, stále jsou však spojeny desmozomy. V cytoplazmě obsahují velké množství eleidinu. Někteří autoři tuto vrstvu nepovažují za samostatnou a uvádí ji jako součást dolní, neodlučující se části stratum corneum.

- *vrstva rohová (stratum corneum, SC)* je nejdůležitější součástí bariéry bránící průniku látek ze zevního prostředí do vnitřního prostředí organismu, proto zde bude probrána podrobněji.

Stratum corneum se dělí na dvě části – SC conjunctum, (compactum; spodní, neodlupující se část) a SC disjunctum (horní část, tvořená nepřetržitě se odlupujícími

buňkami). V průměru trvá keratinocytu posun od stratum basale do stratum granulosum 14 dní, korneocyt se z povrchu epidermis odloučí za dalších 14 dní.

Stavba SC připomíná zed'. Jsou zde buňky – korneocyty (cihly – bricks) navzájem spojené mezibuněčnou hmotou (malta – mortar). Tohoto popisu poprvé použil Michaels (Michaels 1975) a tato teorie stavby SC jako „bricks and mortar“ byla dalšími autory modernizována a doplňována (Nemes 1999, Nishifuji 2013).

Chemicky je SC (resp. jeho sušina) tvořeno ze 75–80 % proteinů, 5–15 % lipidů, zbývajících 5–10 % zatím zbývá objasnit. Voda tvoří v nativním SC 13 % (Förster 2009).

Anatomicky je SC tvořeno v průměru 15–20 vrstvami plochých bezjaderných zrohovatělých buněk (tzv. korneocytů), nejméně vrstev je na skrotu (6 ± 2 vrstev), nejvíce na patě (86 ± 36 vrstev); (Ya-Xian 1999). Korneocyty mají průměrnou tloušťku kolem 1 μm a povrch v průměru 1 000 μm^2 , mezery mezi nimi jsou přibližně 0,1 μm široké. Velikost jejich povrchu závisí na věku, anatomické lokalizaci a faktorech ovlivňujících epidermální proliferaci, jako např. UV záření. Velikost korneocytů se zvyšuje s věkem, což odráží prodloužený čas setrvání ve stratum corneum.

Každý jednotlivý korneocyt může být jednoduše vnímán jako nerozpustný proteinový komplex převážně obsahující vysoce organizovaný makrofibrilární skleroprotein keratin, který může vázat značné množství vody. Keratin je hlavní strukturální protein syntetizovaný v keratinocytech. Je složen z nejméně šesti různých polypeptidů o molekulové hmotnosti od 40 000 do 70 000 Da. Tři polypeptidové řetězce se obtáčejí kolem sebe a vytvářejí podjednotky tonofilament (přibližně 47 nm dlouhé). Alespoň jeden z polypeptidů podjednotky se liší od ostatních, což umožňuje velkou rozmanitost v jejich složení. Devět trojřetězových podjednotek se v průběhu keratinizace korneocytu dále splétá a vytváří filamentum o průměru asi 10 nm. Trojřetězové podjednotky se při tom spojují svými konci a umožňují tak tonofilamentu dosáhnout větší délky (Junqueira 1997).

Keratinová vlákna vytváří v buňkách prostorovou síť, z perinukleárního prstence odstupují filamenta procházející skrz cytoplazmu a končí v desmozomech a hemidesmozomech. V průběhu posledních fází normální diferenciaci keratinocytů je keratin pomocí matrixového proteinu filaggrinu spojen do velmi organizovaných a kondenzovaných svazků. Keratin a filaggrin tvoří společně 80–90 % proteinů epidermis (Proksch 2008).

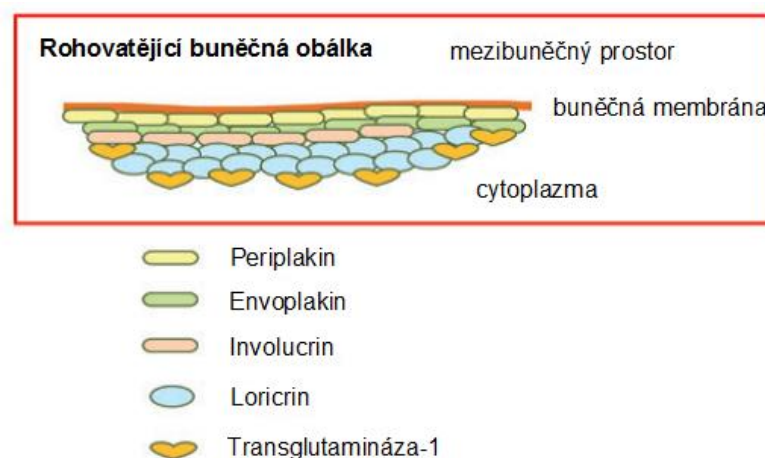
Epidermální buňky vytváří současně kyselý keratin (typ I) a bazický keratin (typ II). Kyselý typ keratinu má ve své molekule více negativně nabitých aminokyselin

(asparagová a glutamová kyselina) zatímco bazický typ keratinu obsahuje více pozitivně nabitých aminokyselin (lysin, arginin, histidin); (Wickett 2006). V savčí epidermis keratiny typu I a typu II pomocí disulfidových vazeb vytváří heterodimery, např. keratin 5 (K5) a keratin 14 (K14) vytváří heterodimery v bazální vrstvě, zatímco keratin 1 (K1) a keratin 10 (K10) v suprabazálních vrstvách, keratin 2 (K2) je ve stratum granulosum (Nishifuji 2013).

Dalšími významnými proteiny jsou filaggrin a loricrin, uvolňované z keratohyalinových granulí. Filaggrin (zkratka z filament-aggregating protein) ve své molekule obsahuje velké množství pozitivně nabitých aminokyselin a účastní se agregace keratinových filament, která mají převážně negativní náboj. Po splnění své funkce je uvolňován z keratinových mikrofibril a pomocí proteolytických enzymů přeměněn na aminokyseliny, které se stávají součástí přírodního zvlhčujícího faktoru (natural moisturising factor, NMF) kůže (Wickett 2006).

V dolních vrstvách epidermis jsou keratinocyty obaleny normální buněčnou membránou, skládající se převážně z fosfolipidů. Tato membrána je však velmi propustná pro vodu, což neumožňuje přežití v běžných terestriálních podmínkách. Proto při zrání keratinocyty dochází k významné změně povrchové membrány. Ve stratum granulosum je transformována na rezistentní proteinovou schránku zvanou *cell envelope* (CE, buněčná obálka), která potom obaluje korneocyty. CE se skládá z 15–20 nm silné vrstvy obsahující 15 nm silnou vrstvu definovaných strukturálních proteinů (cornified cell envelope, Obr. 2) a 5 nm silnou vrstvu speciálních lipidů (lipid envelope); (Nishifuji 2013). Tato lipidová

Obr. 2. Rohovatějící buněčná obálka



Legenda: Rohovatějící buněčná obálka korneocyty (cornified cell envelope); (modifikováno podle Nishifuji 2013)

jednovrstva, charakterizovaná ceramidy s dlouhým řetězcem kovalentně vázanými na vnější stranu CE, představuje hydrofobní rozhraní mezi hydrofilním povrchem vlastní CE a vysoce hydrofobními lipidovými lamelami v extracelulárním prostoru. Tato vrstva ve spolupráci s intercelulárními lipidy pomáhá udržet bariérové funkce pro vodu. Zároveň tato ceramidová monovrstva slouží jako templát pro orientaci dalších vrstev lipidů v extracelulárních lamelách (Vávrová 2006).

Proteinová část CE byla intenzivně studována a nyní je známo, že se skládá převážně z proteinů loricrinu (uvolňovaného z keratohyalinových granulí), malých proteinů bohatých na prolin, trichohyalinu a involucrinu. Proteiny jsou k sobě vázány $N^{\epsilon}(\gamma\text{-glutamyl})\text{lysin}$ isopeptidovými vazbami. Ostatní proteinové vazby, jako $N^{\epsilon},N^{\delta}\text{-bis}(\gamma\text{-glutamyl})\text{ spermidin}$ a disulfidové vazby přispívají k celkové integritě této struktury. Díky těmto proteinovým vazbám je CE nejméně rozpustnou strukturou korneocyty a má významnou mechanickou odolnost. Výzkum dále prokázal, že součástí vnitřní keratinové matrix jsou vázány k vnitřní části CE též prostřednictvím transglutamináz. Mezi třemi typy transglutamináz v epidermis je známá jako membránově lokalizovaná transglutamináza-1. Ta je syntetizovaná jako prekurzorový protein aktivovaný cathepsinem D. Její nedostatek u myši vede ke smrti novorozenců (Nishifuji 2013). Výzkum povrchu korneocytů dále prokázal heterogenicitu, odrážející postupnou modifikaci CE proteinové struktury prostřednictvím transglutamináz. Identifikace dvou odlišných, takzvaných „fragile“ (křehkých) a „rigid“ (tuhých) CE populací naznačuje jemnou modifikaci v interakci lipidových lamel se strukturou korneocyty (Harding 2004).

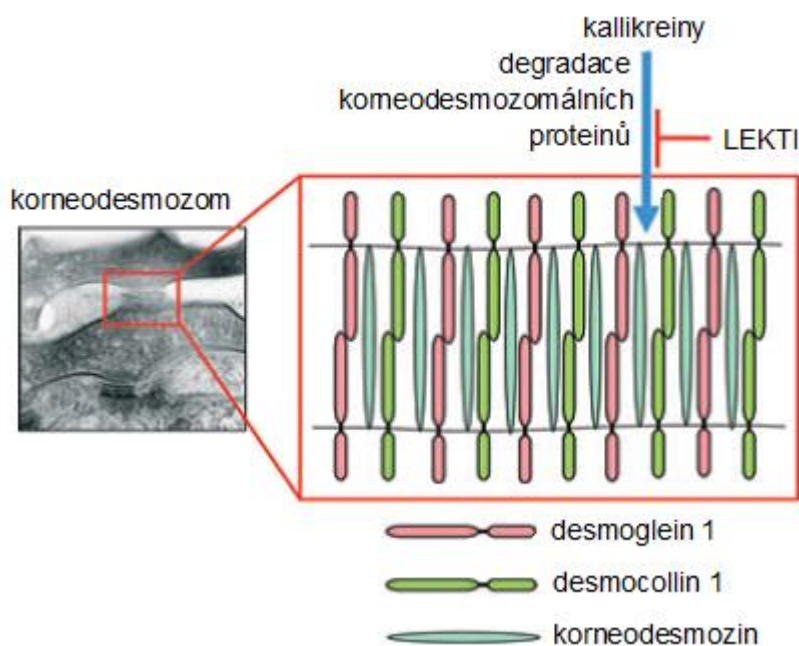
Vysoké integrity SC je dosaženo pomocí velkého počtu specializovaných intercelulárních proteinových struktur zvaných korneodesmozomy, které efektivně upevňují (nýtují) sousedící korneocyty v samotné SC nebo k sousední vrstvě. Korneodesmozomy představují hlavní soudržnou sílu, která ale musí být degradována v průběhu správné deskvamace. Na vnitřní (cytoplazmatické) straně korneodesmozomu jsou desmozomální proteiny zavazaty do cornified cell envelope a odděleny od tonofilament cytoskeletu. Extracelulární části korneodesmozomů se skládají z desmozomálních kadherinů – desmoglein (Dsg) 1, desmocolin (Dsc) 1 a corneodesmosinu.

Exfoliativní proces je komplexní děj a musí být přesně kontrolován, aby byla udržena integrita a tloušťka tkání. Deskvamace je umožněna činností několika hydrolytických enzymů, které rozrušují korneodesmozomální struktury dle specifického vzoru. Do tohoto procesu je zapojeno několik serin, cystein a aspartamových proteáz a alespoň jedna z těchto enzymatických tříd se jeví být speciálně upravena na fungování

v prostředí s nízkou vodní aktivitou, jež je v blízkosti povrchu kůže. Přesné spektrum proteáz a přesná posloupnost jejich účinku je zatím málo prozkoumána. Zdá se, že konečnou kontrolu aktivity proteáz má obsah vody a pH, vzhledem k tomu, že jsou uloženy extracelulárně v lipidové dvojvrstvě a mění se s postupem k povrchu kůže (Harding 2004). Novější informace o procesu degradace desmozomů podává Nishifuji (Nishifuji 2013, Obr. 3) – během deskvamace jsou extracelulární součásti (DsG1, Dsc1, corneodesmosin) degradovány pomocí kalikreinů (KLKs) a katepsinů. Kalikreiny jsou skupina patnácti „trypsin-“, a „chymotrypsin-like“ serinových proteáz (KLK 1-15). V lidské kůži jich je známo nejméně osm, KLK5 a KLK7 jsou exkretovány do extracelulárního prostoru mezi stratum granulosum a stratum corneum. KLK5 degraduje všechny součásti korneodesmozomů, KLK7 degraduje pouze Dsc1 a corneodesmosin. Aktivita KLK5 a KLK7 může být inhibována lymfoepiteliálním Kazal-typ 6 serinovým proteázovým inhibítorem (LEKTI), který je syntetizován v SG a z lamelárních granul uvolňován do extracelulárního prostoru. Energie potřebná k oddělení buněk je na povrchu SC přibližně 3 J/m², ve spodních vrstvách 15 J/m² (Wu 2006).

Složitost procesu deskvamace ovlivňuje i její modelování. Nepřítomnost deskvamace je jedním z hlavních problémů uměle vytvořených kožních modelů (Ponec 2002a).

Obr. 3. Degradace korneodesmozomu

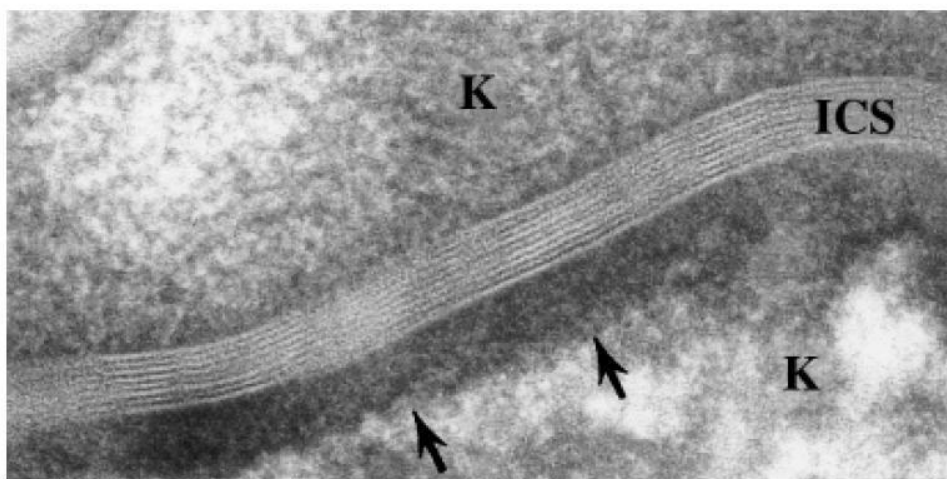


Legenda: Degradace korneodesmozomu v procesu deskvamace (modifikováno podle Nishifuji 2013)

Prostor mezi korneocyty je vyplněn *mezibuněčnou hmotou*, která je tvořena převážně tukovou matrix. Její součástí jsou ale i proteiny, např. sekretované enzymy potřebné k tvorbě ceramidů a ostatních mezibuněčných lipidů, enzymy podílející se na deskvamaci a jejich inhibitory, strukturální proteiny generované z lamelárních tělísek (cathelicidin antimicrobial peptide LL-37, human β -defensin, corneodesmosin), a malé množství vody, která též ovlivňuje vlastnosti SC (Elias 2012).

Hlavní lipidovou složkou extracelulární matrix jsou ceramidy (40–50 % objemu), mastné kyseliny (10–20 % objemu), cholesterol (25 % objemu), malé množství (2–5 % objemu) esterů a sulfátů cholesterolu a glukosylceramidů (Harding 2004). Jiní autoři uvádí podíl mezi ceramidy, volnými mastnými kyselinami a cholesterolem přibližně 1 : 1 : 1 (např. Iwai 2012). Triglyceridy, nasycené mastné kyseliny s krátkým řetězcem a nenasyčené mastné kyseliny, které jsou též součástí složení SC lipidů (zejména v horních částech SC), ve skutečnosti prezentují mazovou kontaminaci a předpokládá se, že nehrají důležitou roli v bariérové funkci (Bonte 1997). V mezibuněčné hmotě zdravého SC (na rozdíl od jiných epitelů a tkání) nejsou fosfolipidy (Harding 2004).

Obr. 4. Lamely v intercelulárním prostoru mezi korneocyty



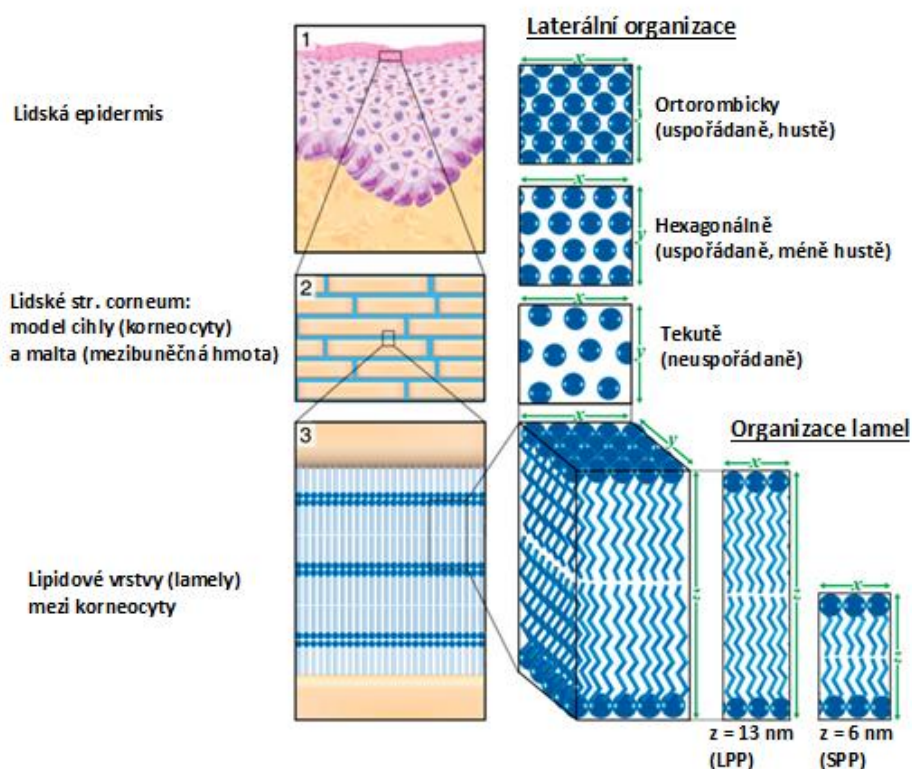
Legenda: Snímek z elektronového mikroskopu, zvětšeno 200 000x. K = korneocyt (tmavé skvrny jsou shluky keratinu), ICS – intercelulární prostor, šipky míří na cell envelope dolního korneocytu (převzato z Madison 2003)

Lipidy v extracelulárním prostoru SC nejsou uloženy amorfně, naopak vytváří pravidelně organizovanou strukturu, skládající se z opakujících se lipidových lamel uložených paralelně s povrchem buněk. Na snímcích z elektronového mikroskopu (Obr. 4) jsou patrné střídající se silnější proužky (tzv. long periodicity phase, LPP, s periodicitou

přibližně 13 nm) a slabší proužky (tzv. short periodicity phase, SPP, s periodicitou přibližně 6 nm); (Bouwstra 2006, Caussin 2008).

Modely popisující stavbu a organizaci mezibuněčné hmoty se vyvíjely. Její lamelární struktura je známa od 60. let 20. století (Swanbeck 1962). Schwartzendruber (Swartzendruber 1989) ji popisoval jako skládanou jednovrstevnou hmotu (stacked monolayer model), Forslind (Forslind 1994) jako „domain mosaic model“, Bouwstra jako „sandwich model“ (Bouwstra 2001), Norlen jako „single gel-phase model“ (Norlen 2001). Novější názor na tuto skladbu uvádí Iwai (Iwai 2012, komentář k tomuto článku - Elias 2012; podrobný popis těchto modelů je nad rámec disertační práce). Do dnešního dne nebylo dosaženo konsensu, který model je pro popis fyzikálního stavu lipidových lamel nejvhodnější (Notman 2013). Souhrnně lze říci, že intersticiální lipidy se v kůži nachází v balancované rovnováze mezi solidní krystalickou fází (ortorombicky uspořádané) a gelovou fází (s hexagonálním uspořádáním molekul) a tekutě krystalickou fází (Obr. 5).

Obr. 5. Struktura epidermis a lipidových lamel



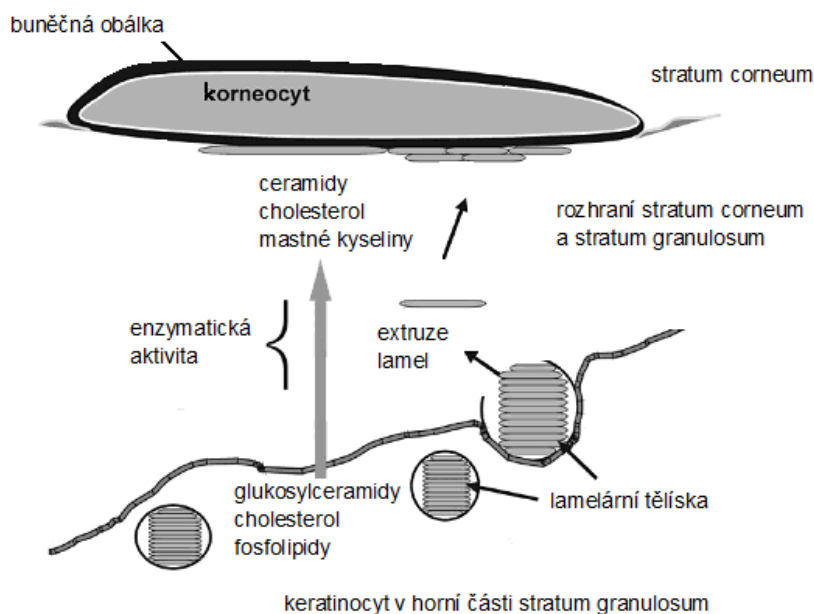
Zdroj: modifikováno podle Janssens 2012

Ortorombické uspořádání umožňuje těsnější uskupení lipidů a má lepší bariérové vlastnosti (Rawlings 2005). U lidské kůže je víc zastoupeno ortorombické uspořádání,

zatímco u prasečí kůže je víc zastoupeno hexagonální uspořádání a tekuté krystalické formy (Jacobi 2005a).

Většina SC extracelulárních lipidů vzniká z obsahu lamelárních tělísek tvořených keratinocyty ve stratum spinosum a granulosum (Obr. 6). Lamelární (nebo Odlandova) tělíska jsou ovoidní intracelulární sekretorické orgány o velikosti 0,2x0,3 μm obalené dvoulamelovou membránou. Vznikají odštěpením váčků z Golgiho aparátu buněk a obsahují fosfolipidy, glukosylceramidy, sfingomyelin a cholesterol – prekurzory lipidů přítomných v extracelulární prostoru SC. Dále obsahují množství enzymů, zahrnující lipidové hydrolázy (β-glukocerebrosidáza, kyselá sfingomyelináza, sekreční fosfolipáza A₂, neutrální lipáza) a proteázy (chemotryptické enzymy – kalikrein, kathepsin). Obsahují též i některé antimikrobiální peptidy (lidský β-defenzin 2 a cathelicidin LL-37). Nejsou přítomny v bazální vrstvě epidermis, objevují se v horní části stratum spinosum, nejvíce jich je přítomno v keratinocytech ve stratum granulosum.

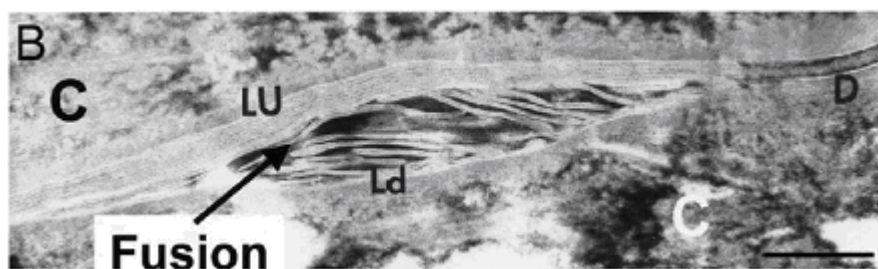
Obr. 6. Tvorba extracelulární matrix



Legenda: Tvorba extracelulární matrix na rozhraní stratum granulosum a corneum (modifikováno podle Bouwstra 2003a).

Na rozhraní mezi stratum granulosum a stratum corneum dochází k extruzi obsahu lamelárních tělísek do extracelulárního prostoru (Obr. 7) a extrudované fosfolipidy, sfingolipidy a součásti plazmatické membrány jsou enzymaticky štěpeny pomocí enzymů, jež jsou z lamelárních tělísek současně kosekretovány: β-glukosylcerebrosidáza mění

Obr. 7. Fúze lipidových lamel

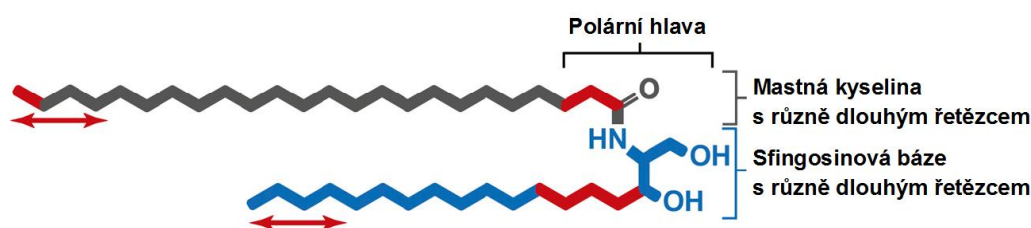


Legenda: Fúze lipidových lamel podél korneocytu (fotografie z elektronového mikroskopu; C = korneocyt, LU = lamely extracelulární matrix, Ld = lipidové disky, D = desmozom; černá tyčka = 100 nm); (převzato z Bouwstra 2003a)

glukosylceramidy na ceramidy, kyselá sfingomyelináza mění sfingomyelin na ceramidy, fosfolipáza mění fosfolipidy na volné mastné kyseliny a glycerol. Poškození bariéry vede ke zvýšení β -glukosylcerebrosidázové aktivity a zvýšení její mRNA v epidermis, podobně jako i zvýšení sfingomyelinázové aktivity. Cholesterol sulfát je pomocí steroid sulfatázy metabolizován na cholesterol (Feingold 2007). Metabolizované lipidové prekurzory se potom spojují a tvoří souvislou lamelární dvojvrstvu charakteristickou pro SC. Soudí se, že kůže musí denně syntetizovat kolem 100–150 mg lipidů k náhradě množství ztraceného deskvamací. Tudíž je kůže jednou z nejvíce aktivních tkání v syntéze lipidů v těle (Harding 2004). Glycerol, který vzniká při metabolismu fosfolipidů, má významnou roli při udržení správné hydratace SC (Feingold 2007).

Největší zastoupení mezi extracelulárními lipidy v SC mají *ceramidy*, tvoří okolo 40–50 % SC lipidů. Chemicky ceramidy patří mezi sfingolipidy. Obecně molekula ceramidu obsahuje polární hlavu a dva hydrofobní řetězce (Obr. 8).

Obr. 8. Struktura ceramidu.

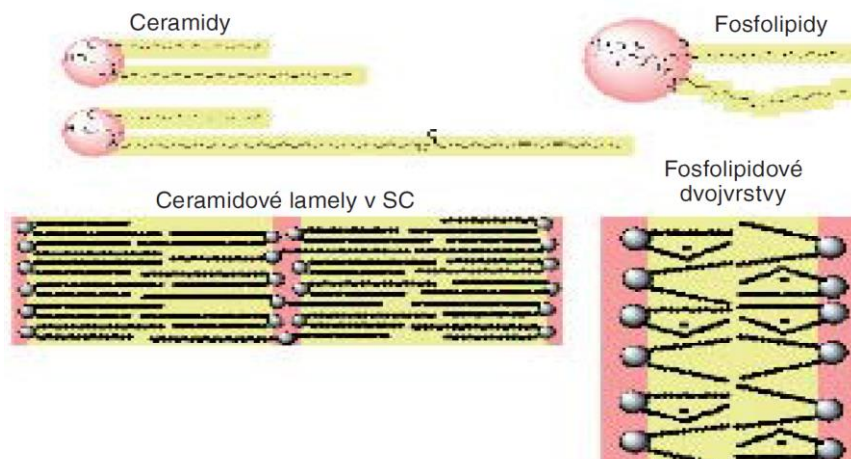


Zdroj: modifikováno podle Janssens 2012

Podobnou stavbu mají i fosfolipidy, které tvoří běžné buněčné membrány. Na rozdíl od nich je však polární hlava ceramidů výrazně menší, což umožňuje těsnější uspořádání lipidů v lamele. Ceramidy mají též podstatně delší hydrofobní řetězce a vytvářejí nikoliv pouze dvojvrstvy, ale několikavrstvé, vzájemně propojené lamelární

struktury. Tyto strukturální znaky vysvětlují, proč je propustnost ceramidových lamel řádově tisíckrát nižší, než je tomu u fosfolipidových dvojvrstev (Vávrová 2006, Obr. 9).

Obr. 9. Srovnání struktury ceramidů a fosfolipidů.

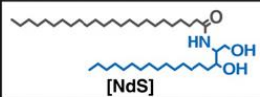
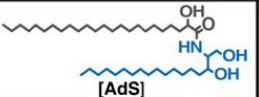
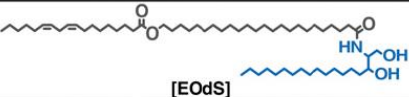
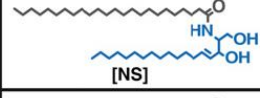
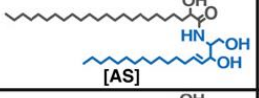
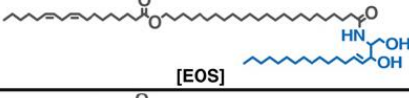
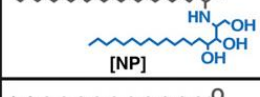
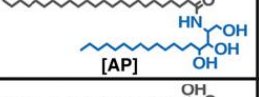

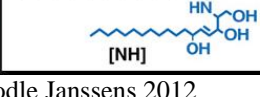
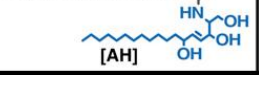
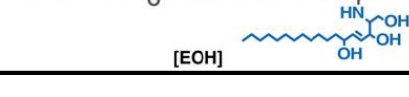


Zdroj: převzato z Vávrová 2006

Základem molekuly ceramidu je bazický alkohol (sfingosin, fytosfingosin, 6-hydroxysfingosin nebo dihydrosfingosin). Na jeho primární aminoskupinu je v poloze dvě amidicky připojena mastná kyselina, která může být nehydroxylovaná, alfa-hydroxylovaná nebo omega-hydroxylovaná. Tyto MK mohou mít různou délku řetězce (většinou 16 až 34 uhlíků, nejčastěji 24 uhlíků), jsou však vždy nevětvené a většinou bez dvojných vazeb (Förster 2009). Vzniká tak teoreticky velké množství kombinací, do dnešního dne bylo v kůži objeveno přibližně 350 různých ceramidů (Masukawa 2009, Garidel 2010). Tyto různé ceramidy jsou na základě nejnovějších poznatků řazeny do 12 tříd (Janssens 2012, Ishikawa 2013, Tab. 1). U lidí je sedm těchto tříd přítomno pouze v SC, jedná se o esterifikované ω -hydroxyceramidy CER-EOS, CER-OP, CER-EOH, dále CER-AH, CER-AP, CER-NH a CER-NP. Esterifikované ω -hydroxyceramidy hrají hlavní roli v bariérových funkcích díky extrémně dlouhému řetězci mastných kyselin. CER-EoS nebyl zatím v SC savců nalezen (Nishifuji 2013).

Značení ceramidů navrhl Motta (Motta 1993). Sfingoidní báze značí písmeny: S = sfingosin, P = fytosfingosin, H = 6-hydroxysfingosin, dS = dihydrosfingosin; mastné kyseliny (MK) značí písmena: N = nehydroxylovaná MK, A = alfa-hydroxy MK, O = omega-hydroxy MK. Písmeno E znamená esterově vázanou mastnou kyselinu (pokud je přítomna, dává se na začátek kódu, př. Cer EOS).

Tab. 1. Třídy ceramidů.

	Nehydroxylovaná MK [N]	α -hydroxy MK [A]	Esterifikovaná ω -hydroxy MK [EO]
Dihydrosfingosin [dS]			
Sfingosin [S]			
Fytosfingosin [P]			
6-hydroxysfingosin [H]			

Zdroj: modifikováno podle Janssens 2012

V extracelulární prostoru SC vznikají ceramidy hydrolýzou glukosylceramidů (pomocí enzymu β -glukocerebrosidázy), nebo hydrolýzou sfingomyelinu (pomocí enzymu kyselá sfingomyelinázy) uvolňovaných z lamelárních tělísek. Z ceramidů ve stratum corneum převažuje ceramid CER(EOS) s ω -hydroxy mastnou kyselinou esterově vázanou na linolovou kyselinu a amidově vázanou na sfingosin. Tento ceramid je vysoce bohatý na linolovou kyselinu, která tvoří minimálně 20–30 % omega-esterifikovaných mastných kyselin a je nutná pro udržení bariérových funkcí (Proksch 2008). Linolová kyselina patří mezi esenciální MK, lidský organismus ji nedokáže syntetizovat a je odkázán na přírodní výživu. Nedostatečná výživa tak též může poškozovat bariérové funkce kůže (Feingold 2014).

Podílem druhý hlavní SC lipid – *cholesterol* – může být do keratinocytů bazální vrstvy resorbován z krve, avšak většina cholesterolu vzniká *in situ* z acetátu. Zvýšená epidermální tvorba cholesterolu je v průběhu reparace permeability bariéry (Proksch 2008). Část cholesterolu syntetizovaného v keratinocytech je metabolizována na cholesterolsulfát. Ten je během kornifikace v extracelulárním prostoru SC degradován pomocí steroid-sulfatázy na cholesterol, který je inkorporován do extracelulárních lipidových lamel (Nishifuji 2013). Cholesterol zvyšuje fluiditu membránových domén nebo je dělá více rigidní (v závislosti na fyzikálních vlastnostech ostatních lipidů a jeho relativní koncentraci ve srovnání s ostatními komponenty); (Förster 2009).

Třetím zástupcem lipidů v SC jsou mastné kyseliny. Ty se v epidermis vyskytují jako volné nebo vázané (triglyceridy, glukosylceramidy a ceramidy). Délka řetězců volných mastných kyselin je od 12 do 24 uhlíků. Nasycené a mononenasyčené mastné

kyseliny jsou syntetizovány přímo v epidermis, ostatní musí být získávány z výživy a transportovány krví (Proksch 2008). Mastné kyseliny hrají významnou roli při formování lamelární fáze SC (Förster 2009).

Hlavními stimulatory syntézy epidermálních lipidů jsou interleukin 1 (IL-1), tumor necrosis factor (TNF) a interleukin 6 (IL-6). Po akutním poškození permeability kožní bariéry dochází k jejich zvýšení v epidermis a to se jeví být velmi důležité pro obnovu bariérových funkcí (Proksch 2008).

Kožní lipidy hrají též důležitou roli v boji proti mikrobiální infekci kůže. Část těchto lipidů je syntetizována epidermálními keratinocyty, část pochází ze sekretu mazových žláz. Jednou takovou skupinou jsou volné sfingoidní báze (sfingosin, dihydrosfingosin, 6-hydroxysfingosin, fytosfingosin), které jsou generovány enzymatickou hydrolyzou epidermálních ceramidů (Fischer 2014). Jinou skupinou jsou specifické mastné kyseliny derivované z mazových triglyceridů, zejména sapienová kyselina (sapienic acid C16:1Δ6, cis), která je v kombinaci s nízko koncentrovaným etanolem velmi efektivní proti meticilin-rezistentnímu Stafylokokku aureu (MRSA). Je dokonce více efektivní než mupirocin, který je označován jako „zlatý standard“ v boji proti MRSA (Drake 2008). Další MK účinnou proti některým Gram-pozitivním (Stafylococcus aureus, Streptococcus sanguis, Streptococcus mitis, Corynebacteria bovis, striatum a jeikeium) i Gram-negativním (Fusobacterium nucleatum) bakteriím je laurová kyselina (C12:0). Antifungální účinky vykazují některé mazové MK s krátkým řetězcem (C₇–C₁₁) a též kyselina undecylenová (C₁₁H₂₀O₂), přítomná v potu (Fischer 2014).

Základním mechanismem udržujícím obsah vody v SC a zajišťujícím flexibilitu a kontinuitu aktivity hydrolytických enzymů je tzv. přírodní zvláčňující faktor (natural moisturising factor, NMF). Byl poprvé popsán Jacobim v roce 1959 (Jacobi 1959) jako komplex ve vodě rozpustných látek o nízké molekulární hmotnosti. Později bylo zjištěno, že NMF je derivován při kompletní hydrolyze proteinu filaggrinu (slouží v epidermálních buňkách k propojování keratinu); (Harding 2004).

Za normálního stavu obsahuje zdravé stratum corneum 10–20 % vody (na rozdíl od stratum basale, kde je obsaženo 75 % vody). Je však extrémně hygroskopické, při ponoření ve vodě dovede zvýšit svoji hmotnost oproti „suchému“ stavu o 500 % během méně než jedné hodiny, ve vertikálním směru se zvyšuje 4–5krát (Zhai 2002). Voda je v tomto případě přítomna zejména ve středních partiích SC, a to intracelulárně (dochází k otoku korneocytů), extracelulární lipidy jsou ovlivněny minimálně (Bouwstra 2003b). Transport vody do buněk je zprostředkován pomocí transmembránových proteinů – aquaporinů.

Některé jsou propustné pouze pro vodu, jiné mohou přenášet i jiné malé molekuly (např. glycerin nebo ureu). U savců je známo 13 typů aquaporinů (značeny AQP0 – AQP12). V lidské kůži bylo popsáno několik typů těchto proteinů. In vitro byla na epidermálních buňkách nalezena mRNA pro AQP3 a AQP10 na keratinocytech, AQP1 na melanocytech, AQP9 a 10 na monocytech, AQP3 a 9 na Langerhansových buňkách. AQP5 byl nalezen na buňkách potních žláz (ten je propustný pouze pro vodu), AQP7 na adipocytech (důležitý pro transport glycerolu). Keratinocytární AQP3 je propustný pro vodu a glycerin, jedná se o protein s molekulární hmotností 26 kDa, většinou glykosylovaný. Je bohatě přítomen na keratinocytech ve stratum basale a spinosum, mizí ve stratum granulosum a zcela chybí na korneocytech ve stratum corneum (Boury-Jamot 2006, 2009).

Další buňky epidermis

Melanocyty tvoří přibližně 3 % buněčné populace pokožky. Jedná se o dendritické buňky pocházející z ektodermové neurální lišty a nacházející se mezi keratinocyty ve stratum basale v počtu jeden melanocyt na 5–12 keratinocytů (na 1 mm² kožního povrchu se nachází 1000 [na stehně] až 2000 [na skrotu] melanocytů). S keratinocyty nejsou spojeny pomocí desmozomů, k bazální membráně však jsou poutány hemidesmozomy. Jejich funkcí je tvorba pigmentu (melaninu), který slouží jako ochrana před účinky UV záření. Melanocyty akumulují tyrosin a pomocí tyrozinázy jej mění na melanin. Existují dva typy melaninu – eumelanin (hnědý) a feomelanin (rezavý, obsahuje jako stavební složku cystein). Melanin je v buňce skladován v tzv. melaninových granulích. Tato granula jsou vyráběna v těle buňky, potom se přesunují do výběžků buňky zasahujících do prostorů mezi keratinocyty ve stratum basale a stratum spinosum a jsou procesem zvaným cytokrinní sekrece injikovány do okolních keratinocytů, kde se shromažďují v supranukleární oblasti cytoplazmy a chrání tak dělicí se jádra před účinky UV záření. Počet melanocytů na jednotku povrchu není ovlivněn rasou, rozdíl v barvě pleti je dán počtem melaninových granulí. Počet melanocytů je stejný i u albínů, u nich ale nedochází k přeměně tyrosinu na melanin, neboť mají defekt tyrozinázové aktivity (Záruba 1994, Kanitakis 2002, Hoath 2003).

Langerhansovy buňky byly poprvé popsány P. Langerhansem v roce 1868 (Langerhans 1868). Mají hvězdicový tvar a představují 2–8 % epidermálních buněk, ve stratum basale je jich méně, více jich leží ve stratum spinosum. Patří mezi buňky imunitního systému. Jedná se o makrofágy pocházející z kostní dřeně, schopné vázat antigeny a prezentovat je T-lymfocytům. Po navázání antigenu na buňce se z epidermis

mohou vracet do lymfatického oběhu a dále do uzliny (Záruba 1994, Hoath 2003, Berger 2006). Tímto způsobem reagují nejen na alergeny, ale i na kožní iritanty, kdy kontakt s nimi není považován za imunitní reakci (Jacobs 2006).

Merkelovy buňky se nachází převážně v tlusté kůži dlaní a plosek nohou, zejména na koncích prstů. Menší množství byla nalezena v okolí rtů, ve sliznici dutiny ústní a jícnu, na předkožce a na klitoris. Na osluněných částech těla jsou častější než na krytých částech. Podobají se keratinocytům, ale liší se od nich přítomností malých temných granul v cytoplazmě. U jejich bází se nachází volná nervová zakončení, vytvářející rozšířené terminální disky. Slouží pravděpodobně jako mechanoreceptory, i když jiné okolnosti nasvědčují tomu, že mají souvislost s neuroendokrinním systémem. Ačkoliv byly objeveny Friedrichem Sigmundem Merkelem již v roce 1875, jejich funkce a původ nebyly dodnes plně objasněny (Sidhu 2005, Polakovičová 2011).

V normální zdravé epidermis se dále nachází i malé množství T lymfocytů a NK buněk (Chuong 2002).

1.2 Dermis

Je tvořena různě silnou vrstvou řídkého kolagenního vaziva, nejsilnější (4 mm) je na zádech. Od epidermis je oddělena bazální membránou, skládající se z bazální laminy a pod ní se nacházející laminy reticularis (sít' jemných retikulárních vláken). Tato hranice je zvlněná, vytváří četné dermální papily, proti nimž vybíhají epidermální čepy. Na dolní straně plynule přechází vazivo škáry ve vazivo podkoží.

Dermis se dělí na dvě části – horní *pars papilaris* a dolní *pars reticularis*.

Pars papilaris (100–200 μm silná) je tenká vrstva řídkého kolagenního vaziva obsahující více buněk (fibroblasty, žírné buňky, makrofágy, leukocyty) a mezibuněčné hmoty a méně vláken (obsahuje též speciální kolagenní vlákna, které upínají škaru do bazální membrány – tzv. kotevní vlákna). Toto vazivo je přítomno zejména v oblasti papil škáry.

Pars reticularis je silnější vrstva neuspořádaného kolagenního vaziva obsahující víc vláken (zejména kolagenní vlákna typu I, méně elastická a retikulární vlákna) a méně buněk.

Mezibuněčná hmota škáry je tvořena vodou a glykosaminoglykany – hlavním je dermatan sulfát.

Cévní zásobení vytváří v dermis dvě arteriální pleteně a tři venózní pleteně. První arteriální pteň je na rozhraní mezi stratum papilaris a reticularis, druhá na rozhraní dermis a hypodermis. Do každé papily přichází jedna arteriální větévka a odchází jedna venózní větévka. Dvě venózní pleteně jsou umístěny podél arteriálních pleteně, zbývající třetí probíhá uprostřed dermis. Vaskularizace dermis může významně ovlivnit absorpci látek, což se projevuje zejména při vasokonstrikci cév (která snižuje míru absorpce látek do organismu) a vasodilataci (zvyšuje prostup látek do těla). Toho se využívá při tvorbě transdermálních farmaceutických přípravků, kdy přidání vasokonstrikčních nebo vasodilatačních látek do těchto systémů ovlivňuje transdermální absorpci účinné látky (Cross 2008).

Ve škáře se nachází všechny typy nervů (aférentní i eferentní), jsou zde četná nervová zakončení a receptorová tělíska. V papilách se nachází malá *Meissnerova tělíska* tvořená několika plochými buňkami opředěnými volnými nervovými zakončeními a sloužící jako mechanoreceptory pro jemné dotykové čítí. Na rozhraní dermis a hypodermis jsou četná *Vater-Pacciniho tělíska*. Jedná se o větší útvary, jejich ploché buňky jsou uspořádány cibulovitě a slouží jako mechanoreceptory. Pro vnímání teploty slouží menší tělíska *Krauseho* (chladová) a *Ruffiniho* (detekce tepla); (Junqueira 1997).

Nedílnou součástí dermis jsou i tzv. **kožní adnexa** - žlázy mazové a potní a vlasové folikuly. Jsou deriváty epidermis, tudíž jsou též ektodermového původu.

Mazové žlázy jsou rozvětvené alveolární polyptychní holokrinní žlázy nacházející se v blízkosti vlasového folikulu v úhlu, který s ním svírá hladký sval zvaný vzpřimovač vlasu (musculus arector pili). Jsou na celém povrchu těla s výjimkou dlaní rukou a plosek nohou. Jejich počet závisí na lokalizaci, průměrně je jich 100/cm², ale na obličeji a ve kštici je jejich počet vyšší (400–900/cm²). Ústí většinou do vlasového folikulu (pod ústím velké potní žlázy), nebo výjimečně přímo na povrch kůže (na glans penis, glans clitoridis, rty, nos). Jsou bohatě cévně zásobeny (Junqueira 1997).

Produktem mazových žláz je maz (sebum), který obsahuje triacylglyceroly, vosky, skvalen, cholesterol a jeho estery a vzniká tukovou degenerací sekrečních buněk. Maz spolu s produkty potních žláz a odloupanými epitelii tvoří na povrchu kůže tzv. kyselý kožní film (pH 4,8–6,5) s antimikrobiálním účinkem (Riviere 2009).

Potní žlázy jsou dvojího typu – tzv. malé potní žlázy (ekrinní) a velké potní žlázy (apokrinní).

Malé potní žlázy se nachází na celém povrchu těla. Jedná se o jednoduché stočené monoptychní tubulární žlázy ústící přímo na povrch těla. Nachází se v dolní části dermis nebo v horní části hypodermis, jejich vývod (o průměru 100 µm) prochází skrz dermis přímo a v epidermis se spiralizuje. Způsob sekrece je ekrinní, produktem je tekutina zvaná pot. Jedná se o ultrafiltrát krevní plazmy obsahující zejména vodu, malé množství bílkovin, chlorid sodný, močovinu, amoniak a kyselinu močovou. Na povrchu kůže se pot odpařuje a chladí pokožku. Pokud to vyžaduje homeostáza organismu, mohou být stěnou vývodů reabsorbovány voda, soli a elektrolyty. Inervace malých potních žláz je prostřednictvím cholinergních nervových vláken (Junqueira 1997).

Velké potní žlázy se nachází pouze na některých částech těla (podpaží, oblast genitálu, okolí análního otvoru, prsní dvorec), modifikovanými aromatickými žlázami jsou i mléčná žláza, ceruminózní žlázy v zevním zvukovodu a Molloyovy žlázy na očních víčkách. Velké potní žlázy jsou rozvětvené tubulární monoptychní žlázy s apokrinní sekrecí. Ústí do vlasového folikulu nad ústím mazové žlázy. Jejich produktem je pot, který se vlivem bakteriální flóry kožního povrchu rozkládá a získává svůj charakteristický pach. Inervace aromatických žláz je adrenergními nervovými vlákny a tyto žlázy se aktivují až po pubertě (Junqueira 1997).

Vlasové folikuly se nachází na celém povrchu těla s výjimkou dlaní rukou, plosek nohou, rtů, glans penis, labia minora a clitoris. Jejich rozmístění, barva a velikost závisí na rase, pohlaví, věku a lokalizaci na těle.

V průběhu života se typ vlasu mění. Ve fetálním období se objevuje lanugo – černé jemné chmýří, které zpočátku bývá na celém povrchu těla. V období kolem porodu (před nebo po něm) je ve kštici vystřídáno vlasem velusovým. Velusový vlas je jemný, krátký, neobsahuje dřev. V průběhu několika let je vystřídán vlasem terminálním, ale může se znovu objevit jako ojedinělé vlasy při plešatosti. Terminální vlasy jsou dvojího typu – pili longi (vlasy kštice, vousy, ochlupení axily a na mons pubis) a pili breves (řasy, obočí, vibrissae [chlupy v nosní dutině], tragi [chlupy v zevním zvukovodu], chlupy po těle).

Vlasový folikul je v dolní části rozšířen ve vlasovou cibulku (bulbus pili), která nasedá na dermální papilu, obsahující vyživující kapilární pleteň a inervaci. Na příčném průřezu se vlasový folikul skládá z vlasu, vnitřní a zevní epitelové pochvy a vnitřní a zevní vazivové pochvy.

Vlas má tři vrstvy. Uprostřed se nachází dřev (z centrálně uložených buněk vzniklé vakuolizované a částečně keratinizované elementy, tzv. měkký typ rohovatění), okolo je kůra (vzniká z buněk, které se diferencují v silně keratinizované elementy vřetenovitě

uspořádané, tzv. tvrdý typ rohovatění). Na povrchu vlasu se nachází kutikula – buňky v dolní části vlasového folikulu původně kubické, jež se postupně mění na cylindrické a ty potom mění svoji orientaci z polohy horizontální do polohy vertikální, takže na povrchu volného vlasu vytváří vrstvu šindelovitě uspořádaných oploštělých buněk.

Vnitřní epitelová pochva se skládá též ze tří částí. Uvnitř je kutikula vnitřní pochvy, potom následují vrstva Huxleyova a Henleova. Buňky vnitřní pochvy rohovatí a zanikají nad ústím mazové žlázy.

Zevní epitelová pochva je tvořena zanořením stratum germinativum epidermis směrem do dermis. Tvoří ji tedy dvě vrstvy buněk (stratum basale a spinosum) a jejich bazální membrána (zde zvaná sklovitá blanka). Zevní epitelová pochva je nejsilnější u krčku vlasu (u cibulky je slabá) na rozdíl od vnitřní epitelové pochvy, která je nejsilnější v oblasti cibulky folikulu.

Posledními vrstvami vlasového folikulu jsou *vnitřní a zevní vazivová pochva*, tvořená okolním vazivem. Rozlišení je dáno orientací vazivových vláken, jež jsou ve vnitřní vazivové pochvě umístěna cirkulárně a v zevní vazivové pochvě podélně (Junqueira 1997).

1.3 Hypodermis

Podkoží je tvořeno řídkým kolagenním vazivem, obsahujícím velké množství tukových buněk. Hranice mezi škárrou a podkožím není výrazná, potní žlázy a vlasové folikuly zasahují až mezi lalůčky tukové tkáně podkoží.

Podkožní tuk obsahuje především neutrální tuky (triacylglyceroly) a představuje asi polovinu fyziologického tukového depa u člověka. Podléhá endokrinním vlivům, které jsou potencionovány nervovými a výživovými faktory. Podkožní tuk je důležitou energetickou zásobárnou organismu, chrání proti mechanickým vlivům a účastní se termoregulace organismu (tepelný izolátor). Podkoží slouží též jako zásobárna vody v organismu, je zde uloženo asi 10–30 % tělesné vody, což je důležité zejména u malých dětí (Záruba 1994).

2. Transdermální absorpce

Dermální absorpce byla známou a používanou cestou k průniku látek do organismu již ve starověkých civilizacích, jak o tom svědčí nálezy různých mastí, krémů, mazání a pomád v archeologických nalezištích po celém světě. Nejstarší dochované receptury na výrobu těchto extern pocházejí ze spisů babylónských a egyptských lékařů (např. Ebersův papyrus, 1 500 př. n. l.). Léčiva byla používána zejména pro své lokální účinky, ale byly známy i účinky celkové. Bez znalosti mechanismu působení byly některé postupy používány po staletí, až do začátku minulého století.

Obr. 10. Sir Percivall Pott (1717-1788)



Zdroj: <http://www.surgical-tutor.org.uk/default-home.htm?surgeons/pott.htm~right>

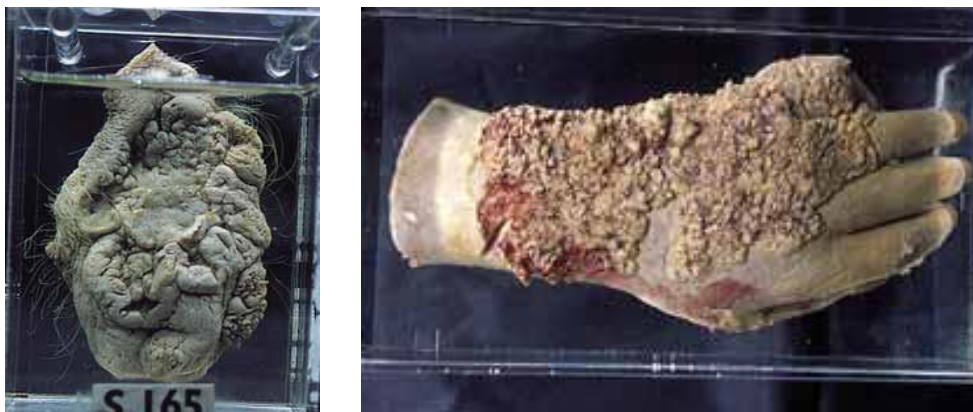
Nebezpečnosti dermální expozice si jako první všiml významný londýnský lékař Percivall Pott (1714–1788, Obr. 10). Ve své práci (historicky první epidemiologické studii) *Chirurgical Observations Relative to the Cataract, the Polypus of the Nose, the Cancer of the Scrotum, the Different Kinds of Ruptures, and the Mortification of the Toes and Feet*, publikované již v roce 1775 v Londýně (Pott 1775) poukazuje na souvislost mezi expozicí sazímu a nádory kůže na šourku u kominíků a na ruce zahradníka, používajícího k hnojení zahrady saze. Makroskopické preparáty zhotovené Pottem jsou dodnes vystaveny v Patologickém muzeu

Nemocnice sv. Bartoloměje v Londýně (Obr. 11).

Příčinu těchto nádorů, tj. dermální expozici polycyklickým aromatickým uhlovodíkům, objasnil až o 140 let později roku 1915 japonský lékař a vědec Katsusaburo Yamagiwa (1863–1930), kterému se jako prvnímu podařilo experimentálně vyvolat vznik rakoviny kůže po 250 dnech aplikace uhelného dehtu na ucho králíka (Yamagiwa 1918).

Rozvoj moderní vědy počátkem 20. století se týkal i zkoumání kůže a jejích vlastností. První hypotézu o bariéře transportu látek v epidermis a vlivu SC prezentoval Rein (Rein 1924). Významný souhrn poznání mechanismů kožní absorpce publikoval Rothman (Rothman 1943). V padesátých a následujících letech se rozvíjelo poznání struktury a vlastností kůže, lokalizace kožní bariéry a mechanismů prostupu látek skrz

Obr. 11. Makroskopické preparáty karcinomů kůže skrota a ruky



Legenda: Makroskopické preparáty karcinomů kůže skrota a ruky zhotovené sirem Percivallem Pottem, vystavené v Patologickém muzeu Nemocnice sv. Bartoloměje v Londýně, (zdroj: <http://www.iaphomepage.org/int302/no302pg2.html>)

kůži, byly publikovány zásadní články zabývající se dermální penetrací, jmenovat lze jen některé – Davies 1950; Vallette 1953; Hadgraft 1954, 1956; Blank 1965, 1969. V 60. letech byly též položeny základy matematickému modelování procesů percutánní penetrace (Higuchi 1960). Koncem 60. let a začátkem 70. let se do popředí zájmu dostala topická aplikace kortikosteroidů a položila tak základ transdermálním lékovým systémům (Katz 1972). Z hlediska dermální expozice na ovlivnění zdraví člověka byla významnou American Conference od Governmental Industrial Hygienists (ACGIH), která se konala v roce 1961. Zde bylo poprvé řečeno, že „tekuté látky mohou penetrovat nepoškozenou kůži a způsobit systémový efekt“. Do té doby se soudilo, že látky působící na kůži vyvolávají spíše lokální účinek.

V 70. letech byla publikována dodnes nejvíce používaná statická difúzní komůrka pro in vitro testování transdermální penetrace tzv. Franzova cela (Franz 1975), následovaná v 80. letech komůrkou průtokovou (Bronaugh 1985). Byla objevena struktura rohové vrstvy, která byla přirovnána ke zdi skládající se z cihel a malty (Michaels 1975, Nemes 1999), byl popsán kožní metabolismus (Ando 1977), funkce lamelárních, po svém objeviteli Odlandových, tělísek (Odland 1981), rozpoznána důležitost intercelulární cesty při penetraci látek (Elias 1983). V roce 1979 se také začal používat první transdermální terapeutický systém - třídnenní náplast se skopolaminem (Prausnitz 2008).

Další zintenzivnění zájmu o kůži a dermální penetraci začalo v 90. letech a pokračuje dodnes. Rychlý rozvoj kosmetického a farmaceutického průmyslu si žádal přesnější odpovědi na otázky mechanismu prostupu a bezpečnosti použitých látek, na možnosti ovlivnění jejich penetrace (enhancery a retardéry penetrace). Změny

v pracovních postupech a procesech v průmyslu vedly ke snížení rizika zdravotní nebezpečnosti inhalačních expozic a tím se otevřela cesta k rozpoznání a uvědomění si rizik dermálních pracovních expozic, podobně jako i expozic environmentálních. Zdokonalování experimentálních metod, postupů, přístrojů a informací trvá stále.

Zájem o metody dermální penetrace nebyl v Československu v minulosti velký, díky tomu nebylo vytvořeno oficiální české názvosloví. Zájem o tuto problematiku, který přišel v 90. letech minulého století, tj. v době vědeckých publikací psaných převážně v angličtině a jazykové gramotnosti většiny experimentátorů, již nevedl k obrozené potřebě překládat anglické celosvětově používané termíny do češtiny. Z toho důvodu jsou v této práci používány většinou anglické názvy, případně doplněné českým překladem nebo vysvětlením pojmu.

2.1 Mechanismus transdermální absorpce

Při dermální expozici mohou chemické látky pronikat do vnitřního prostředí organismu pěti různými cestami (WHO 2006): 1) transcelulární cestou – tj. skrz těla buněk; 2) intercelulární cestou – tj. mezibuněčnými prostory; 3) vlasovými folikuly; 4) mazovými žlázami; 5) vývody potních žláz.

Většina látek prochází intercelulární cestou přenosu, tato cesta je typická zejména pro lipofilní látky. Látky prochází skrz extracelulární prostor SC, kde se nachází extracelulární matrix tvořená zejména lipidy (viz kapitola 1.1). Dráha látek penetrujících touto cestou je odhadována na 150 μm (Williams 2003) až 500 μm (Hadgraft 2004), normální tloušťka SC je 15–20 μm .

Menší množství látek prochází cestou transcelulární, která je pro penetraci značně nevýhodná, neboť látky při ní prochází nejen přes hydrofobní intercelulární prostor, ale i skrz hydrofilní vnitřní prostředí buněk. Tato cesta je předpokládána zejména pro hydrofilní látky (Barbero 2006).

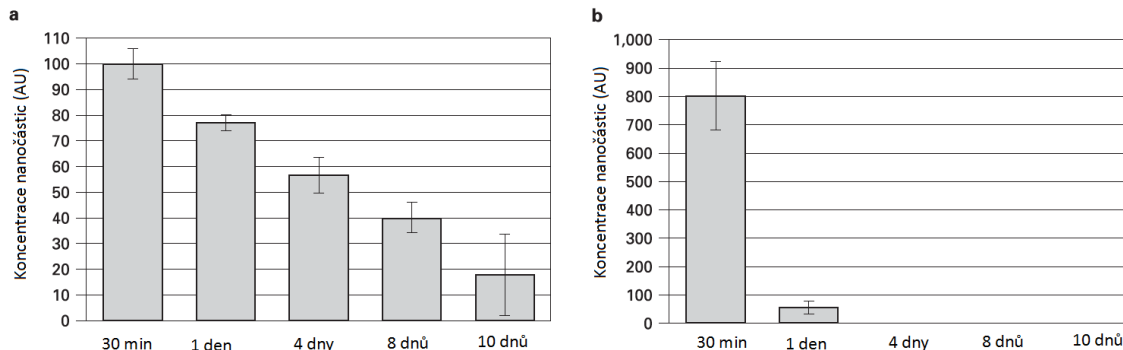
O zbývajících penetračních cestách (využívajících přítomnost kožních adnex) se tradičně soudilo, že mají pro celkovou dermální absorpci okrajový význam, což je dáno jejich malou plochou (ústí vlasových folikulů a vývody mazových potních žlázek zaujímají pouze 0,1 % povrchu lidského těla). Výjimku představovaly expozice vlasaté části hlavy a stavy spojené s hypertrichózou (Williams 2003). Nové práce (Otberg 2004, Lademann 2006, 2008) však ukazují na významný podíl této cesty při penetraci látek, zejména pro hydrofilní molekuly. Vyvinutí speciální in vitro techniky, jež umožňuje selektivní uzavření

ústí vlasových folikulů (Teichmann 2005, Trauer 2010) vedlo k potvrzení tohoto předpokladu. Např. při penetraci kofeinu autoři udávají, že 51 % kofeinu, který penetroval do epidermis, a 63,9 % kofeinu, který penetroval do dermis, použilo folikulární cestu (Trauer 2010).

Význam folikulární cesty ukazuje i studie Ogiso a kol. (Ogiso 2002). Autoři testovali průchod lipofilních (melatonin a ketoprofen) a hydrofilních (fluorouracil a acyclovir) léků přes kůži lidského skalpu a břicha. Penetrace obou typů látek byla přes kůži skalpu vyšší (u melatoninu 27x, u fluorouracilu dokonce 48x), penetrace hydrofilních léků ale vykazovala velké interindividuální rozdíly. Při histologickém vyšetření za použití fluorescence bylo vidět, že látky prochází vlasovým folikulem v oblasti spojení mezi vnitřní a zevní epitelovou pochvou.

Folikuly mají též významnou rezervoárovou kapacitu. Lademann a kol. (Lademann 2006) testovali penetraci nanočástic (Resomer® RG 50.50 H o velikosti 320 nm) a jejich skladování v SC a vlasových folikulech. Zjistili, že ve folikulech dochází k dlouhodobému skladování až desetinásobného množství látky oproti SC (Graf 1).

Graf 1. Kinetika skladování nanočástic ve vlasových folikulech a ve stratum corneum



Legenda: Kinetika skladování nanočástic ve vlasových folikulech (a) a ve stratum corneum (b);(převzato z Lademann 2006)

Nově je v poslední době k těmto základním pěti cestám přidávána cesta šestá – přes póry v lipidové dvojvrstvě extracelulárního prostoru SC. Předpokládá se, že póry vznikají díky nedostatkům ve stavbě lipidové dvojvrstvy (chybějící lipid nebo jeho jiná terciární konfigurace). Průměr lipidových molekul je asi 1 nm, póry mají velikost 1–10 nm. Prochází jimi látky o velikosti 180–70 000 Da. Předpokládá se, že slouží jako hlavní cesta pro penetraci hydrofilních látek (Mitragotri 2003). Přímé objektivní důkazy pro tuto cestu zatím nejsou, i když změny ve struktuře lipidové dvojvrstvy již nalezeny byly (Costigan

2000). Existence pórů však vychází při modelování transdermální penetrace (Kushner 2007, Notman 2008). Vznik pórů je též předpokládán při použití fyzikálních metod ke zvýšení penetrace (iontoforéza, sonoforéza).

Průnik látek kůží je považován za proces *pasivní difúze* na základě rozdílného koncentračního gradientu látky na obou stranách penetrační membrány. Tento přístup je v souladu s tzv. prvním Fickovým zákonem (viz níže, kap. 2.2.9). Transport látek přes SC je třeba počítat jako součet difúze skrz lipidy a proteiny, difúze přes lipidy je 500x pomalejší, než difúze přes proteiny (Michaels 1975).

Někteří autoři se však domnívají, že při průniku látek do organismu se vedle pasivní difúze uplatňuje do určité míry i vliv „*nasávání*“ látky, vyvolaný podtlakem vznikajícím při odvádění tkáňové tekutiny a krve ze škáry. Z tohoto důvodu byla vyvinuta varianta experimentálního testování absorpce látek na perfundovaném kousku kůže (Bowman 1991) a s uvedeným jevem souvisí též zavádění mikrodialyzačních metod testování transdermální absorpce látek (Schnetz 2001, Leveque 2004).

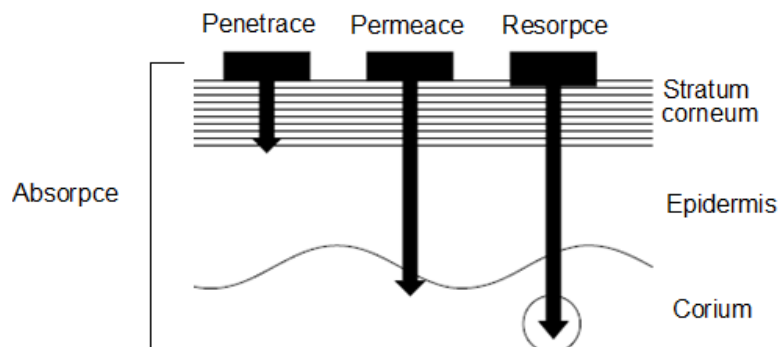
Při absorpci některých látek v kůži se ale může podílet i *aktivní transport*. Li a kol. (Li 2006) testovali absorpci flurbiprofenu a indometacinu a při RT-PCR analýze objevili v epidermis přítomnost mRNA proteinových transportérů (multidrug resistance associated protein [MRP], organic anion transporting polypeptide [OATP], monocarboxylase transporter [MCT] a organic cation/carnitine transporter [OCTN]). Aktivní transportéry byly objeveny i v dermis, např. organic anion transporter 2 (OAT 2) byl zapojen do transportu flurbiprofenu (Ito 2007), P-glycoprotein může transportovat itraconazol (Ito 2008).

Průnik chemických látek skrz kůži probíhá v několika stupních. Používané názvosloví se v označení jednotlivých stupňů liší. Diembeck a kol. (Diembeck 1999) dělí průnik chemických látek na *adsorpci* (tzn. množství látky, jež se váže v rohové vrstvě a je s jejími odlupujícími se buňkami odstraněno, nedostává se tedy do hlubších struktur kůže a tudíž ani do systémové cirkulace) a *absorpci* (tzn. množství látky, které se dostává do hlubších struktur pokožky a do škáry; díky kontaktu mezibuněčného tkáňového moku a cév se dostává dál do organismu).

Novější popis průniku látky do organismu uvádí OECD (OECD 2004a) a následně i WHO (WHO 2006). Podle těchto institucí je dermální *absorpce* globální termín, popisující celou cestu přenosu látky z vnějšího povrchu kůže do krevních nebo lymfatických cév organismu (Obr. 12). Absorpci proto dále rozdělují na *penetraci* (tj.

vstup látky do rohové vrstvy), *permeaci* (tj. přestup látky do další, strukturně odlišné vrstvy kůže) a na *resorpci* (tj. vstup látky do kožních lymfatických nebo krevních cév).

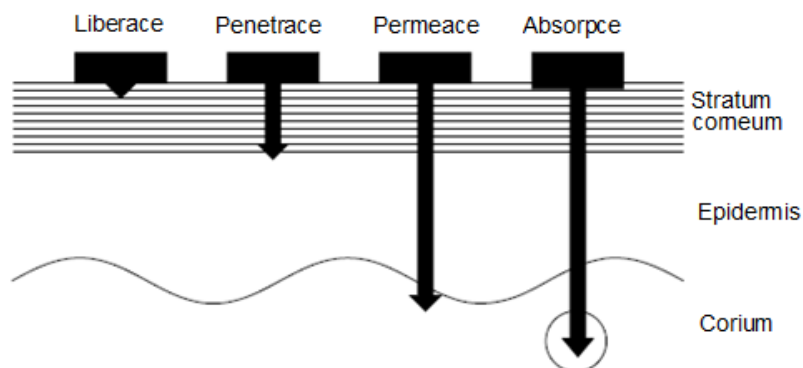
Obr. 12. Názvosloví popisující proces transdermálního přestupu látky dle WHO



Zdroj: WHO 2006

Podobné názvosloví je používáno i pro vstup léků z aplikační formy (masti, krému, gelu atd.) do kůže (Daniels 2007) – pouze termín absorpce zahrnuje to, co WHO nazývá resorpcí a je přidán termín liberace (Obr. 13).

Obr. 13. Transportní cesty léků při transdermálním podání



Zdroj: modifikováno podle Daniels 2007

Nejnovější rozdělení přenosu testované látky uvádí Selzer a kol. (Selzer 2013). Termínem *permeace* označuje množství, které prošlo přes testovací bariéru, pojem *penetrace* udává množství testované látky přítomné v kůži. Součet obojího potom nazývá *uptake* (vychytání).

Vzhledem k nejednotnosti terminologie bude v této práci použito názvosloví doporučené OECD a WHO.

Obecně lze k testování přenosu chemických látek kůži použít následující metody: 1) pokus „in vivo“ na člověku nebo zvířeti; 2) pokus „ex vivo“ na perfundované kůži; 3) pokus „in vitro“ na kůži lidské, zvířecí nebo uměle vytvořené; 4) pokus „in vitro“ na membráně (jiné než kůže); 5) modelování absorpce „in silico“

V testech na zvířatech bylo prokázáno, že absorpce látek přes kožní membránu in vitro bývá obvykle vyšší než absorpce in vivo (van Ravenzwaay 2004). Nověji provedli analýzu studií zabývajících se hodnocením in vitro a in vivo absorpce různých látek přes lidskou kůži Lehman a kol. (Lehman 2011). Hodnotili 30 publikovaných studií a po přepočtu a harmonizaci výsledků jim průměrný in vitro-in vivo poměr vyšel 0,96.

Masivní používání zvířecích modelů a odpor aktivistů za práva zvířat vedly v Evropě v roce 2003 k přijetí směrnice Evropské unie Directive 2003/15/EC (EU 2003) zakazující od března 2009 používání zvířat pro testování akutních účinků kosmetických přípravků a od března 2013 též pro testování chronické toxicity, reprodukční toxicity a toxikokinetiky kosmetických přípravků. Přesnější pravidla pro testování toxicity látek přinesla Council Regulation (EC) No 440/2008 část B, v níž jsou i základní podmínky pro provádění in vitro testů kožní absorpce (EU 2008). I díky těmto legislativním změnám se zvyšuje zájem o metody in vitro testování transdermální absorpce látek.

2.2. Testování transdermální absorpce in vitro

2.2.1 Testovaná látka

Různé chemické látky mají různou schopnost procházet skrz zdravou kůži s neporušenou kožní bariérou. Experimenty bylo zjištěno několik charakteristik, které tuto schopnost ovlivňují.

Prvou vlastností je rozpustnost látek ve vodě. Je rozdíl v penetraci hydrofobních (lipofilních) a hydrofilních látek (Mitrageotri 2003). Lipofilní látky (s rozdělovacím koeficientem oktanol/voda $K_{o/w} > 1$) přes SC prochází a mohou se v něm kumulovat, též amfililní látky prochází dobře (Förster 2009). Maximální absorpci mají látky s $K_{o/w}$ mezi 1–2, u látek s $K_{o/w} > 3,5$ se absorpce rychle snižuje (Kezic 2009). Ve vodném prostředí zbývajících vrstev epidermis, v dermis a v krevním řečišti jsou potom lipofilní látky transportovány převážně ve vazbě na hydrofilní nosič (lipoproteiny). Oproti tomu látky hydrofilní ($K_{o/w} < 1$) se skrz korneální bariéru dostávají špatně, prochází hlavně skrz póry

a shunty (vlasové folikuly, potní žlázy). V hlubších partiích kůže a v krevním řečišti jsou ale transportovány velmi snadno (Mitragotri 2003).

Další vlastností důležitou pro transdermální průnik látek je velikost molekuly, daná její molekulární hmotností (Magnusson 2004). Dobře penetrují látky o molekulární hmotnosti do 500 Daltonů (Da); (Bos 2000), tato vlastnost je v odborné literatuře dokonce označována jako „*pravidlo 500 Daltonů*“ („*500 Dalton rule*“, Todo 2010). Při poškození kůže se však mění její penetrační vlastnosti, např. přes kůži atopiků mohou pronikat velmi dobře molekuly až do velikosti 800 Da. Snížené bariérové vlastnosti mají též sliznice (zde chybí stratum corneum) a díky tomu mohou přes sliznice dobře penetrovat látky až do 1200 Da (Bos 2000).

Testovaná látka může být na kůži aplikována dvojím typem dávky. První typ dávky, tzv. „*konečná dávka*“ (*finite dose*) se používá pro studie imitující reálné použití testované látky. Dávka látky je aplikována v množství postačujícím k pokrytí kůže (obvykle 1–5 mg/cm² nebo 10 µl/cm²) a kůže je ponechána bez okluze – může tedy dojít k odpaření určitého množství aplikované látky, jako je tomu v reálném životě. Pojem finite dose se také používá v případech, kdy se na křivce v grafu absorpce objeví deplece donoru (Selzer 2013). Při druhém typu dávky, tzv. „*nekonečné dávce*“ (*infinite dose*), je testovaná látka aplikována v nadbytku (obvykle >10 mg/cm² nebo >100 µl/cm²) a může nebo nemusí být použita okluze pro eliminaci odparu (WHO 2006). Vzhledem k vysokému nadbytku látky v donorové části lze její evaporaci a difúzi do a skrz bariéru považovat za zanedbatelně malé při hodnocení celkové absorpce. Velké množství látky v donorové části může mít dokonce účinek okluze a tím zvyšovat penetraci, i když tento efekt může být i u menší vrstvy látky (Selzer 2013).

2.2.2 Rozpouštědlo

Jako rozpouštědlo může být v experimentech teoreticky použita jakákoliv chemická látka, důležité je, aby nepoškozovala kůži a kožní bariéru a testovaná látka v ní byla dobře rozpustná. Je též třeba mít na paměti, že některé látky mohou ovlivňovat průběh transdermální penetrace. Tyto látky buď penetraci zvyšují a urychlují (enhancery) nebo snižují a zpomalují (retardéry). Obě skupiny jsou nyní intenzivně studovány, enhancery zejména v souvislosti s masivním rozvojem transdermálních lékových forem (např. Vávrová 2005, Trommer 2006, Singh 2010). Retardéry se uplatňují v prevenci nežádoucích účinků látek zejména v oblasti expozic pracovních, případně i environmentálních. Tento způsob ovlivnění permeace je však studován méně než

enhancers (Benson 2005, Trommer 2006). Obě skupiny nabývají na významu v posledních několika letech v souvislosti se zvyšujícím se používáním nanomateriálů.

Test s použitím různých rozpouštědel a sledováním jejich vlivu na absorpci retinoidů provedli Lehman a kol. (Lehman 1988), kteří zkoumali in vitro absorpci retinoidů (isotretinoin, tretinoin, tretinoin, acitretin) přes opičí kůži. Největší (a shodná) absorpce byla při použití propylen glykolu a isopropylalkoholu. Absorpce se snižovala s použitím minerálního oleje, diisopropyl adipátu, polyetylen glykolu 400.

2.2.3 Absorpční membrána

„Zlatým standardem“ pro testování transdermální absorpce chemických látek in vitro je lidská kůže. Jak doporučuje jeden z leaderů výzkumu transdermální absorpce prof. Barry (Barry 1999), je-li to možné, „přednostně použít lidskou kůži a nekomplikovat si výzkum použitím zvířecí kůže k získání lidských dat“. Vzorky lidské kůže jsou získávány obvykle z tkáňové banky (může pocházet od dárců zemřelých nebo živých) nebo přímo od dárců živých, většinou pacientů při chirurgických operacích (zde je nezbytný informovaný souhlas dárce k použití kůže v experimentech). Nejčastěji je používána kůže ze zad, břicha, hrudníku nebo boku. Vzhledem k snadnějším možnostem získání kůže při kosmetických operacích to bývá nejčastěji kůže břicha nebo hrudníku. Jejich penetrační vlastnosti jsou stejné (Larsen 2003).

Transdermální absorpce chemických látek je ovlivňována věkem dárce (Waller 2005, 2006), jeho pohlavím (Jacobi 2005b), etnickou příslušností (Rawlings 2006), hydratací kůže (Warner 2003, Rawlings 2005) a místem odběru kůže (Scott 1991). Studován byl též vliv prostředí, při kterém je experiment prováděn – vliv teploty (Akomeah 2004) a pH (Waller 2005). Vliv interindividuální variability kůže provedli Akomeah a kol. (Akomeah 2007). Autoři srovnávali rozdíly v průchodu látek s různou lipofilitou (kofein, metylparaben a butylparaben) přes vzorky lidské kůže odebrané z břicha jedenácti dárců různého věku a pohlaví. Rozdíly v absorpci jednotlivých látek na témže vzorku kůže byly nižší než rozdíly v absorpci téže látky na vzorcích kůže od různých dárců.

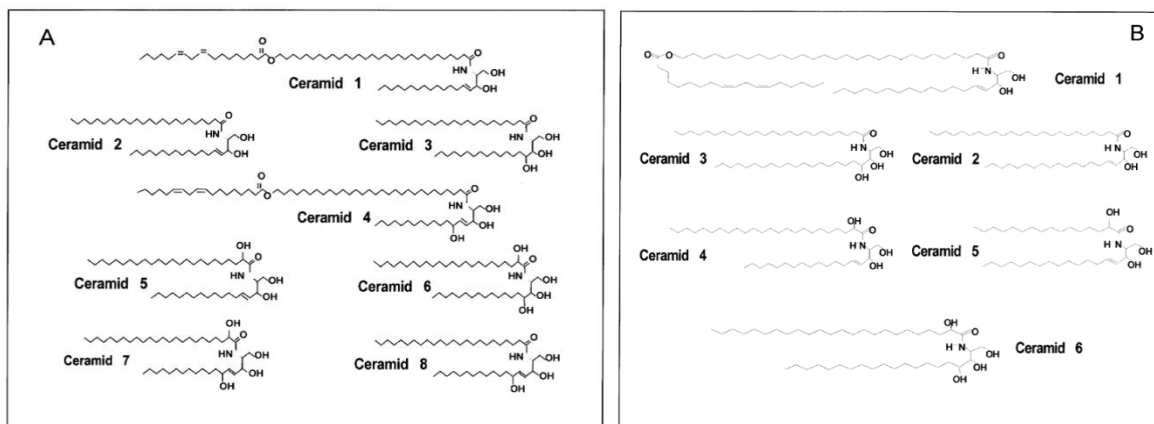
Vzhledem k etickým problémům se získáváním lidské kůže a faktu, že pro in vitro testování transdermální absorpce látek je třeba, aby tato kůže nebyla před použitím chemicky ošetřena (např. dezinfekcí při operaci), není její používání při laboratorním testování tak časté, jak by si experimentátoři přáli. Pozornost je třeba věnovat i omývání

kůže před experimentem, např. Moody (Moody 2006) referuje až o 32násobném zvýšení absorpce insekticidu u lidské excidované kůže po omytí mýdlem (tzv. wash-in effect).

Alternativou k lidské kůži je použití kůže zvířecí. Jako nejvhodnější jsou doporučovány kůže prasečí nebo opičí, které jsou lidské kůži velmi blízké svojí anatomí, fyziologií a chemickým složením. Vzhledem k horší dostupnosti a etickým problémům spojeným s využíváním primátů pro vědecké účely, se více používá kůže prasečí. Metaanalýzu článků, zabývajících se hodnocením lidské a prasečí kůže (a kůže morčete) jako vhodné náhrady za lidskou kůži, provedli Barbero a Frasch (Barbero 2009). Výsledkem bylo konstatování, že zvířecí kůže jsou vhodnou alternativou k lidské kůži, jejich propustnost je o něco vyšší, ale vykazují menší intradruhovou rozdílnost než lidská kůže.

Prasečí kůže se nejčastěji odebírá ze zad, boků, nebo břicha, velmi vhodné je i použití kůže ušního boltce (Sekkat 2002, Herkenne 2006), který je svojí anatomickou stavbou lidské kůži nejvíce podobný (Jacobi 2007). Lze použít i kůži novorozenečích selat, která je tenčí, má však více vlasových folikulů (Cilurzo 2007).

Obr. 14. Lidské a prasečí ceramidy



Legenda: Lidské (A) a prasečí (B) ceramidy. U lidských ceramidů mají CER1 a CER4 ω -hydroxy-acylový řetězec, ke kterému je chemicky vázána linolová kyselina; u prasečích ceramidů má tuto vazbu pouze CER1 (převzato z Bouwstra 2003a).

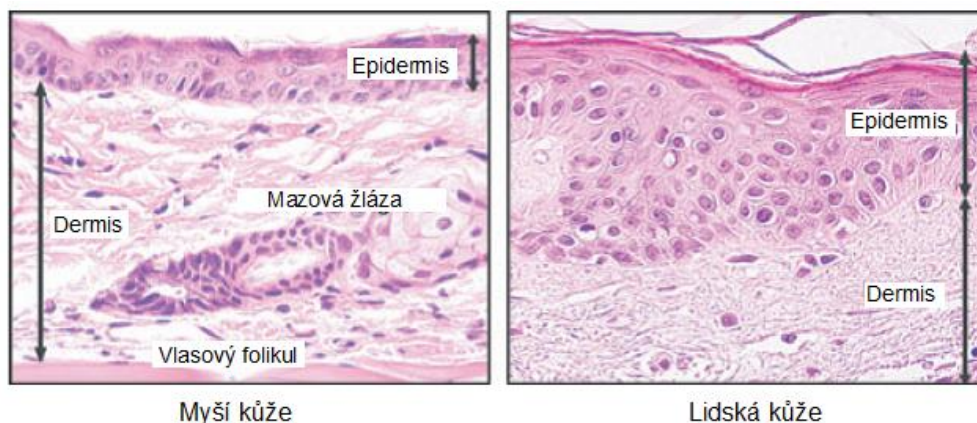
Prasečí kůže má navíc s lidskou kůží společný jeden velmi významný fakt – oba živočišné druhy (člověk a prase domácí) se v průběhu evoluce staly bezsrstými tvory. Hustý kožich zvířecí srsti působí jako významná ochrana nejen proti ztrátám tepla, ale zároveň nedovoluje kontakt většiny látek (nacházejících se v prostředí) s přímým povrchem kůže. Nepřítomnost tohoto ochranného faktoru vedla v průběhu fylogeneze k vytvoření nového ochranného systému – k tvorbě kožní bariéry tvořené buňkami stratum

corneum a specifickým složením mezibuněčné hmoty (Forslind 1998). Lipidy obsažené v této hmotě se v případě člověka a prasete velmi shodují (Obr. 14) a jsou odlišné od jiných živočišných druhů (Stahl 2009). Pro laboratorní účely byly vyvinuty různé druhy bezchlupých zvířat (např. myš, potkan, morče), ale v tomto případě bylo lysosti dosaženo genetickou manipulací, kdy stavba SC a složení korneálních extracelulárních lipidů zůstalo stejné s původním druhem a tudíž nemá zvláštnosti evolučně vytvořených lysých jedinců (Forslind 1998). Navíc např. kůže bezchlupé myši má velmi tenké a křehké stratum corneum, které je rychle destruováno hydratací (Barry 1999).

Kůže ostatních zvířat, používaných k laboratorním účelům (např. myš, potkan, morče, králík), jsou pro testování dermální absorpce méně vhodné, neboť mají anatomicky i chemicky odlišnou stavbu od kůže lidské. K hlavním rozdílům v charakteru kůže patří velké množství vlasových folikulů, vedoucích k vyšší kožní propustnosti v porovnání s kůží lidskou, např. u potkaní kůže ve srovnání s kůží lidskou van Ravenzwaay (van Ravenzwaay 2004) uvádí více než desetkrát vyšší propustnost, Takeuchi (Takeuchi 2011) uvádí propustnost potkaní kůže dvakrát vyšší než u lidské kůže. Úroveň dermální propustnosti klesá v pořadí králík, potkan, prase a člověk (Bartek 1972).

Rozdíly mezi myší a lidskou kůží popisují Brohem a kol. (Brohem 2010). Myši jsou často používány jako model lidské kůže, mají však ve stavbě kůže hodně odlišností (Obr. 15).

Obr. 15. Histologický preparát myší a lidské kůže



Zdroj: modifikováno z Brohem 2010

Hlavní rozdíly mezi lidskou a myší kůží jsou následující:

1) Myši mají hustou srst, u lidí jsou regiony mezi jednotlivými folikuly mnohem větší.

2) Lidská stejně jako myší epidermis je tvořena stejnými vrstvami (stratum corneum, granulosum, spinosum, basale), avšak počet buněk v jednotlivých vrstvách se zásadně liší. Myší epidermis má obvykle tři vrstvy buněk a jejich obrat je rychlejší. Lidská epidermis má obvykle 6–10 vrstev, obrat trvá 7–28 dnů.

3) Melanocyty v lidské kůži jsou umístěny rovnoměrně v bazální vrstvě, u myší jsou v dermis ve vlasových folikulech.

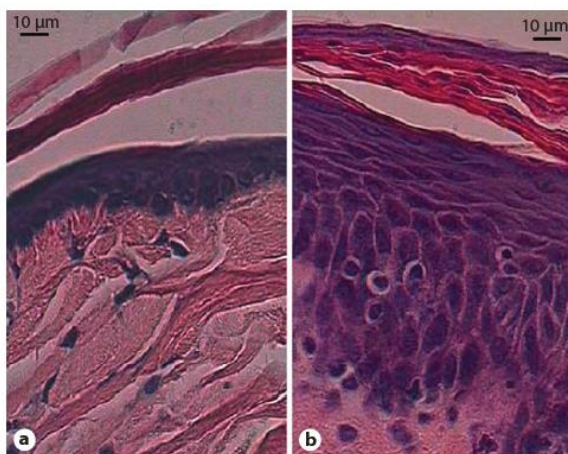
4) Myši mají kožní svalovou vrstvu (panniculus carnosus), která u lidí není.

5) Hojení kožních defektů u myší vede k regeneraci tkáně, u lidí se hojí jizvou (někdy keloidní, což u myší není).

6) Myší kůže má menší bariéru pro vodu a vykazuje vyšší dermální absorpci.

Králičí kůže má podobnou tloušťku jako prasečí kůže (Obr. 16), i když epidermis pod SC má odlišnou strukturu, zejména počet vrstev epidermálních buněk je nižší. Lipidové složení králičí kůže je podobné prasečí kůži, ale má menší obsah ceramidů a vyšší obsah esterů cholesterolu a triglyceridů. Králičí ucho je 4–7x méně propustné pro hydrofilní látky, možná díky vyšší lipofilicitě jejího SC. Permeabilita progesteronu byla mezi izolovanou prasečí epidermis a králičí kůží srovnatelná (Nicoli 2008).

Obr. 16. Kůže králičího a prasečího ucha



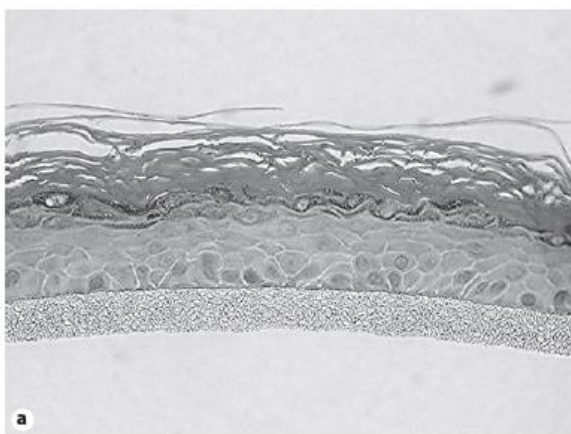
Legenda: Fotografie histologického řezu kůže vnitřní strany králičího ucha (a) a zevní strany prasečího ucha (b). Zvětšeno 40x (převzato z Nicoli 2008).

K testování absorpce látek byla použita i rybí kůže (Konradsdottir 2009), autoři ji doporučují jako vhodný model sliznice nebo skléry.

Další alternativou ke kůži přirozené je použití kůže uměle vytvořené. Může jít o modely samotného stratum corneum (de Jager 2006), 2D modely (keratinocyty kultivovány v jedné vrstvě, je zde možná diferenciací jednotlivých vrstev) nebo

3D modely (keratinocyty jsou pěstovány na dermálním podkladu, což umožňuje lepší diferenciaci epidermálních buněk a vede k vyšší životnosti těchto modelů). Jedná se například o komerčně vyráběné modely EpiSkin, SkinEthic, EpiDerm (Obr. 17), Human Skin Equivalent (HSE), Apligraf (Schmook 2001, Lotte 2002, Ponec 2002b, Batheja 2009). V literatuře jsou popisovány i další modely, zatím jen experimentálně vyrobené, ale s lepší strukturou (Stark 2006).

Obr. 17. Histologický řez rekonstituovanou kůží – model EpiDerm 606X



Zdroj: Trauer 2010

Bohužel umělá kůže zatím stále ještě nedosahuje vlastností a funkce kůže přirozené. Největším nedostatkem je nepřítomnost kožních adnex a nepřítomnost deskvamace povrchových vrstev SC, což vede k jejímu ztluštění a zkreslení výsledků při případném použití v testech transdermální absorpce látek (Ponec 2002a). Problémem je též začlenění dalších buněk, které se v normální epidermis nalézají, jako jsou melanocyty a Langerhansovy buňky. Existují modely, kdy se tyto buňky podařilo do struktury dostat, jejich funkce je však zatím přítomna jen částečně (Facy 2004, Brohem 2010). Z tohoto důvodu není rekonstruovaná kůže doporučována pro závěrečné testování látek pro humánní nebo veterinární použití (Netzlaff 2007). Je jí však možno použít k dílčímu testování, zejména k testům dermální iritace, korozivnosti, fototoxicity a genotoxicity (Welss 2004, Netzlaff 2005, 2007, Kand'árová 2006, OECD 2010, 2013b). Je možné ji použít i na testy metabolismu kůže (Brinkmann 2013).

Lidskou nebo zvířecí kůži je možno použít v plné tloušťce 500–1000 μm . Takovéto vzorky kůže obsahují rohovou vrstvu a zbývající vrstvy epidermis a dermis. Lze též použít tzv. dermatomovanou kůži, která je dermatomem seříznuta na tloušťku 200–500 μm

a obsahuje rohovou vrstvu, zbývající vrstvy pokožky a pouze horní část škáry. Další variantou je použití pouze epidermis, která je oddělena tepelně, chemicky nebo enzymaticky a má (nebo nemá) zachovalou bazální membránu (Akomeah 2007, Cross 2008). Poslední variantou je použití samotné rohové vrstvy, která se připravuje z pokožky po natrávení trypsinem (WHO 2006, Henning 2008). Pro testování lipofilních látek je doporučováno použití dermatomované kůže nebo samotné pokožky, neboť hydrofilní škára v případě lipofilních látek představuje další bariéru průniku. Je též třeba vždy myslet na to, že při použití tenčí kožní membrány bude absorpce látky vyšší a při použití silnější membrány bude tato sloužit jako významnější rezervoár absorbované látky (Wilkinson 2006).

Pro testování je optimální použití kůže čerstvé (doporučeno do dvou dnů po odběru). Tato kůže má aktivní enzymatický systém (pomineme-li skutečnost, že k částečné autolýze dochází již od okamžiku odběru), a proto je možné ji použít nejen pro testování průniku látek kůží, ale i pro testování jejich dermálního metabolismu (OECD 2004a). Životnost kožního vzorku měřená jeho metabolickou aktivitou (úroveň přeměny glukózy na laktát), klesá s dobou skladování. Při skladování v chladu klesne během prvního dne přeměna zhruba na polovinu a do osmého dne zůstává přibližně stejná. Po osmém dni pokles aktivity pokračuje (Wester 1998). Čerstvou kůží lze při teplotě 4 °C skladovat po dobu 2–4 týdnů (DeBono 1998).

Další možností je použití zmrazené kůže (Diembeck 1999). Vzorky odebrané kůže se po ošetření zmrazí při –18 až –20 °C, lze použít i teplotu nižší (EU-SCCP 2006). Zmrazená kůže nemá zachovaný aktivní enzymatický systém a je mírně anatomicky poškozena krystalizací vody (téměř bezvodá rohová vrstva je ale poškozena minimálně). Při srovnání s čerstvou kůží vykazuje vyšší úroveň ustáleného průtoku testované látky (steady state flux) a je zde i kratší doba do začátku pronikání testované látky do receptorové tekutiny (lag time); (Ahlstrom 2007). Nicméně pro testování průniku látek je tato kůže oficiálně doporučována a vzhledem k dlouhodobé použitelnosti (dle různých autorů je ji možno použít v době do jednoho roku skladování) je v pokusech využívána nejčastěji (WHO 2006). Při interpretaci výsledků je však nutno brát v úvahu skutečnost, že se zvyšující se dobou skladování zmrazené kůže se zvyšuje její propustnost (Ahlstrom 2007), proto někteří autoři doporučují používat kůží zmrazenou kratší dobu, např. Davies (Davies 2004) doporučuje používat prasečí kůží do dvou měsíců a lidskou do jednoho roku od zmrazení. Někteří autoři naopak používají i kůží skladovanou delší dobu, např. lidskou po dobu do dvou let (Meidan 2008).

Srovnání vlastností čerstvé lidské kůže a kůže skladované při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu tří týdnů provedli Nielsen a kol. (Nielsen 2011). Autoři sledovali penetraci kofeinu přes tyto membrány a hledali změny kůže pomocí konfokálního fluorescenčního mikroskopu. Výsledky penetrace u čerstvé kůže a kůže skladované při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ byly obdobné (u zmrazené kůže byla penetrace o něco málo vyšší). Kůže skladovaná při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ vykazovala několikrát vyšší penetraci. Tyto výsledky byly v souladu s mikroskopickým vyšetřením, které prokázalo mnohem vyšší poškození kůže skladované při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (korneocyty i keratinocyty byly větší, byl nápadný otok buněk a odchylky v normální distribuci keratinocytů. Zatímco tloušťka SC u čerstvé kůže činila $6\text{ }\mu\text{m}$, u kůže skladované při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ to bylo $12\text{ }\mu\text{m}$ a u kůže skladované při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ dokonce $35\text{ }\mu\text{m}$).

Jinou možností, popisovanou v literatuře, je použití kůže skladované po usušení. Takto ošetřená kůže je méně anatomicky poškozena než při zmrazení. Před použitím je ji však třeba opětovně hydratovat. Sušená kůže bývá k testování používána výjimečně (Swarbrick 1982).

Kůže určená k odběru nesmí být viditelně poškozena a nesmí být tetována. Povrchové čištění se provádí pouze omytím teplou vodou a mýdlem bez použití dezinfekčních prostředků, což představuje určitý problém při operativním získávání lidské kůže. V případě použití prasečí kůže nesmí být tato při porážce na jatkách spařena. Na odebrané kůži je nutno ostříhat všechny viditelné chlupy a odstranit podkoží. Zůstává zhruba jeden milimetr silná vrstva pokožky a škáry. Z ní je potom možno připravit jiné typy kožní penetrační membrány (dermatomovanou kůži, samotnou pokožku nebo rohovou vrstvu). Vzorčky se jednotlivě zabalí do hliníkové folie a uchovávají se v chladničce nebo se zamrazí (Diembeck 1999).

2.2.4 Testování integrity kůže

Neporušenost penetrační membrány je důležitou podmínkou úspěšného provedení testu transdermální absorpce látek a proto by jí měla být věnována velká pozornost. I malé poškození integrity membrány významně zvyšuje perkutánní absorpci (Nielsen 2007). Testování integrity kůže může být provedeno třemi způsoby (OECD 2004c):

a) před zahájením testování transdermální penetrace

Nejdůležitější metodou kontroly před začátkem provádění testů transdermální penetrace je důkladná vizuální kontrola, někteří autoři k ní doporučují použít lupu (Henning 2008), jiní používají mikroskop (Frasch 2009). Je třeba vyřadit veškeré vzorčky, na nichž se nachází i sebemenší poškození (zánětlivé projevy, oděrky, škrábance, stroupky,

jizvy, tetování, začervenání nejasného původu). Někteří autoři používají i pohled skrz kůži proti světlu (Nangia 1998). Vhodnou metodou je též sledování vlhkosti kůže po počáteční aklimatizaci v difúzní komůrce. Ackermann a kol. (Ackermann 2010) doporučují vyřadit vzorky, u nichž je po 30minutové ekvilibraci přítomna vlhkost na povrchu kůže. Normální neporušená kůže je po této době na povrchu mírně oschlá.

Druhou možností je provedení testu elektrické rezistence kůže (transcutaneous electrical resistance, TER). Kožní odpor souvisí se stavem kožní bariéry, při poškození bariéry se odpor snižuje. Je též závislý na ploše (se zvyšující se plochou se elektrický odpor snižuje); (Fasano 2002), proto je vhodnější udávat jeho hodnoty v přepočtu na jednotku absorpční plochy ($\text{k}\Omega\text{cm}^2$). K měření se používají přístroje pracující s frekvencí 50–1000 Hz, používající napětí 1–3 V a měřící v rozmezí 0,1–30 $\text{k}\Omega$ (OECD 2004d). Doporučení limitních hodnot pro in vitro měření TER se v literatuře hodně liší. Např. Davies a kol. (Davies 2004) po změření TER kůže člověka, potkana, prasete, myši, králíka a morčete (při frekvenci 100 Hz) doporučují v případě použití plné prasečí kůže používat k testování vzorky s rezistencí rovnou nebo vyšší $1,57 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$. Stejná hodnota byla použita jako hraniční pro vyřazení nevhodných vzorků v námi prováděných experimentech. Baert (Baert 2010) při použití lidské kůže vyřazoval vzorky s impedancí nižší než 20 $\text{k}\Omega$. Další odlišná kritéria jsou doporučována v publikaci White a kol. (White 2011), kde autoři uvádí přehled doporučovaných testových kritérií pro plnou lidskou kůži v rozmezí 7–45 $\text{k}\Omega\text{cm}^2$.

Třetí doporučovanou možností je hodnocení ztráty vody kůží (transepidermal water loss, TEWL). Voda odpařující se z povrchu kůže je dvojího původu. První část tvoří voda odpařující se z potu – produktu malých potních (ekrinních) žláz. Druhou část tvoří voda procházející skrz kůži mezibuněčnými prostory. Spodní partie epidermis (stratum basale, spinosum, granulosum) jsou velmi hydratované (obsah vody 75 %), bariéru průchodu tekutin tvoří málo hydratované SC (obsah vody je pouze 10–20 %); (Zhai 2002). U živých organismů je jako „*perspiratio insensibilis*“ označováno nepozorovatelné odpařování tekutin z kůže, pojem „*perspiratio sensibilis*“ označuje vnímatelné odpařování vody, pocení (Kábrt 1988). Striktně vzato by TEWL měl referovat pouze o části „*perspiratio insensibilis*“ – odpařování tekutiny skrz mezibuněčné prostory, informující o stavu korneální bariéry, v praxi však nelze odlišit jeho druhou část, danou činností potních žlázek za podmínek pod teplotním potním prahem. Proto hodnoty TEWL v praxi zahrnují obě tyto složky. Denně se z povrchu kůže za normálních podmínek odpaří asi 0,3 l vody, v teplém prostředí nebo při vysoké fyzické námaze se však pocení zvyšuje a ztráty tekutiny mohou dosáhnout až čtyři litry. Ztráty tekutin kůží se též zvyšují při poškození kožní

bariéry, jak je dobře známo z léčby popálenin. Měření TEWL in vivo je v dermatologii a kosmetologii dlouhodobě používáno k neinvazivnímu monitorování změn bariérové funkce SC při výskytu různých onemocnění (např. u atopického ekzému, lupénky). Nepoškozená kůže s plně funkční bariérou SC má nižší hodnoty TEWL, než kůže s poškozenou korneální bariérou (Simonsen 2007). Velikost TEWL závisí též na velikosti (ploše) korneocytů – tam, kde jsou „malé“ korneocyty (např. na čele) je TEWL vysoký a naopak tam, kde jsou korneocyty „velké“ (např. na břichu) je TEWL malý (Machado 2010).

Ztráty tekutiny kůží lze měřit pomocí dvou typů přístrojů. První typ používá uzavřený systém měřící komůrky (tvoří ji válec otevřený pouze na jedné straně, dno/strop je pevné, vodní pára se v prostoru komůrky kondenzuje). Přístroje s uzavřenou komůrkou jsou např. VapoMeter (Delfin Technologies, Finsko), AquaFlux (BioSystems, Velká Británie). Druhý typ používá otevřený systém (komůrku tvoří pouze stěny válce, je otevřená z obou stran). Přístroje s otevřenou komůrkou jsou např. Tewameter a novější MPA (Courage-Khazaka, Německo), Evaporimeter (EPI Servomed, Švédsko), DermaLab (Cortex Technology, Nadsune, Dánsko). Normální TEWL zdravé lidské kůže se při měřeních in vivo a in vitro příliš neliší a pohybuje se zhruba mezi 2–10 g/m²/h (Sekkat 2004, Raney 2006, Simonsen 2007). U prasečí kůže in vitro se normální TEWL pohybuje v rozmezí 2–30 g/m²/h (Vallet 2008, Elkeeb 2010), u prasečího ucha Simonsen (Simonsen 2007) uvádí 3,5±1,2 g/m²/h, Elmahjoubi (Elmahjoubi 2009) 30,21±1,27 g/m²/h. Vliv na rozdílnost naměřených hodnot má typ přístroje, v případě použití uzavřené měřící komůrky bývá díky kondenzaci výsledná hodnota ztráty tekutin vyšší (Elkeeb 2010).

Je zde však nutno poznamenat, že i když většina publikovaných prací a metodik tento způsob ověření integrity kůže doporučuje a považuje za vhodný, najdou se též práce, které vhodnost této metody zpochybňují, neboť v případě plochou nevelkého poškození kůže (propíchnutí) nenalezli rozdíl v hodnotě TEWL, i když absorpce přes takto poškozenou kůži je výrazně vyšší (Chilcott 2002, Netzlaff 2006, Henning 2008).

Čtvrtou možností je zkouška průchodu jiné (než testované) látky před zahájením testu transdermální absorpce. Jako referenční látka se k tomuto účelu používá např. tritiovaná voda nebo metylenová modř. Nejprve se provede test transdermální absorpce referenční látky a následný test s testovanou látkou se provádí již jen na vzorcích, u nichž byla absorpce referenční látky v přijatelných hodnotách. Tato metoda je však zdlouhavá a může při ní docházet k poškození kožní bariéry při průchodu referenční látky. Použití tritiované vody k potvrzení kožní integrity též není vhodné, pokud je testovaná látka také

radiačně značena. Další nevýhodou je nutnost speciálního přístrojového vybavení při použití radioaktivně značené referenční látky (OECD 2004a).

b) v průběhu testu transdermální penetrace

K testované látce lze přidat další látku se známou a od testované látky dobře odlišitelnou absorpcí, např. radioaktivně značené látky (^3H sukrozu, látky se ^{14}C). Pro praktické použití je však tato metoda nevýhodná, neboť je pracná a vzhledem k použití další látky než pouze testované, může dojít ke zkreslení absorpce testované látky (OECD 2004a).

c) po ukončení testu transdermální penetrace

Lze použít kterýkoliv ze způsobů popsaných v odstavci a). Jejich použití po testu se však příliš nedoporučuje, neboť během testování transdermální penetrace vždy dochází k poškození kožní bariéry (vliv testované látky, vliv času) a takto získaný výsledek již nehovoří pouze o stavu membrány před zahájením testu.

Velmi důležitou metodou hodnocení ex post je vyřazení všech vzorků, jež se výrazně odlišují od průměru ostatních vzorků, neboť přes poškozenou kůži prochází testovaná látka vždy rychleji a v mnohem větším množství, než přes kůži nepoškozenou (OECD 2004a).

Různí autoři mají na výše popsané metody hodnocení integrity kůže různé názory, avšak všichni se shodují na důkladné vizuální kontrole a ex post vyřazení výrazně odlišných vzorků.

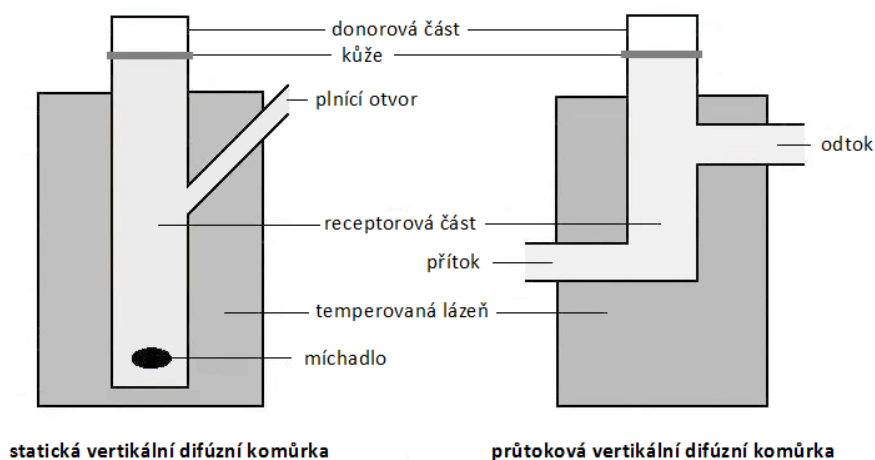
2.2.5 Difúzní komůrky

Základním laboratorním zařízením pro testování transdermální absorpce chemických látek in vitro jsou difúzní komůrky. Při konstrukci testovacích komůrek se používají oba směry penetrace – horizontální (komůrky jsou označovány side-by-side) a vertikální. V praxi jednoznačně převažuje využití směru vertikálního.

Komůrky jsou zhotovovány z inertních materiálů (borosilikátové laboratorní sklo, teflon) a skládají se ze dvou částí. Horní část je označována jako část „donorová“, spodní jako část „receptorová“ nebo „akceptorová“. Absorpční membrána (kůže) se upevňuje mezi tyto dvě části, pokožkou směrem nahoru. Na tuto stranu kůže se potom aplikuje známé množství testované látky. Velikost penetrační plochy bývá u komůrek používaných v publikovaných pracích různá (obvykle 0,3–5 cm², OECD 2004a). Směrnice Evropské komise (EU-SCCP 2006) požaduje minimální velikost absorpční plochy 0,64 cm². Též objem akceptorové části bývá různý, OECD udává 2–20 ml (OECD 2004a). Tento objem

je důležitý z důvodu zachování „*sink conditions*“ – pro správnou absorpci látky je třeba zajistit, aby průnik látky skrz membránu nebyl ovlivněn parametry solubility. Toho je dosaženo tím, že koncentrace testované látky v receptorové části nepřekročí 10 % její možné maximální rozpustnosti (Selzer 2013), i když některé dokumenty udávají 10–20 % (Siewert 1997) nebo dokonce 30 % (USP 1995). Kromě objemu akceptorové části komůrky jsou „*sink conditions*“ ovlivněny též frekvencí odběru RT (v případě statické komůrky), nebo rychlostí průtoku RT v případě průtokové komůrky.

Obr. 18. Statická a průtoková vertikální difúzní komůrka



Zdroj: vlastní nákres

Vertikální komůrky se dělí na dva základní typy (Obr. 18), ze kterých byla odvozena řada modifikací. Prvním typem je široce využívaná, relativně jednoduchá *statická vertikální difúzní komůrka*, po svém autorovi zvaná *Franzova komůrka/cela* (Franz 1975). Tekutina v receptorové části (obvykle o objemu 2–20 ml) musí být u tohoto typu komůrky neustále míchána a je periodicky manuálně odstraňována a analyzována.

Druhým typem je *průtoková vertikální difúzní komůrka* publikovaná Bronaughem (Bronaugh 1985). Tekutina je z receptorové části komůrky (obvykle o objemu 0,1–5 ml) odstraňována kontinuálně pomocí peristaltické pumpy (typický průtok činí 9 ml/h u komůrky o objemu 3 ml, tj. tři výměny za hodinu, nebo 1,5 ml/h u komůrky o objemu 150–300 μ l, tj. 5–10 výměn za hodinu); (OECD 2004a). Tento typ je doporučován jako vhodnější pro studium metabolismu látek v kůži. Nevýhodou je jeho vyšší přístrojová náročnost.

I přes rozdílnost v konstrukci komůrek nenalezly srovnávací studie, které porovnávaly testování na obou typech, významné rozdíly ve výsledcích (Clowes 1994, Chilcott 2005).

2.2.6 Receptorová tekutina

Spodní část nádoby (receptorová/akceptorová část komůrky) je naplněna receptorovou/akceptorovou tekutinou. Tato tekutina nesmí poškozovat kůži a musí odpovídat chemickému charakteru testované látky (WHO 2006). Při testování absorpce hydrofilních látek skrz kůži skladovanou zmražením se jako receptorová tekutina používají roztoky solí nebo pufované roztoky solí s pH okolo 7,4 (např. fyziologický roztok, PBS pufr). Při testování absorpce lipofilních látek bývá vhodné přidat k uvedeným roztokům ještě sérový albumin (Cross 2003) nebo použít organická rozpouštědla nepoškozující membránu (etanol : voda 1 : 1, 6% polyethylenglycol, 20% oleyl ether ve vodě). Při paralelním testování dermální absorpce a dermálního metabolismu (na čerstvé kůži) se jako receptorová tekutina používají média pro pěstování tkáňových kultur např. MEM (Eagle's minimal essential medium), HHBSS (Hepes-buffered Hanks' balanced salt solution); (OECD 2004a) a DMPBS (Dulbecco modified phosphate-buffered saline); (Collier 1989).

2.2.7 Postup provádění testu transdermální absorpce

Absorpční membrána (kůže) leží celou svojí spodní plochou na hladině receptorové tekutiny (nesmí zde být bublinky vzduchu; ty, které mohou vznikat v průběhu delší doby penetrace, je třeba průběžně odstraňovat). Někteří autoři (Wagner 2000) upozorňují v této souvislosti na jistá rizika, spojená s použitím kapaliny v receptorové části komůrky. Ta spočívají ve zvýšené hydrataci kůže, jež má za následek její zvýšenou propustnost. Uvedení autoři proto doporučují kůži položit na vrstvu svého papíru, napuštěného vhodnou receptorovou tekutinou. Tento tzv. „saarbrückenský“ model je však využíván jen omezeně (Wagner 2003).

V průběhu absorpce látky přes kůži upevněnou v difúzní komůrce musí být tekutina v receptorové části komůrky po celou dobu pokusu míchána (statická komůrka) nebo průběžně vyměňována (průtoková komůrka). Množství testované látky, prošlé do receptorové tekutiny před její výměnou, by mělo být z důvodu potlačení zpětné resorpce menší než 10 % koncentrace maximální rozpustnosti testované látky v receptorové tekutině (tzv. „sink conditions“). Tomu se přizpůsobují časy odběru receptorové tekutiny pro

analýzu (u statické komůrky), nebo rychlost průtoku receptorové tekutiny (u průtokové komůrky).

Na povrchu kůže v difúzní komůrce je nutno udržovat teplotu 32 ± 1 °C (průměrná normální teplota povrchu kůže člověka). Vlhkost okolního prostředí by se měla pohybovat v rozmezí 30–70 % (OECD 2004a).

Doba trvání pokusu bývá různá. Pro základní experimentální testování absorpce chemických látek je doporučována doba 24 hodin. Akceptovatelná může být i doba delší, nicméně v tomto případě již mohou nastat obtíže se zachováním integrity kůže. Pro testování látek určených k reálnému použití by doba testování měla imitovat dobu předpokládaného použití (OECD 2004c). Vzhledem k tomu, že tzv. pseudo-steady state flux (dalo by se přeložit jako nepravý ustálený průtok) nastává průměrně po době odpovídající 2,7násobku doby lag time, je doporučováno, aby doba trvání pokusu byla delší, než je tato doba (Williams 2003).

Při provádění testů transdermální penetrace bylo zjištěno, že výsledky vykazují poměrně značnou variabilitu, interindividuální rozdíly (mezi jedinci téhož živočišného druhu) dosahovaly 40 % a intraindividuální rozdíly (získané na různých částech těla téhož jedince) pak 30 % (Williams 2003). Vzhledem k tomu je vhodné použít v experimentu kůži od více dárců. Striktní požadavek na počet komůrek použitých v experimentu není. Nejnižší doporučení dává OECD (OECD 2004c) – jako minimum jsou požadovány alespoň čtyři vzorky (blíže nespecifikované). EU-SCCNFP (EU-SCCNFP 2003) doporučuje minimálně šest vzorků kůže odebrané ze stejného místa od tří různých dárců. Novější doporučení, týkající se testování kosmetických přípravků a pesticidů, zvyšují minimální počet použitých difúzních komůrek na osm, použita má být kůže nejméně od čtyř dárců (EU-SCCS 2010, EFSA 2012).

2.2.8 Laboratorní zpracování výsledků

Množství látky, která se zúčastnila absorpce, lze hodnotit neinvazivně nebo invazivně.

Neinvazivní metody začínají být používány v poslední době, jejich nevýhodou je drahé přístrojové vybavení. Ke stanovení látek v kůži se nejčastěji používají konfokální laserová skenovací mikroskopie (CLSM) nebo konfokální Ramanova spektroskopie – obě se ale nedostanou do hlubších vrstev kůže. To se dá řešit zmražením kůže a jejím rozřezáním na paralelní plátky, které se pak vyšetřují postupně (Selzer 2013).

Při invazivním měření se hodnotí oblasti, do kterých se absorbovaná látka mohla dostat. Po ukončení pokusu se testovaná látka může nacházet v několika absorpčně odlišných oddílech: na povrchu kůže, v rohové vrstvě, ve zbývajících vrstvách pokožky, ve škáře a v receptorové tekutině. Rozsah analýz uvedených kompartmentů je dán požadavky experimentu. Nejjednodušší varianta zahrnuje analýzu pouze samotné receptorové tekutiny. Dále je možno analyzovat jednotlivé vrstvy kůže na obsah absorbované látky (tzv. „total recovery“). Množství látky adsorbované v rohové vrstvě se zjišťuje pomocí tzv. „stripování“ – jednotlivé vrstvy korneocytů se odtrhávají z povrchu pokožky pomocí nalepené adhezivní pásky (většinou se provádí 20 stržení). Páska s přilepenými korneocyty je následně analyzována. Analyzována je též zbývající pokožka a škára. Pokožka se od škáry odděluje tepelně, chemicky nebo enzymaticky (WHO 2006).

Instrumentální analýza jednotlivých vzorků je prováděna většinou pomocí chromatografie, radiografie nebo scintigrafie (při použití značených testovaných látek). O typu analýzy rozhoduje charakter sledované látky a možnosti daného pracoviště (OECD 2004a).

Při stanovení celkového profilu absorpce testované látky („total recovery“) je nutno z analyzovaných vzorků (povrch kůže, jednotlivé části kůže, receptorová tekutina) získat dle OECD $100 \pm 10 \%$ (OECD 2004c), dle SCCNFP $100 \pm 15 \%$ aplikované dávky (EU-SCCNFP 2003).

2.2.9 Matematické hodnocení absorpce

K hodnocení a matematickému popisu (a modelování) procesu dermální absorpce je používáno několik veličin (Förster 2009):

Rozdělovací koeficient (Partition coefficient)

Rozdělení (partition) je termín používaný k popisu distribuce látky mezi dvě fáze za rovnovážného stavu. Při aplikaci látky na kůži dochází k jejímu rozdělení mezi rozpouštědlo donorové fáze a kůži. Toto rozdělení je popisováno pomocí rozdělovacího koeficientu K_m :

$$K_m = \frac{C_{\text{penetrant v SC}}}{C_{\text{penetrant v donorové fázi}}} \quad (2.1)$$

Kde $C_{\text{penetrant}}$ představuje rovnovážné koncentrace penetrující látky v donorové fázi a ve stratum corneum. Z této rovnice vyplývá, že hodnota K_m je vyšší, když penetrující látka má

vyšší afinitu k SC než ke svému rozpouštědлу. Lipofilní látky mají velkou afinitu k SC, a tudíž mají tendenci se kumulovat v SC.

K posouzení lipofility je ve farmacii používán rozdělovací koeficient oktanol/voda (resp. jeho logaritmus $\log K_{o/w}$) popisující rozdělení látky mezi 1-oktanol a vodu. Hodnota parametru $K_{o/w}$ je experimentálně snadno dostupná je zvykem jí aproximovat hodnotu parametru K_m .

Koeficient permeability (Permeability coefficient)

Permeace látky membránou není ovlivňována jen její rozpustností v membráně, ale i její schopností touto membránou difundovat. Parametry charakterizující oba uvažované děje, tj. rozdělovací koeficient K_m , a difuzní koeficient D , jsou kombinovány v koeficientu permeability P :

$$P = \frac{K_{o/w} D}{L} \quad (2.2)$$

kde L je délka difuzní dráhy. Hodnotu tohoto parametru obvykle nelze zjistit experimentálně, za délku difúzní dráhy se potom dosazuje tloušťka kůže, což může být zavádějící, zejména při intercelulární cestě penetrující látky.

Byl nalezen vztah mezi dvěma měřitelnými parametry: $K_{o/w}$ a relativní molekulární hmotností MW . Mezi prvními autory byli Potts a Guy (Potts 1992), jejich rovnice je používána nejčastěji:

$$\log P = -2,72 \times 71 \times \log K_{ow} - 0,0061 MW \quad (2.3)$$

Tento odhad je znám jako quantitative structure-permeability relationship (QSPR) a bývá používán při modelovém výpočtu absorpce testované látky.

Fickův zákon difúze

Jednoduchým způsobem modelování kožního transportu je považovat kůži za jednoduchou membránu, přes kterou látka prochází. Tuto difúzi popisuje první Fickův zákon:

$$J = -D \frac{\delta C}{\delta x} \quad (2.4)$$

Tento zákon říká, že flux J (množství/m²/s), který je dán transferem látky přes jednotku plochy za jednotku času dané pozici x , je proporcionální s diferenciální změnou

koncentrace δC přes diferenciální vzdálenost δx . Negativní znaménko ukazuje, že molekuly penetrantu se pohybují ve směru klesající koncentrace. Konstantou úměrnosti je zde difúzní koeficient D .

K popisu koncentrace uvnitř membrány je Fickův první zákon kombinován s diferenciální látkovou bilancí v membráně za určitých předpokladů – látka není metabolizována, neváže se v membráně a její difúzní koeficient se nemění. Výsledek je nazýván druhý Fickův zákon:

$$\frac{\delta C}{\delta t} = D \frac{\delta^2 C}{\delta x^2} \quad (2.5)$$

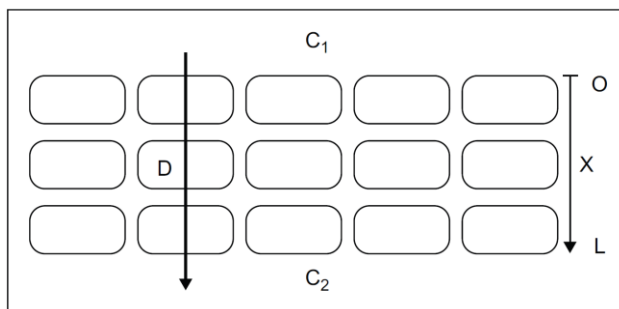
Jednotlivé vrstvy kůže mohou být považovány za pseudohomogenní membrány a proto první Fickův zákon může být použit k popisu difúze těmito vrstvami.

Flux v ustáleném stavu je dán rovnicí:

$$J_{ss} = \frac{D (C_1 - C_2)}{L} \quad (2.6)$$

kde L je délka difúzní dráhy (tloušťka vrstvy), C_1 a C_2 jsou koncentrace látky v membráně na jejích dvou stranách (v $x=0$ a $x=L$) a D je difúzní koeficient (Obr. 19).

Obr. 19. Schéma variability proměnných ve vztahu k vrstvám kůže



Zdroj: Förster 2009

„Sink conditions“ znamená, že koncentrace v $x=L$ je nula nebo velmi malá ($C_2=0$). Dále koncentrace penetrantu v $x=0$ je v lokální rovnováze s koncentrací penetrantu v donorové fázi ($C_1 = K_m C_f$), kde K_m je rozdělovací koeficient definovaný rovnicí 2.1 a C_f je koncentrace v donorové fázi. Za těchto podmínek platí, že flux za ustáleného stavu a „sink conditions“ se rovná:

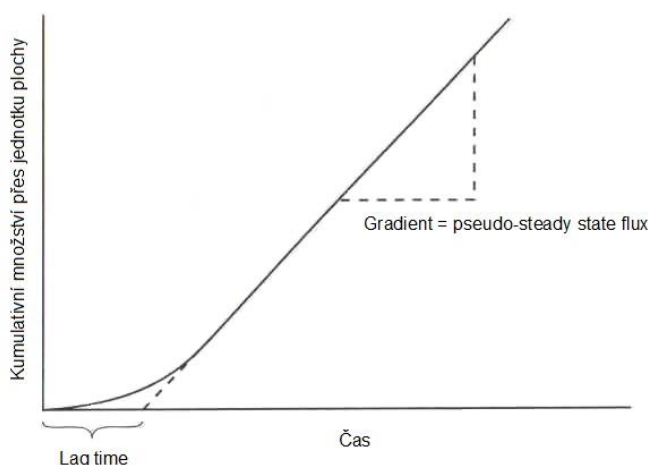
$$J_{ss} = \frac{D K_m C_f}{L} \quad (2.7)$$

Porovnání rovnice 2.7 s rovnicí 2.2 dává rovnici 2.8 (tj. alternativní vyjádření dermálního koeficientu permeability P (m/s):

$$P = \frac{J_{ss}}{C_f} \quad (2.8)$$

Grafické znázornění těchto pojmů ukazuje Graf 2.

Graf 2. Permeační profil při aplikaci infinite dose na kožní membránu



Zdroj: modifikováno z Williams 2003

Křivka grafu znázorňuje průběh absorpce v čase. Prodloužení lineární části této křivky k ose x a její protětí dává lag time a sklon udává pseudo-steady state flux J_{ss} . Koeficient dermální permeability může být počítán podle rovnice 2.8, kde C_f je koncentrace látky v donorovém kompartmentu.

Lag time (t_{lag}) vyjadřuje čas potřebný k uvolnění látky z donorové fáze, pro průchod jednotlivými vrstvami kožní bariéry a difúzi látky do akceptorové fáze. Čas potřebný k penetraci látky přes membránu, aby bylo dosaženo 95 % její hodnoty v ustáleném stavu, je přibližně roven 2,3násobku lag time. K dosažení 99 % hodnoty steady state je přibližně potřeba 3,2násobek doby lag time (Förster 2009). Z těchto důvodů je doporučována doba trvání in vitro experimentu delší než 2,7násobek doby lag time (Williams 2003)

2.2.10 Statistické hodnocení výsledků

Výsledky získané laboratorním a matematickým hodnocením jsou obvykle dále statisticky zpracovávány podle charakteru dané práce. Výsledky testů in vitro absorpce při

použití kůže jako membrány obvykle nemívají normální Gaussovské rozložení (Williams 2003, Fasano 2002, Frum 2007a) na rozdíl od použití umělé membrány (Frum 2007b).

2.3 Matematické modelování dermální absorpce

Nejnovějším způsobem testování dermální absorpce látek je matematické modelování tohoto procesu. Kožní permeace molekul je multifaktoriální jev závisící na různých typech fyzikálních, chemických a biologických interakcí. Množství těchto interakcí je nelineárních, což dělá matematické modelování velmi složitým. Vzhledem k tomu, že tato práce je zaměřena na in vitro testování dermální absorpce, jsou zde uvedeny pouze základní principy matematického modelování:

- *quantitative structure-permeability relationship (QSPR)* nebo *quantitative structure-activity relationship (QSAR)* – porovnává experimentálně získaná data o transdermální permeaci s fyzikálně-chemickými vlastnostmi látek. Největší množství těchto poznatků je obsaženo v tzv. Flynnově databázi (Flynn's dataset); (Flynn 1990). Obsahuje 97 koeficientů permeability pro 94 sloučenin získaných in vitro na lidské kůži. Vzhledem k tomu, že přináší informace z 15 literárních zdrojů, je zatížena velkým množstvím experimentálních chyb plynoucích z interlaboratorní variability při experimentech. Druhou velkou databází je Kirchnerova databáze (Kirchner 1997), která vychází se starší Flynnovy databáze a obsahuje informace o 114 látkách.

První rovnici sloužící k odhadu transdermální penetrace publikovali Potts and Guy (rovnice 2.3); (Potts 1992). Tato rovnice byla v průběhu následujících let modifikována a vylepšována dalšími autory (např. Cronin 1999, Moss 2002). Někteří autoři (Magnusson 2004) považují za nejdůležitější charakteristiku absorpce molekulární hmotnost penetrující látky a ve své rovnici používají pouze tuto vlastnost:

$$\log J_{\max} = -3,90 - (0,0190 MW)$$

J_{\max} udává maximální flux, MW molekulární hmotnost.

- *odhad in vitro-in vivo korelace (IVIVC)*
- *arteficial neural network (ANN)* – založena na molekulární struktuře penetrujících látek. Použil ji např. Degim (Degim 2003) pro hodnocení permeability 40 sloučenin, získaná data velmi dobře korelovala s experimentálními výsledky ($r^2 = 0,997$).

2.4 Standardizace

S rozvojem a masivním nárůstem používání in vitro testů zkoumajících různé aspekty transdermální penetrace vyvstala koncem 90. let minulého století potřeba sjednotit metodiky používané na různých pracovištích zabývajících se průnikem látek skrz kůži. Rozdílnost výsledků získaných při provádění pokusů s absorpcí látek nejlépe dokumentuje publikace Chilcott a kol. (Chilcott 2005). Za použití stejného protokolu měřili autoři v kontrolované klinické studii v 18 laboratořích (devět ve Velké Británii, po dvou v USA a Austrálii, po jedné v Japonsku, Portugalsku, Německu, Dánsku a Jihoafrické Republice) inter- a intralaboratorní rozdíly v průchodu methylparabenu přes syntetickou membránu. Syntetická membrána byla použita z důvodu vyloučení vlivu různých vzorků kůže na úroveň absorpce. Interlaboratorní rozdíly dosáhly hodnoty 35 % (rozdíl mezi nejnižším a nejvyšším průměrným průtokem byl čtyřnásobný), intralaboratorní rozdíly hodnoty 10 %. Dle autorů byly rozdíly způsobeny lidskými chybami, odlišnostmi v objemu receptorové části difúzní komůrky, ve velikosti aplikační plochy, v objemu vzorku a v použitém typu difúzní komůrky.

Prvním významným krokem ke sjednocení metodiky provádění transdermálních absorpcí byla práce Diembecka a kol. (Diembeck 1999), kde byl publikován dodnes používaný standardní protokol pro provádění transdermálních absorpcí s použitím lidské, prasečí a potkaní kůže. Dalším významným krokem bylo přijetí několika směrnic OECD. Směrnice č. 28 (OECD 2004a) stanovuje podmínky pro vedení absorpčních pokusů na kůži, Směrnice č. 427 (OECD 2004b) stanovuje podmínky pro „in vivo“ metody testování kožní absorpce a Směrnice č. 428 (OECD 2004c) upravuje testování kožní absorpce „in vitro“. Dalšími směrnicemi týkajícími se problematiky působení chemických látek na kůži jsou Směrnice č. 117 - *Partition Coefficient /n-octanol/water/, High Performance Liquid Chromatography /HPLC/ Method* (OECD 2004e), Směrnice č. 430 - *In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test /TER/* (OECD 2004d), Směrnice č. 431 - *In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test* (OECD 2002), novelizovaná v roce 2013 (OECD 2013b). Poměrně novou směrnicí je Směrnice č. 439 - *OECD Guideline for the Testing of Chemicals - In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method* stanovující základní podmínky pro používání tří komerčně dostupných uměle vytvořených membrán lidské epidermis – EpiSkinTM, EpiDermTM, SkinEthicTM (OECD 2010). Dalším doporučením OECD týkajícím se dermálních

penetrací je Směrnice č. 156 – *Guidance Notes on Dermal Absorption* z roku 2011 (OECD 2011).

V Evropě reguluje provádění testů dermálních expozic chemických látek Evropská Unie. Její *Guidance Document on Dermal Absorption* (EU 2004) pojednává o testování dermální absorpce pesticidních látek používaných v zemědělství. Problematikou dermálních absorpcí kosmetických prostředků se zabývá dokument *Opinion on Basic Criteria for the In Vitro Assessment of Dermal Absorption of Cosmetic Ingredients* (EU-SCCP 2006) a novější *Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients* (EU-SCCS 2010). Další evropskou organizací (zabývající se bezpečností kosmetických prostředků) je COLIPA (The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association), jejíž *Guidelines for percutaneous absorption/penetration* vyšel již v roce 1997 (COLIPA 1997).

V USA se problematikou testování průniku látek kůží zabývá United States Environmental Protection Agency (US EPA). V roce 2004 přijala dokument *In Vitro Dermal Absorption Rate Testing of Certain Chemicals of Interest to the Occupational Safety and Health Administration* (US EPA 2004a) pojednávající o testování vybraných látek in vitro. Hodnocením rizik dermální penetrace se zabývá dokument *Risk assessment guidance for Superfund, Vol. I: Human health evaluation manual* (US EPA 2004b).

Shrnutí a doporučení s celosvětovou působností v oblasti dermální absorpce přináší *Environmental Health Criteria 235 - Dermal Absorption* přijatý Světovou zdravotnickou organizací (WHO) v roce 2006 (WHO 2006).

Zájem a studium mechanismů dermální penetrace trvá již v podstatě mnoho století. Jak ale říká v úvodu ke specializovanému vydání časopisu *Advanced Drug Delivery Reviews* (z února 2013), zaměřenému na problematiku dermálních absorpcí, dr. Steffi Hansen „mechanismy zapojené do procesu dermální absorpce stále ještě dobře neznáme“ (Hansen 2013).

3. Polycyklické aromatické uhlovodíky

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) jsou organické látky tvořené pouze uhlíkem a vodíkem. Společným rysem je přítomnost dvou a více aromatických kruhů. Vznikají při nedokonalém spalování organického materiálu, jako je uhlí, dřevo, ropné produkty, odpady, tabák a mnoho dalších. Do současnosti bylo identifikováno více než 100 základních PAU a téměř 500 jejich izomerů (Holoubek 1996). V čistém stavu se jedná o bezbarvé, bílé nebo světle žlutozelené pevné látky, středně až málo těkavé, ve vodě prakticky nerozpustné. Dobře se rozpouští v polárních i nepolárních organických rozpouštědlech, jako jsou benzen, toluen, xylen, aceton, metanol, etanol. Vysokou rozpustnost mají i v tucích a vykazují tendenci ke kumulaci v tukové tkáni rostlin a živočichů. V životním prostředí se vyskytují jako komplexní směsi, zřídka jako jednotlivé uhlovodíky (ATSDR 1995, IARC 2010).

Malé PAU s méně než čtyřmi kruhy (MW 128–178) bývají v plynném stavu, PAU se čtyřmi kruhy (MW 202) mohou být plynné i pevné. Větší PAU (MW větší než 228) jsou obvykle pevné, vázané na prachové částice. PAU vyskytující se v prostředí většinou nejsou těkavé (Jongeneelen 2001).

3.1 Zdroje PAU

PAU se nachází v ovzduší, vodě, půdě, potravinách a dalších materiálech, s nimiž přicházíme denně do kontaktu. Zdroje PAU lze rozdělit na přírodní a antropogenní. Přírodními zdroji jsou vulkanická činnost a přírodní požáry. Přirozeně se PAU také vyskytují v ropě, kamenouhelném dehtu, kreosotovém oleji, asfaltu (Fiala 1999).

Podstatně větší množství PAU je ale produkováno člověkem, zejména při spalování fosilních paliv v průmyslu, při výrobě elektřiny a v lokálních topeništích. Další vznikají v dopravě nebo při spalování odpadů. Významným zdrojem polyaromátů je průmysl, především výroba železa, oceli, hliníku, koksů, dehtu, sazí a svítiplynu (Guo 2011). Nezanedbatelným zdrojem pro jednotlivce je tabákový kouř a některé způsoby úpravy jídla, zejména grilování, opékání na otevřeném ohni, uzení, smažení a pečení, kdy nejvíce PAU vzniká při teplotách 400–800°C (Fiala 2000).

Rozsáhlý přehled o monitorování environmentální expozice PAU publikoval Srogi (Srogi 2007), environmentální expozici dětí hodnotil Fiala (Fiala 2001), expozici PAU v USA (výsledky měření urinárních metabolitů u 2 400 osob) uvádí Grainger (Grainger

2006). Li (Li 2008) uvádí, že nejvyšší expozice PAU jsou v rámci pracovních expozic, kde hlavní cestou je transdermální přenos, u pracovních neexponovaných kuřáků je nejvyšší expozice inhalační cestou a u nekuřáků orální a inhalační cestou.

Jongeneelen a kol. (Jongeneelen 2001) se zabývali pracovními expozicemi PAU a rozdělili je do tří základních typů: 1) dehet a jeho deriváty (používané při konzervaci dřeva, jako součást barev, expozice pracovníků při stavbě a opravách silnic, manipulace s dehtovými střešními krytinami a izolačními materiály atd. Tyto expozice obsahují do 10 % PAU); 2) ropné deriváty (výroba a manipulace s nimi); 3) hoření nebo pyrolýza organického materiálu (dým ohně, výfukové plyny, pálení gumy, pálení odpadů).

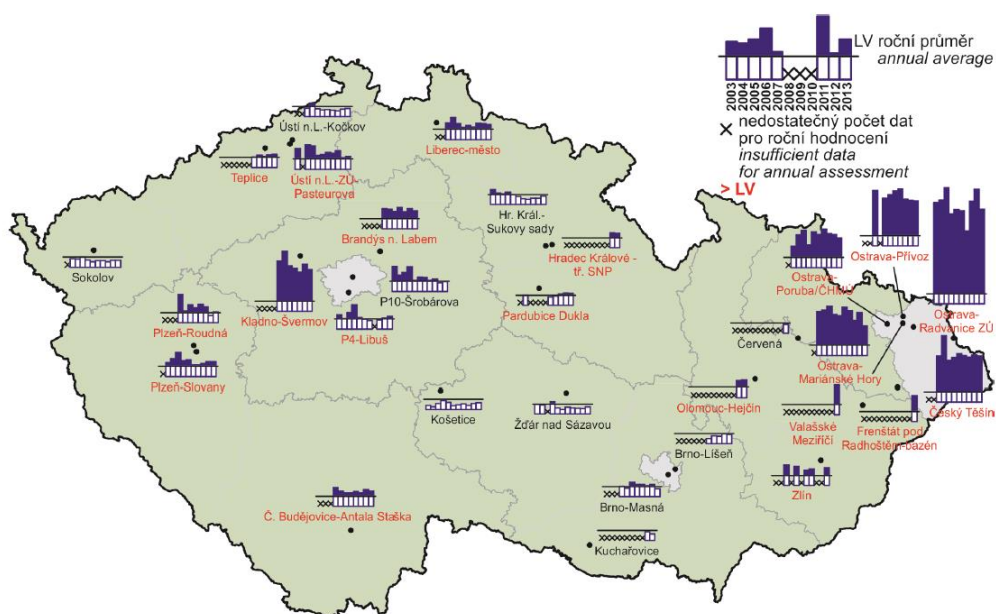
Navrhují též třístupňové hodnocení expozice PAU: 1) neprofesionální expozice PAU – koncentrace 1-hydroxypyrenu (1-OHP) v moči do 0,24 $\mu\text{mol/mol}$ kreatininu u nekuřáků, 0,76 $\mu\text{mol/mol}$ kreatininu u kuřáků; 2) profesionální expozice bez biologického efektu – 1-OHP v moči do 1,4 $\mu\text{mol/mol}$ kreatininu; 3) profesionální expozice s expozičním limitem (occupational exposure limit - OEL) u pracovníků koksáren a v hliníkárenském průmyslu – 1-OHP v moči do 2,3 $\mu\text{mol/mol}$ kreatininu (pro koksárny), do 4,9 $\mu\text{mol/mol}$ kreatininu (pro hliníkárny).

3.2 Cesty vstupu do organismu

PAU vstupují do organismu cestou inhalační, orální a dermální. PAU se dvěma až třemi kruhy jsou absorbovány rychle a ve větším objemu než PAU s pěti až šesti kruhy. Po vstupu do organismu mohou být PAU distribuovány do všech orgánů, ovšem s preferencí distribuce a retence ve tkáních obsahujících větší množství tukových látek (IARC 2010).

Pro běžného obyvatele České republiky představuje inhalační expozice poměrně vysoké riziko. Dle Statistické ročenky životního prostředí České republiky byly např. v roce 2009 v ČR překročeny cílové imisní limity pro benzo[a]pyren (BaP) na 65 % měřících stanic. Jako území s překročeným imisním limitem pro BaP bylo vyhodnoceno 2,3 % plochy České republiky, kde žije asi 35,5 % obyvatel ČR (MŽP ČR 2011). Ucelenější přehled vývoje koncentrací BaP na vybraných měřících stanicích ukazuje Obr. 20 (MŽP ČR 2014). Bílá pole ukazují hodnotu povoleného ročního průměru, tmavě fialově je vyjádřeno překročení tohoto limitu. Nejhorší situace je tradičně na Ostravsku.

Obr. 20. Roční průměrné koncentrace benzo[*a*]pyrenu na vybraných měřicích stanicích v letech 2003–2013



Zdroj: Ministerstvo životního prostředí ČR - Statistická ročenka životního prostředí ČR 2014 (MŽP ČR 2014)

Díky své lipofilitě prostupují PAU velmi dobře skrz sliznici průdušek do krevního oběhu člověka (ATSDR 1995). PAU přítomné v ovzduší mohou vstupovat do organismu zároveň i dermální cestou, zejména v letních měsících, kdy je tělo oděvem kryto mnohem méně než v zimním období. Zde je zároveň jejich působení potencováno přítomností slunečního záření, které je IARC uznáno jako kompletní karcinogen (IARC 2010). Hypotézu o negativním působení již environmentálních koncentrací BaP na kůži vyslovil Costa (Costa 2010).

Významným zdrojem PAU je kouření. Působení cigaretového kouře, resp. jeho kondenzátu, na kůži testovali Roemer a kol. (Roemer 2010), kteří ho jednorázově aplikovali na záda myší. Po 15 týdnech našli na kůži při histologickém hodnocení přítomnost benigních papilomů, po 25 týdnech došlo ke vzniku maligních karcinomů.

V čerstvých potravinách se PAU vyskytují ve velmi malém množství. To se však velmi zvyšuje při některých kuchyňských úpravách potravy, jako je pečení, smažení a zejména grilování a opékání na otevřeném ohni. Na orální absorpci PAU mají vliv další látky obsažené ve stravě a pohybuje se mezi 20–50 % podané dávky. Orální cesta je hlavním zdrojem PAU pro člověka, který nekouří a není vystaven pracovní expozici PAU (IARC 2010).

Zajímavým a často podceňovaným nebezpečím je i přítomnost PAU v domácím prachu. Maertens a kol. (Maertens 2008) provedli analýzu prachu, vyluxovaného v 51 domácnostech, na přítomnost 13 reprezentantů PAU. Našli je ve všech vzorcích, koncentrace byly různé (1,5–325 mg/g). Této expozici jsou vystaveny zejména děti předškolního věku, hrající si doma na zemi, a proto stanovovali míru rizika karcinogenity pro tuto věkovou skupinu. Při koncentracích do 40 mg/g (což bylo v 90 % domácností) bylo riziko přijatelné, při vyšší koncentraci však dosáhlo hodnoty vyšší než 1×10^{-4} , což už představuje zvýšené riziko vzniku nádoru v této věkové skupině.

Netradičním způsobem dermální expozice PAU je i tetování, jehož obliba v posledních letech vzrůstá. Dle odhadů je v USA tetovaných 24 % populace, v Německu 9 %, ve Velké Británii 12 % (Stirn 2006). Nejčastěji používaný černý inkoust je vyráběn na bázi sazí. Jeho instilace do dermis vede k jeho trvalé deponaci v oblasti, ale i k částečnému transportu do organismu, zejména do regionálních lymfatických uzlin. Analýzu 19 komerčně dostupných inkoustů provedli Regensburger a kol. (Regensburger 2010). Kromě zástupců PAU v inkoustu našli i poměrně velké množství fenolu (ten může poškozovat ledviny a CNS, je karcinogenní a teratogenní).

Některé PAU po ozáření UV světlem (zejména UVA oblastí, která má dostatečnou pronikavost do dermis) produkují atomární kyslík, který může poškozovat integritu kůže a působit fotosenzibilizačně (Regensburger 2010). O nebezpečí synergistického efektu UV záření a expozici BaP píše i další autoři (Wang 2007, Burke 2009, Nair 2009). Upozorňují i na nebezpečí tohoto efektu při subkarcinogenní dávce BaP, která v kombinaci s UVA vedla ke vzniku nádorů u myši, zatímco při samostatné aplikaci karcinogeneze nenastala (Wang 2005). Při environmentální dermální expozici hrozí nebezpečí zejména v letních měsících.

Expozici PAU ze sedimentů při koupání v přírodním vodním zdroji (jezeru Trekanten ve Švédsku) hodnotili Filipsson a kol. (Filipsson 2009).

Nebezpečnost PAU jako skupiny dokládá i Priority List of Hazardous Substances (ATSDR 2013). Bylo hodnoceno 848 látek, které byly seřazeny podle své zdravotní nebezpečnosti. Jako prioritních je označeno prvních 275, přičemž PAU jako celek se nachází na devátém místě. Pořadí jednotlivých zástupců PAU ukazuje Tab. 2.

Vzhledem k tématu disertační práce bude největší pozornost věnována dermální cestě expozice. Její vysoká nebezpečnost se projevuje zejména u osob s pracovní expozicí PAU. PAU se hojně vyskytují v provozech zabývajících se výrobou dehtu, koksu, živců, asfaltu, hliníku, železa a oceli, při zplyňování uhlí, ve spalovnách komunálního odpadu, při

Tab. 2. Pořadí jednotlivých zástupců a zdrojů PAU podle Priority List of Hazardous Substances

Zástupci a zdroje PAU			
Pořadí	Název	Pořadí	Název
8	Benzo[a]pyren	299	Fluoren
9	Polycyklické aromatické uhlovodíky	306	Antracen
10	Benzo[b]fluoranten	320	Benzo[g,h,i]perylene
15	Dibenzo[a,h]antracen	342	Acenaftylen
23	Kamenouhelný kreosot	349	Benzo[j]fluoranten
38	Benz[a]antracen	382	Benzo[a]fluoranten
61	Benzo[k]fluoranten	425	Indenopyren
73	Benzofluoranten	441	Perylen
80	Naftalen	475	Benzo[e]pyren
115	Kamenouhelný dehet	523	Asfalt
133	Fluoranten	544	Benzoperylen
141	Chrysen	563	Benzofenantren
168	Acenaften	643	Benzo[a]perylene
174	Indeno[1,2,3-c,d]pyren	682	Dibenz[a,j]antracen
220	Černouhelná struska (coal tar pitch)	701	Benzo[g,h,i]fluoranten
226	Benzopyren	785	Dieslové palivo
246	Fenantren		Kerosin
254	Pyren		Minerální olej

Legenda: Pořadí jednotlivých zástupců a zdrojů PAU podle Priority List of Hazardous Substances, barevně označené patří mezi 275 prioritních (ATSDR 2013).

impregnaci dřeva, při zpracování ropy a používání jejích derivátů (IARC 2010). Význam nebezpečnosti této cesty vstupu látek do organismu také stoupá díky ochranným pracovním prostředkům, jež jsou používány pro ochranu dýchacích orgánů. Jejich současné častější používání (oproti minulým desetiletím) a větší účinnost vede ke zvýšení podílu expozice dermální cestou. O významu této cesty svědčí i práce porovávající inhalační expozice PAU u různých profesí s odpovědí organismu (přítomnost metabolitů v moči) provedená v Německu. Nalezené hodnoty nekorelují a jasně ukazují na nutnou přítomnost jiné expoziční cesty, autoři nabízejí cestu dermální (Marczynski 2009).

Význam a nebezpečnost dermální expozice u pracovníků výroby koksu zhodnotil vanRooij (vanRooij 1993). U dvanácti osob sledoval inhalační a dermální expozici pyrenu v průběhu pěti po sobě jdoucích dnů po osmihodinové směně. K měření dermálních expozic použil absorpční podložky na šesti místech těla (krk, hrudník, horní část paže, zápěstí, třísla, kotník). Z naměřených hodnot vyplynulo, že průměrná celková kontaminace kůže pyrenem se pohybovala mezi 21 a 166 μg denně. Dermální absorpce pyrenu se pohybovala mezi 4 a 34 $\mu\text{g}/\text{den}$, což bylo 20 % pyrenu kontaminujícího kůže. Průměrná koncentrace celkového pyrenu v ovzduší v dýchací zóně se pohybovala v rozmezí 0,1 až 5,4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Průměrný příjem pyrenu inhalační cestou se pohyboval mezi 0,5 a 32,2 $\mu\text{g}/\text{den}$.

Z naměřených hodnot vyplynulo, že v průměru 75% celkového přijatého množství pyrenu se do organismu dostane dermální cestou. Celkové množství 1-hydroxypyrenu (odpadního metabolitu pyrenu, 1-OHP) vylučovaného močí jako důsledek expozice PAU se pohybovalo mezi 36 a 239 nmol/den, kdy dle analýz většina pocházela z expozice dermální cestou. Při kombinaci obou expozičních cest bylo v podobě 1-OHP 13–49 % vylučovaného pyrenu. Variabilita ve vylučování je ovlivněna kouřením a konzumací alkoholu.

Nepřímou hodnotili dermální expozici Bentsen a kol. (Bentsen 1998). Sledovali vliv použití inhalačně preventivních opatření na snížení urinární exkrece 1-hydroxypyrenu. S použitím ochranných prostředků došlo ke snížení exkrece 1-OHP o 41 %, u zbývajících částí exkretovaného 1-OHP předpokládají dermální expozici.

K podobným výsledkům došel i McClean (McClean 2004) při sledování expozice silničních dělníků. U silničářů je dermální kontakt s PAU hlavní cestou expozice. Dle jejich výsledků byl vliv dermální expozice na hladinu 1-OHP v moči 9krát vyšší než vliv inhalační expozice.

Zajímavý experiment provedli Walter a Knecht (Walter 2007). Sledovali transdermální absorpci par asfaltu na dobrovolnících. Po osm hodin bylo deset mužů parám asfaltu exponováno pouze dermálně (dýchali s čistícím respirátorem) a dva muži byli bez respirátoru, tzn. exponováni inhalačně i dermálně. U všech byly sledovány metabolity PAU v moči v různých časových intervalech. Vyhodnocením výsledků zjistili, že 50–60 % vstřebaných PAU pochází z dermální expozice.

Nepřímou byl význam dermální expozice potvrzen zjištěním změny urinární exkrece 1-hydroxypyrenu u pracovníků koksáren. Pracovníci jeden týden pracovali za standardních hygienických podmínek, kdy si pracovní oděv měnili dle potřeby, spodní prádlo zaměstnavatel neposkytoval, rukavice používali obvyklou dobu (2–10 týdnů), o přestávkách si myli ruce. Druhý týden pracovali za zvýšených hygienických podmínek – denně dostávali nové rukavice a vypraný oděv (overall i spodní prádlo a ponožky), mytí rukou bylo doplněno o mytí obličeje před každou přestávkou. Srovnání exkrece 1-OHP v moči ukázalo, že v hygienickém týdnu došlo ke snížení exkrece o 37 % (vanRooij 1994).

3.3 Metabolismus PAU

I když hlavním orgánem metabolismu PAU jsou játra, začíná metabolismus PAU již v epitelové vrstvě vstupních orgánů všech tří výše popsaných expozičních cest, tzn. v plicní tkáni, v zažívací trubici a v kůži. Díky své lipofilitě bývají PAU vstřebávány

epitelem zažívacího traktu a kůži relativně pomalu, jejich distribuce v těle je však již rychlá a jejich negativní, zejména karcinogenní účinky se potom mohou projevit na kterémkoliv orgánu těla (IARC 2010).

Metabolismus PAU probíhá ve dvou fázích. V první fázi jsou PAU pomocí různých enzymů přeměňovány na reaktivnější metabolity. Hlavní význam zde má skupina enzymů označovaných jako cytochrom P450 (CYP). Jedná se o poměrně širokou skupinu monooxygenáz, metabolismu polycyklických aromatických uhlovodíků se účastní zejména CYP1A1 (přítomný zejména v mimojaterní tkáni), CYP1A2 (přítomný zejména v játrech) a CYP1B1 (přítomný hojně v různých nádorových tkáních, ale ne v normální tkáni); (Murray 1997). Méně se účastní CYP2C9, CYP3A4 (Shimada 2006a). Dalšími enzymy účastnicími se této první fáze metabolismu jsou peroxidázy. Při přeměně vznikají DNA-reaktivní metabolity – epoxidy a fenoly, které se dále oxidují na aktivnější PAU chinony. Ve druhé fázi jsou tyto konjugovány pomocí enzymů (glutathion S-transferáza GSTM1, GSTP1, GSTT1; uridin 5'-difosfát glukuronosyltransferáza, sulfotransferáza) s glutathionem, glukuronovou kyselinou a sulfáty a vzniklé konjugáty jsou pak vylučovány z organismu (IARC 2010). Metabolity PAU s 2–3 kruhy jsou z těla exkretovány převážně močí (ve formě glukuronátů), metabolity větších PAU jsou vylučovány stolicí (Li 2008).

Hodnocení metabolismu pyrenu provedl např. Payan (Payan 2008). V pokusech s potkany *in vivo* bylo po intravenózním podání pyrenu 40 % dávky vyloučeno močí a 59 % dávky vyloučeno stolicí do 24 h. Po 72 hodinách zbývalo v těle 1 % dávky. Při dermálním podání *in vitro* bylo po 24 h v receptorové tekutině 97 % pyrenu v nemetabolizované podobě. Též při dermálním podání *in vivo* bylo pouze 0,6 % absorbované dávky vyloučeno v podobě 1-hydroxypyrenu.

Rozdíl v urinární exkreci 1-hydroxypyrenu v závislosti na cestě expozice studoval Lafontaine (Lafontaine 2002). U pracujících s převažující inhalační expozicí je nejvyšší koncentrace 1-OHP v moči těsně po směně, u pracujících s převážně dermální expozicí je po směně několik hodin trvající plateau a zvýšení koncentrace 1-OHP v moči nastává se zpožděním.

V posledních letech bylo zjištěno, že některé látky (např. naftoflavon, resveratrol, rhapontigenin, ale paradoxně i některé PAU – 1-1-propynylpyren, 1-etynylpyren, dokonce i benzo[a]pyren) dovedou činnost cytochromu P450 snižovat až blokovat a tím působí proti vzniku nádorového bujení buněk (Shimada 2006b, 2007). Uvedené zjištění spolu s genovým polymorfismem jednotlivých cytochromů a proměnlivým složením směsí PAU, kdy jsou jednotlivé polyaromatické uhlovodíky zastoupeny v různých vzájemných

poměrech, ztěžuje hodnocení rizika expozice daným látkám. Potvrzuje to např. práce Pesche (Pesch 2007) – sledovali 284 pracovníků exponovaných fenantrenu. Zjistili korelaci mezi dávkou a množstvím hydroxyfenantrenu v moči, ale žádnou matematickou závislost mezi dávkou a poškozením DNA krevních buněk.

3.3.1 Metabolismus PAU v kůži

V lidské kůži se nachází enzymy účastníci se obou fází metabolismu cizorodých látek, i když samozřejmě v mnohem menších koncentracích (do 10 %), než je jejich výskyt v dominantních metabolických orgánech (játra, ledviny). Většina je lokalizována v keratinocytech, v ostatních kožních buňkách (melanocytech, Langerhansových buňkách, fibroblastech, monocitech, lymfocytech) je jich méně (Oesch 2007).

Nejvýznamnější skupinou enzymů účastnících se první fáze metabolismu PAU jsou cytochromy P450 (CYP). V lidské kůži bylo detekováno 19 zástupců různých podskupin cytochromů (CYP1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2A7, 2B6, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 2J2, 2R1, 2S1, 2U1, 2W1, 3A4, 3A5, 3A7). Metabolismu PAU se účastní zejména CYP 1A1 (v bazální vrstvě keratinocytů), 1A2 (v celé epidermis), 1B1 (v keratinocytech mimo bazální vrstvu). Z enzymů účastnících se první fáze metabolismu exogenních látek jsou v kůži dále přítomny flavindependentní monooxygenázy, alkoholdehydrogenázy, aldehyddehydrogenázy, esterázy, amidázy a epoxidhydrolázy. Z enzymů druhé fáze metabolismu cizorodých látek se v kůži nachází glutathion-S-transferáza, glukuronosyltransferáza, sulfotransferáza, acetyltransferáza a metyltransferáza (Oesch 2007).

Metabolismus PAU může v kůži probíhat i v melanocytech, jak v in vitro testu s radioaktivně značeným BaP prokázal Agarwal (Agarwal 1991). Ke kultivovaným lidským melanocytům přidali značený BaP a pomocí HPLC analýzy potom prokázali přítomnost jeho metabolitů. Hlavními metabolity byly (intra i extracelulárně) ³H-BaP-9,10 a 7,8 diol. Dalšími metabolity byly 3,6-chinon, 9-OH a 3-OH metabolity, často jako glukuronové a sulfátové konjugáty. Celkem bylo metabolizováno 37,3 % přidaného ³H-BaP (21,1 % bylo nalezeno intracelulárně a 16,2 % extracelulárně).

3.4 Účinky PAU

Z výsledků testování účinku PAU in vivo vyplývá, že hlavní vliv na karcinogenní působení PAU mají diol epoxidy a radikál kationty (IARC 2010).

Mechanismus účinku *diol epoxidů* spočívá v postupném metabolismu PAU, které jsou konvertovány na oxidy a dihydrodioly, které jsou dále oxidovány na diol epoxidy. Obojí, oxidy a diol epoxidy, se díky elektrofilnímu uhlíkovému iontu váží na DNA (nejčastěji na guanin a adenin) a vedou k tvorbě DNA adduktů, které potom vedou k mutacím (např. v *ras* proto-onkogenech), jež jsou asociovány s tumorigenním procesem (IARC 2010).

Radikál kationty vznikají jedoelektronovou oxidací PAU. Mechanismus jejich účinku spočívá ve tvorbě DNA adduktů s guaninem a adeninem. Ty způsobují mutace v *ras* proto-onkogenech a vedou ke karcinogenezi (IARC 2010). Vliv BaP na indukci oxidačního stresu u myši popisují Kumar a kol. (Kumar 2012) – dochází ke zvýšení hladiny lipidové peroxidace a ke snížení endogenních antioxidantů, jako je superoxid dismutáza (SOD), glutathion reduktáza (GR), kataláza (CAT), glutathion (GSH).

Z experimentů na myších byly získány důkazy, že diol epoxidový mechanismus převažuje při tvorbě nádorů plicní tkáně, zatímco při vzniku kožních nádorů se uplatňují oba mechanismy (Straif 2005).

Conney a kol. též popisují na dávce závislé mutační změny c-Ha-ras onkogenu v nádorových buňkách u myši, které byly ošetřeny nízkými nebo vysokými dávkami BaP (Conney 2001).

Další mechanismy karcinogenního působení PAU jsou prostudovány hůře. Některé PAU dioly jsou pomocí aldo-keto-reduktázy přeměňovány na ortho-chinony. Ty vedou k tvorbě DNA adduktů, které *in vitro* způsobují mutaci genu pro protein p53, který má tumor suprimující účinky. Jiným mechanismem je tvorba metyl-PAU a následně hydroxymetyl-PAU, které jsou konvertovány na reaktivní sulfát estery, jež jsou opět schopny vyvolat tvorbu DNA adduktů. Dalším způsobem vedoucím k imunosuprimujícímu, teratogennímu a karcinogennímu účinku je aktivace arylhydrokarbonového receptoru (AhR). Tento receptor je přítomen v cytoplazmě většiny buněk. Aktivuje se navázáním příslušné látky (např. PAU) a vzniklý komplex potom vstupuje do buněčného jádra, kde ovlivňuje expresi různých genů - vznikají mRNA a enzymy potřebné k metabolismu (např. CYP 1A1, 1A2, 1B1) a aktivaci PAU na reaktivnější intermetabolity a ty se potom váží na DNA a vedou ke vzniku adduktů (Baird 2005).

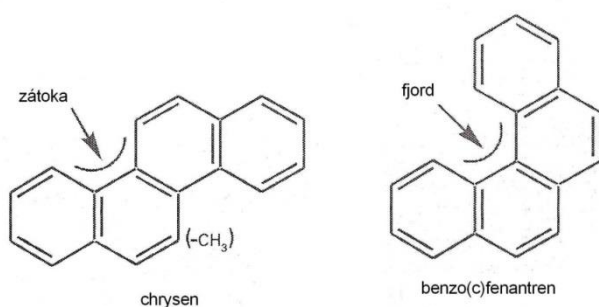
Mají-li PAU vést k tvorbě nádorů, musí být metabolicky aktivovány. Existují interindividuální rozdíly v metabolismu exogenních látek. V největším ohrožení jsou lidé, vlastníci velké množství enzymů, jež aktivují přijaté exogenní látky do reaktivnější formy

a zároveň mající menší množství enzymů zodpovědných za detoxikaci a odstraňování vzniklých metabolitů. Enzymatické vybavení každého jednotlivce je ovlivňováno mnoha faktory – rasou, věkem, pohlavím, genetickou dispozicí, kouřením, mírou příjmu alkoholických nápojů. Je známo, že novorozené myši vystavené působení BaP nebo dimethylbenz[a]antracenu mají vyšší incidenci nádorů jater a plic než dospělí jedinci. Vyšší incidence těchto nádorů se též vyskytuje v pubertálním období (IARC 2010).

Expozice směsím PAU zvyšuje incidenci nádorů v lidské populaci. Z etických důvodů nelze provádět experimenty s PAU na lidech, proto existuje konsensus, že ty jednotlivé PAU, jejichž karcinogenita byla prokázána v experimentech na zvířatech, jsou karcinogenní i pro člověka. Je též málo informací o humánní expozici jednotlivým čistým PAU (jsou pouze starší částečné informace z krátkodobých studií prováděných na dobrovolnících). V případě environmentální nebo pracovní expozice se vždy jedná o směsi PAU (IARC 2010).

PAU ovlivňují vznik nádorů jednak v místě vstupu, jednak na vzdálených místech, př. nádorů močového měchýře (Romundstad 2000). Jsou schopny působit i jako promotory karcinogeneze, např. Ding (Ding 2006) zjistil, že diol epoxidy zvyšují expresi vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (vascular endothelial growth factor, VEGF), jenž je klíčovým růstovým faktorem v karcinogenezi.

Obr. 21. Struktury typu zátoka a fjord v molekule PAU



PAU též dovedou zasahovat do komunikace buněk - mají inhibiční efekt na intercelulární komunikaci pomocí gap junction. PAU, které mají ve své molekule zátokové nebo fjordové regiony (Obr. 21), jsou více inhibiční (IARC 2010).

Bylo též zjištěno, že karcinogenní potenciál „čistých“ PAU se odehrává na genetické úrovni, zatímco halogenované PAU (dioxiny ap.) účinkují negenotoxickým (epigenetickým) mechanismem (IARC 2010).

3.4.1 Účinky PAU na kůži

Při dermální cestě expozice je kůže první tkání, do které se PAU dostávají, a tudíž je jejich působení vystavena nejvíce. V tomto případě lze hovořit o přímém účinku PAU v dané tkáni.

Účinky PAU v kůži dobře popisuje Loreto (Loreto 2007). Sledoval změny kůže odebrané biopsií z předloktí u 16 silničních pracovníků (exponovaným asfaltu a živícím v průměru $13,3 \pm 5,7$ roku) a u 10 neexponovaných kontrol. Při histologickém vyšetření kůže byly u silničářů zjištěny následující změny: slabší epidermis, ploché dermální papily, ztráta intercelulárních spojení v bazální a ostnitě vrstvě, cytoplazmatická hyperchromie pravděpodobně vlivem smrštění cytosolu díky změnám plazmatické membrány. Při imunohistochemickém vyšetření pak nadměrná exprese bax-proteinu (proapoptotický) v celé epidermis (mimo rohové vrstvy) u silničářů, u kontrol pouze v bazální vrstvě; u silničářů snížená exprese bcl-2 proteinu (antiapoptotický) v bazální vrstvě, u kontrol je jeho výskyt v bazální vrstvě vyšší. Svědčí to o zvýšené apoptotické aktivitě buněk epidermis jako obranném mechanismu proti chemickému poškození; díky tomu ale dochází ke ztenčení epidermis – chyběly zejména buňky základní a ostnitě vrstvy.

Přehled o výskytu bazocelulárního a skvamózního karcinomu u lidí v souvislosti s expozicí PAU v Polsku uvádí Kubasiewicz (Kubasiewicz 1991), v Kanadě Gallagher (Gallagher 1996).

Vliv PAU na keratinocyty in vitro sledovali Wang a kol. (Wang 2007). Kultivovali lidské keratinocyty (linie lidských keratinocytů HaCaT) vystavené působení 16 PAU a pětiminutovému ozáření lampou se spektrem normálního slunečního záření. Hned po ozáření byla zjištěna snížená viabilita u buněk kultivovaných se čtyř- až pětikruhovými PAU a s antracénem. Tříkruhové PAU viabilitu buněk nesnižovaly. Po 24 hodinové kultivaci všechny PAU (kromě naftalenu) snižovaly životaschopnost keratinocytů (snížena až o 80 %).

Vliv jiného zdroje PAU, leteckého paliva (jet fuel JP-8), na kůži sledovali Singh a Singh (Singh 2003). Zkoumal vliv expozice tohoto paliva na prasečí kůži in vitro. Zjistil extrakci lipidů a proteinů z rohové vrstvy a zvýšenou transepidermální ztrátu vody (TEWL) oproti kontrole.

Costa a kol. (Costa 2010) zkoumali vliv BaP (aplikovaného na lidskou kůži) na CYP1A1 a AhR. Obojí se po expozici zvýšilo více než dvojnásobně. Oxidativní stres hodnotili pomocí redukce MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylyltetrazolium bromid), proteinové peroxidace a tvorby reaktivních kyslíkových radikálů (reactive oxygen

species, ROS). Vlivem aplikace BaP došlo k signifikantnímu zvýšení ROS a karbonylových částic spolu se snížením viability kůže. BaP se v buňce váže na cytoplazmatický aryl hydrokarbonový receptor (AhR), který se přesunuje do jádra a tam vytváří DNA addukty, které modifikují expresi genů, včetně CYP1A1. CYP1A1 metabolizuje BaP na reaktivnější metabolity, které vedou k tvorbě DNA adduktů a iniciují karcinogenezi v kůži. AhR aktivace také indukuje expresi genu pro cyklooxygenázu-2 (COX-2), která katalyzuje první reakci konverze arachidonové kyseliny na prostaglandiny. AhR aktivace je též považována za první krok zánětlivé kaskády generující ROS. ROS a volné radikály hrají významnou roli ve stárnutí kůže, karcinogenezi, fotosenzitivitě a autoimunitě. Oxidativní stres vede k peroxidaci lipidů a poškození DNA. Vzhledem k tomu, že detekovatelná množství AhR a CYP1A1 byla nalezena i v kontrolních vzorcích, vyslovili hypotézu, že kůže může být poškozena již environmentální koncentrací BaP.

O potenciálním vlivu environmentální dermální a inhalační koncentrace BaP píše i Chen a Liao (Chen 2006), kdy ji z hlediska kumulativního celoživotního rizika rakoviny označují jako vysoce potenciálně nádorově rizikovou.

Courter a kol. (Courter 2008) sledovali vliv jednorázového podání vybraných PAU (dieselových zplodin, BaP a dibenzo[a,l]pyrenu [DBP] v různé kombinaci) na kožní karcinogenitu u myši in vivo. Po 25 týdnech se jako nejrizikovější ukázala aplikace samotného DBP, která vedla ke vzniku nádorů u 100 % experimentálních jedinců, u všech byly přítomny karcinomy a to v počtu 2,6 karcinomu na zvíře. Oproti tomu aplikace DBP v kombinaci s dieselovými zplodinami vedla ke vzniku nádorů pouze u 66 % zvířat (u 19 jedinců z 29; karcinomy byly pouze u tří jedinců). Aplikace samotného BaP vedla ke vzniku nádorů u 71 % zvířat, kombinace BaP a dieselových zplodin u 85 % jedinců.

Následkem působení BaP na kůži jsou různé stupně poškození epidermálních buněk (Siddens 2012) od hyperplazie přes dysplazii až po vznik nádorů (papilomů, bazocelulárního a spinocelulárního karcinomu). Není od věci upozornit, že incidence nemelanomových nádorů kůže u bělochů celosvětově stoupá (Lomas 2012), nejvíce postižených je v Austrálii. V Evropě došlo ke zvýšení incidence bazocelulárního karcinomu z 38,8 případů/100 000 osob/rok v roce 1978 na 115,6 případů/100 000 osob/rok v roce 1994. Nejvyšší incidence spinaliomu v Evropě je udávána ve Švýcarsku – zvýšení incidence z 14,2 případů/100 000 osob/rok v roce 1978 na 28,9 případů/100 000 osob/rok v roce 1997. Příčiny tohoto zvýšení autoři označují jako neznámé, zvýšení je dáváno do souvislosti se změnou životního stylu, vyšší míry slunění, lepší evidence nádorů. Lze spekulovat, že i expozice PAU může tomu zvýšení přispívat. A nemusí jít

vždy jen o dermální expozici, výskyt kožních nádorů byl třetím nejčastějším nádorem (po nádorech jater a žaludku) v dvouletém experimentu sledujícím vliv perorálního podání BaP u potkanů (Wester 2012).

3.4.2 Systémové účinky PAU

Po průniku PAU do organismu je majoritní cesta vstupu již nedůležitá, díky distribuci krevní cestou se PAU dostávají do všech tkání celého organismu (IARC 2010). Další odstavce uvádí výběr z dosud zjištěných poškození tkání díky přítomnosti PAU a jejich metabolitů ve tkáních člověka.

Imunitní systém

Mastrangelo (Mastrangelo 2003a, 2003b) zjistil, že jak inhalace, tak dermální expozice PAU zvyšuje hladiny IgE, zejména u mladších jedinců.

Van Grevenynghe (van Grevenynghe 2003) sledoval vliv vybraných PAU in vitro na monocyty. Zjistil, že dochází ke snížení diferenciace na makrofágy, je snižená endocytóza, fagocytóza, produkce cytokinů. Viabilita buněk poškozena nebyla, fenotypové povrchové markery (CD11b, CD36, CD40, CD14, HLA II) byly přítomny v podobném množství jako u kontrolního vzorku. Pro zajímavost lze uvést, že testovaná dávka benzo[a]pyrenu byla srovnatelná s dávkou nacházející se v mase pečeném na dřevěném uhlí nebo v cigaretovém dýmu.

Karakaya (Karakaya 2004) u lidí profesionálně exponovaných různými koncentracemi PAU zjistil sníženou proliferaci T-lymfocytů a paradoxně zvýšenou aktivitu NK-buněk u lidí s nízkou hladinou expozice PAU.

Negativní vliv PAU byl prokázán při studiu rizik Goeckermanovy terapie (aplikace dehtové masti s následným ozařováním UV lampou) u pacientů s lupénkou (Borská 2006). Byly prokázány změny týkající se imunitního systému a genetické informace buněk. Po terapii došlo ke snížení koncentrace sledovaných imunitních markerů (protilátek třídy IgE, IgM, α_2 -makroglubulinu, transferinu a β_2 -mikroglobulinu). Po terapii bylo též zjištěno významné zvýšení počtu chromosomálních aberací periferních lymfocytů (hodnoceny před a po terapii). V další publikované práci (Borská 2010a) popisují zvýšení markeru svědčícího o poškození DNA buněk – proteinu p53 v plazmě. Nalezli též zvýšení sFasL (indikátoru apoptózy) v séru. Ve studii s dětskými pacienty (Borská 2010b) navíc vyšel pozitivně Amesův test moči.

Fiala (Fiala 2006) sledoval vliv dehtu při Goeckermanově terapii psoriázy na chromozomální aberace periferních lymfocytů. Vyšetřováno bylo 2 000 buněk před léčbou, těsně po ukončení léčby a 78 dní po léčbě. Před léčbou byly aberace přítomny u 0,80 % buněk, těsně po ukončení léčby u 2,05 % buněk a 78 dní po léčbě u 1,05 % testovaných buněk.

Allan (Allan 2006) v pokusech in vitro prokázal inhibiční vliv expozice BaP na B-lymfocyty.

Monteiro (Monteiro 2007) sledoval vliv PAU na membránové proteiny integriny (ITG). Integriny se skládají z 18 α a 8 β podjednotek, které vytváří 24 heterodimerů. Jsou uloženy v extracelulární matrix a účastní se buněčných interakcí – adheze, migrace, proliferace, přežívání buněk. U makrofágů exponovaných BaP dochází ke zvýšení $\beta 7$ ITG a jeho partnerského αE ITG. Integrin $\alpha E\beta 7$ se váže na epiteliální E-cadherin a to může přispívat k prozánětlivému účinku PAU v organismu. Zároveň je třeba zvážit vliv zvýšené exprese c-maf/ $\beta 7$ ITG prokázány u myelomů a T-lymfomů. Vlivem BaP jsou hladiny jiných ITG ($\alpha 11$, αL , $\beta 8$) v makrofázích sniženy, což se podílí na imunosupresním vlivu PAU.

Miller a kol. (Miller 2010) sledovali urinární metabolity PAU u 222 pětiletých newyorkských dětí. Zároveň sledovali hladinu IgE a alergickou anamnézu dětí. Měření ukázalo značnou expozici dětí v městském prostředí a možnou asociaci s alergickou senzitivitou.

Působení PAU na imunitu nemusí být vždy jen negativní, jak v experimentu na myším modelu in vivo prokázali Yusuf a kol. (Yusuf 2007). V počátečních stádiích karcinogeneze PAU interagují s imunitním systémem a ovlivňují buněčnou imunitu prostřednictvím $CD8^+$ T-lymfocytů. Mechanismus působení je přes geny kódující AhR a HLA systém. V experimentu měly myši s defektem těchto genů vyšší výskyt nádorů po aplikaci PAU, zatímco myši s normálními geny měly výskyt nádorů nižší, i přesto, že vazbou na AhR začíná metabolismus PAU na více karcinogenní metabolity.

Dýchací systém

Boffetta (Boffetta 1997) shrnul výskyt nádorových onemocnění u osob vystavených pracovní expozici PAU. Nejčastějším nádorem u nich byl karcinom plic následovaný nádory močového měchýře, dalšími typy nádorů byl laryngální karcinom a nádory ledvin.

Burstyn (Burstyn 2003) zjistil souvislost mezi expozicí PAU u lidí pracujících s asfaltem a úmrtími na nenádorová onemocnění plic (obstrukční choroba plicní, chronická

bronchitida, emfyzém, astma). Provedli analýzu u 58 862 mužů v období 1913–1999. Jejich závěrem bylo, že expozice PAU může přispívat k úmrtím na nenádorová onemocnění plic, ale je zde mnoho faktorů (chybí data o kouření, době expozice), díky kterým nelze vyloučit jiné vysvětlení této souvislosti.

Weiserbs (Weiserbs 2003) jako příčinu vyššího výskytu nádorů plic u Afroameričanů než u ostatních obyvatel USA (bělochů, hispánců) označil vliv polymorfismu glutathion-S-transferázy.

V roce 2004 publikoval Armstrong (Armstrong 2004) metaanalýzu epidemiologických studií o vlivu PAU na karcinom plic. Zjistil, že v největším riziku jsou pracovníci s asfaltem a kominíci.

Mollerup (Mollerup 2006) v průzkumu na kuřácích, bývalých kuřácích a nekuřácích zjistil, že exprese genů pro CYP 1A1 a 1B1 byla výrazně vyšší u současných kuřáků oproti zbývajícím dvěma skupinám. Mezi současnými kuřáky měly ženy v průměru 3,9x vyšší hladinu CYP 1A1 proti mužům, to vysvětluje empirický poznatek, že ženy jsou na vznik nádorů plic citlivější než muži.

BaP též vede ke zvýšení sekrece IL-8 v makrofázích aktivací přes AhR receptor, což u myši vedlo k projevům plicních zánětů (Podechard 2008).

Rosa (Rosa 2011) při sledování dětí prenatálně exponovaných PAU (cigaretovému kouři) zjistil pozitivní asociaci se vznikem astmatu u dětí ve věku 5–6 let.

Kardiovaskulární systém

Ramos (Ramos 2005) podal přehled o vlivu PAU na vznik aterosklerózy. PAU přes CYP 1A a 1B vedou k tvorbě DNA adduktů uvnitř cévní stěny, což vede k vývoji aterosklerotických plaků.

Binková a kol. (Binková 2002) našli statisticky významnou souvislost mezi množstvím DNA adduktů v hladkých svalových buňkách hrudní aorty v souvislosti s aterosklerotickým postižením cév. Existuje dokonce teorie, že aterosklerotické plaky jsou benigní neoplázií arteriální stěny na základě monoklonální proliferace jednotlivých mutovaných buněk hladké svaloviny (Penn 1990).

Burstyn (Burstyn 2005) sledoval vliv expozice PAU na úmrtí na ischemickou chorobu srdeční u 12 367 osob exponovaných asfaltu. Nalezl asociaci mezi touto expozicí a počtem úmrtí na ICHS.

Nervový systém

Ritchie (Ritchie 2001) publikoval přehledovou práci popisující rizika neurotoxicity u vybraných hydrokarbonových paliv, která též obsahují polycyklické aromatické uhlovodíky. U exponovaných osob může docházet k různým projevům z postižení CNS, popisována je zvýšená dráždivost, nervozita, ataxie, ale i křeče, kóma a následná smrt. Tyto potíže jsou však spíše vysvětlovány jako sekundární důsledek hypoxie.

Tang (Tang 2003) testoval toxicitu vybraných PAU (benzo[a]pyren, chrysen, antracen, pentachlorofenol) *in vitro* na SY5Y lidských neuroblastomových buňkách. Porovnávali inkorporaci aminokyselin, obsah proteinů, celkový počet buněk a jejich viabilitu. Nejvíce toxický se ukázal být benzo[a]pyren, naopak antracen byl zcela netoxický ve všech testovaných koncentracích.

Kommaddi (Kommaddi 2007) vzhledem k nálezům CYP1A1 v mozkové tkáni předpokládal aktivaci PAU na karcinogenní metabolity. Jak se však ukázalo, tento mozkový CYP1A1 je odlišný od ostatních CYP1A1 (nacházejících se v játrech, ledvinách, plicích, srdci stejných osob) – má delecii 87 bp exonu 6 a, jak ukázalo modelování *in silico*, nemůže díky tomu vázat BaP v žádné orientaci, která vede k tvorbě karcinogenních metabolitů.

Nádory hlavy a krku

Roos (Roos 2005) zkoumal vliv kouření a alkoholu na vznik nádorů hlavy a krku. Zjistil, že k těmto onemocněním jsou zejména citliví lidé s enzymem CYP1B1*3/*3. Vycházel při tom z práce Thiera (Thier 2002), který popsal souvislost CYP1B1*3 s výskytem nádorů hlavy a krku (hrtan, hltan, nosohltan, dutina ústní) u kuřáků, tato souvislost nebývá u profesionální expozice PAU.

Souvislost mezi benzo[a]pyren-diolepoxydovými addukty a sqaumózním karcinomem hlavy a krku potvrdila také studie provedená u 803 pacientů s tímto onemocněním oproti 839 kontrolním osobám (Li 2007).

Nádory prsu

Kouření jako významný zdroj PAU ve spojení s náhradní hormonální terapií (hormone replacement therapy, HRT) je spojeno s vyšším rizikem vzniku karcinomu prsu. Může se zde uplatňovat vliv podávaných hormonů na polymorfismus enzymů (Roos 2005).

Vondráček (Vondráček 2002) zjistil, že PAU aktivují estrogenový receptor v in vitro kultuře buněk lidského karcinomu prsu MCF-7 a tím přispívají ke vzniku karcinogenního bujení.

Zažívací trakt

Chen (Chen 2002) hledal souvislost mezi PAU-DNA addukty a nádory jater. Nalezl vyšší výskyt DNA adduktů ve tkáni jater u lidí s hepatocelulárním karcinomem (v nádorových i okolních buňkách), než u lidí bez nádoru. Riziko vzniku nádoru bylo ještě vyšší, pokud byl daný člověk HBsAg pozitivní.

Li (Li 2003) zkoumal vliv kouření a konzumace určitých složek potravy na karcinomy slinivky břišní a tlustého střeva. V příslušných tkáních exponovaných jedinců našel vyšší výskyt DNA adduktů.

Souvislost mezi expozicí PAU a nádory zažívacího traktu byla prokázána i v následujících epidemiologických studiích. Anderson (Anderson 2005) prokázal souvislost mezi konzumací smaženého a grilovaného masa a nádory exokrinní pankreatické tkáně, Sinha (Sinha 2005) v epidemiologické studii, prováděné formou dotazníkového šetření výživových zvyklostí se zaměřením na příjem PAU, prokázal souvislost výživy a kolorektálních adenomů.

Vylučovací systém

Ross (Roos 2005) zjistil, že epitelové buňky močového měchýře obsahují enzymy CYP 1B1 a 4B1 a že zde dochází k aktivaci arylaminů, PAU a nitrosaminů. Vzniklé addukty vedou k tvorbě nádorů močového měchýře.

Burstyn a kol. (Burstyn 2007) provedli analýzu zdravotního stavu u 7 298 mužů, kteří byli v letech 1913–1999 exponováni asfaltu. Našli 48 karcinomů močového měchýře, 39 z nich bylo exponováno před dobou delší než 15 let před diagnózou. Statisticky nebylo možno potvrdit ani přítomnost ani absenci kauzálního vztahu mezi expozicí PAU a vznikem nádoru močového měchýře.

Fiala (Fiala 2006) při hodnocení vlivu Goeckermanovy terapie lupénky na přítomnost metabolitů PAU v moči zjistil, že u všech testovaných osob došlo ke zvýšení metabolitů v moči. Tato zvýšení výrazně převyšovala průměry neexponované populace, což svědčí o zvýšeném riziku možné karcinogeneze u těchto osob. Zvýšení trvá po dobu léčby, po ukončení léčby se hodnoty postupně vrací na výchozí úroveň.

Reprodukce

Vlivem PAU na mužskou reprodukci se zabýval Gaspari (Gaspari 2003). Expozice PAU se na spermiích projevila morfologicky (abnormality hlavičky spermie) a zvýšením PAU-DNA adduktů (byly zvýšeny u mužů s pracovní expozicí PAU, u kuřáků ne). Selevan a kol. (Selevan 2000) sledovali kvalitu spermií u mladých českých mužů. U populace exponované environmentálnímu znečištění PAU (okolí Teplic) byla kvalita zejména v zimním období horší než u mužů žijících v čistém prostředí (okolí Prachatic).

Xia a kol. (Xia 2009) porovnávali vybrané urinární metabolity PAU u 513 mužů s idiopatickou infertilitou s hladinami těchto metabolitů u 273 zdravých fertálních mužů. Prokázali souvislost mezi zvýšenou hladinou metabolitů PAU, zvýšenou hladinou 1-hydroxypyrenu a 2-hydroxyfluorenem a výskytem idiopatické mužské infertility.

Rybicki (Rybicki 2006) prokázal tvorbu DNA adduktů u nádorů prostaty. Nock (Nock 2007) sledoval u pacientů s nádory prostaty vliv polymorfismu genů pro CYP1A1, CYP3A4, mikrosomální epoxidovou hydrolázu a glutathion-S-transferázu. Hodnotil též jejich vliv na tvorbu DNA adduktů. Nalezli odlišnosti způsobené vlivem kouření (kuřáci-běloši měli adduktů vždy více než nekuřáci) a též vlivem rasy (Afroameričané měli méně adduktů v nádorových buňkách).

Vývojová toxicita

Hatch (Hatch 1990) hledal DNA addukty ve tkáních spontánně potracených plodů. Nalezl je ve 43 % placent, 27 % jater a 42 % plic. Všechny ženy udávaly nekouření v době těhotenství. Výsledky ukazují, že fetální tkáně jsou terčem pro poškození díky expozici PAU.

Manchester (Manchester 1992) našel vyšší výskyt PAU-DNA adduktů v placentách žen kuřáček.

Dejmek a kol. (Dejmek 2000) sledovali vztah mezi intrauterinní růstovou retardací a inhalační expozicí částicím prachu PM₁₀ (menší než 10 μm) a PM_{2,5} (menší než 2,5 μm), na které jsou PAU vázány. Došli k závěru, že expozice PAU v období časně gestace ovlivňuje fetální růst.

Expozice PAU v prenatálním a časně postnatálním období poškozuje správný vývoj dítěte, jak bylo prokázáno v mnoha epidemiologických studiích i při pokusech na zvířatech. Expozice v této době může kriticky změnit normální vývoj metabolických, imunitních a neurologických funkcí pro celý život jedince. Důvodem je vyšší proliferace

buněk, nezralý vyvíjející se imunitní systém, snížená schopnost detoxikovat karcinogeny a opravovat DNA poškození (Pinkerton 2006).

Studie z Polska (Perera 1998) zjistila, že novorozenci s větším množstvím lymfocytárních DNA-adduktů mají nižší porodní hmotnost, porodní délku a obvod hlavy. Jiná studie stejné autorské skupiny (Choi 2008) provedená v USA prokázala vyšší riziko potratu, předčasného porodu, nízkou porodní hmotnost, restrikcí intrauterinního růstu u dětí, které byly prenatálně vystaveny vyšší expozici PAU.

V testech na krysím modelu byla po expozici samic vybraným zástupcům PAU (benzo[a]pyrenu a 7,12-dimethyl-benz[a]antracenu) v období organogeneze zjištěna u mláďat zvýšená lomivost krevních cév a s ní spojené různé hemoragie, horší placentární funkce, snížená porodní hmotnost a délka mláďat. Zvláště citlivý je nervový systém, kde např. transplacentární expozice BaP vedla k signifikantně nižší regulaci N-metyl D-aspartát receptorové subjednotky 1 v hippocampu, což má vztah k horší dlouhodobé paměti a procesu učení (Wormley 2004).

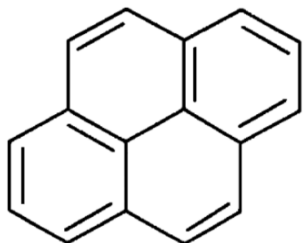
Zrak

Gallenga (Gallenga 1994) srovnával množství PAU ve zdravých a šedým zákalem poškozených očních čočkách. Nalezli významně vyšší množství PAU v kataraktických čočkách ($p < 0,01$), zejména se jednalo o fenantren a 1,2 benzantracen. Autoři vyslovili názor, že metabolismus přítomných PAU může poškozovat čočku a vést ke vzniku šedého zákalu.

4. Základní charakteristiky vybraných zástupců PAU

Pyren

Obr. 22. Strukturální vzorec pyrenu



Zdroj: ATSDR 1995

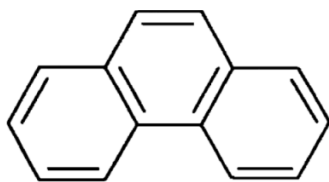
Jako první zástupce skupiny polycyklických aromatických uhlovodíků byl pro zavedení metodiky transdermální absorpce vybrán pyren. Pyren je standardní součástí směsí PAU vyskytujících se v životním nebo pracovním prostředí člověka. Při monitorování prostředí se stanovují koncentrace pouze některých PAU (cca 10–20), pyren je vždy součástí tohoto souboru (ATSDR 1995, US EPA 2008). Je též doporučován a používán jako biomarker obecné expozice PAU (Castano-Vinyals 2004). Jeho výhodou je i to, že není karcinogenní a proto s ním lze pracovat za běžných laboratorních podmínek.

Molekula pyrenu je tvořena čtyřmi kondenzovanými benzenovými jádry (Obr. 22), která jsou uspořádána tak, že nedochází ke vzniku reaktivních struktur, tzv. zátoky nebo fjordu (viz Obr. 21). Díky tomu se jedná o poměrně stabilní sloučeninu s nízkou mírou nebezpečnosti pro zdraví člověka. Sumární vzorec pyrenu je $C_{16}H_{10}$, číslo CAS 129-00-0. Pyren patří mezi „malé“ sloučeniny, jeho molekulární hmotnost je 202,26. Hustota pyrenu je 1,27 g/ml. Za pokojové teploty se vyskytuje v podobě bezbarvého nebo žlutého prášku, taje při 156 °C, teplota varu je 360 °C. Rozpustnost ve vodě je malá (0,135 mg/l, Lu 2008), dobře se rozpouští v acetonu, etanolu, éteru, benzenu, sirouhlíku (ATSDR 1995). Rozdělovací koeficient oktanol/voda $\log K_{o/w}$ je 4,88 (ATSDR 1995). Je nehořlavý. Má schopnost fluorescence, excituje se světlem o vlnové délce 335 nm a emituje světlo o vlnové délce 371 nm (Ikeda 2008).

Fenantren

Fenantren (Obr. 23) je tvořen třemi kondenzovanými jádry, jejichž uspořádání vytváří tzv. bay region (zátoku), strukturu asociovanou s karcinogenními účinky PAU. Fenantren je nejjednodušší zástupce ze skupiny PAU, který tuto strukturu obsahuje. Je to bezbarvá krystalická látka špatně rozpustná ve vodě (1,29 mg/l, Lu 2008), dobře se rozpouští v ledové kyselině octové a organických rozpouštědlech, např. v etanolu, benzenu, toluenu, diethyl éteru (ATSDR 1995).

Obr. 23. Strukturní vzorec fenantrenu

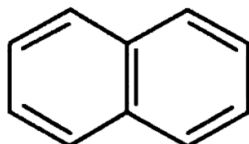


Zdroj: ATSDR 1995

Sumární vzorec je $C_{14}H_{10}$, číslo CAS 85-01-8. Molekulární hmotnost fenantrenu je 178,233 g/mol, hustota $1,06 \text{ g/cm}^3$ ($t=20 \text{ }^\circ\text{C}$), teplota tání $99\text{--}101 \text{ }^\circ\text{C}$, teplota varu $340 \text{ }^\circ\text{C}$ (EuroChem). Má schopnost fluorescence, excituje se světlem o vlnové délce 294 nm, emituje světlo o vlnové délce 363 nm (Ikeda 2008). Rozdělovací koeficient oktanol/voda $K_{o/w}$ je 4,45 (ATSDR 1995).

Naftalen

Obr. 24. Strukturní vzorec naftalenu

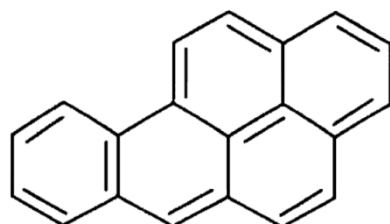


Zdroj: ATSDR 1995

Naftalen (Obr. 24) je nejmenším zástupcem ze skupiny PAU. Jeho molekula je tvořena pouze dvěma kondenzovanými aromatickými kruhy. Jedná se o pevnou bílou krystalickou látku, při pokojové teplotě se vypařující s charakteristickým zápachem naftalínu. Je málo rozpustný ve vodě ($31,7 \text{ mg/l}$), je však dobře rozpustný v organických rozpouštědlech, např. v benzenu, toluenu, éteru (Lu 2008). Je hořlavý, výpary a prach mohou se vzduchem vytvářet výbušnou směs. Jeho sumární vzorec je $C_{10}H_8$, číslo CAS 91-20-3. Molekulární hmotnost naftalenu je $128,173 \text{ g/mol}$, teplota tání $80\text{--}82 \text{ }^\circ\text{C}$, teplota varu $217,9 \text{ }^\circ\text{C}$. Hustota naftalenu je $0,99 \text{ g/cm}^3$ (EuroChem). Rozdělovací koeficient oktanol/voda $\log K_{o/w}$ se rovná 3,33 (de Maagd 1998). Má schopnost fluorescence, excituje se světlem o vlnové délce 275 nm, emituje světlo o vlnové délce 332 nm (Frasch 2009).

Benzo[a]pyren

Obr. 25. Strukturní vzorec benzo[a]pyrenu



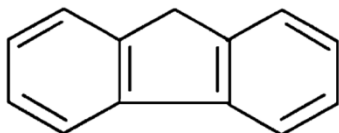
Zdroj: ATSDR 1995

Benzo[a]pyren (BaP, Obr. 25) je za pokojové teploty žlutavá krystalická látka vytvářející plátky nebo jehličky. Je prakticky nerozpustný ve vodě ($0,0038 \text{ mg/l}$), dobře se rozpouští v metanolu, etanolu, benzenu, toluenu, xylenu a éteru (Lu 2008). Jeho molekula je tvořena pěti aromatickými kruhy, které ve své struktuře obsahují tzv. „zátoku“, strukturu zodpovědnou za karcinogenní účinky PAU. Sumární

vzorec je $C_{20}H_{12}$, číslo CAS 50-32-8. Molekulární hmotnost je 252,319 g/mol, hustota 1,351 g/cm³. Teplota tání BaP je 176,5 °C, teplota varu 475 °C. Koeficient log $K_{o/w}$ je 6,06, což svědčí o jeho malé schopnosti dermální absorpce (ATSDR 1995).

Fluoren

Obr. 28. Strukturální vzorec fluorenu

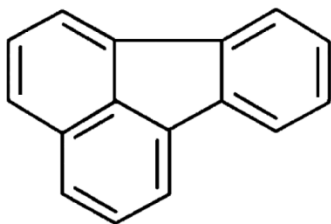


Zdroj: ATSDR 1995

Fluoren (Obr. 28) je za pokojové teploty bílá krystalická látka se zápachem připomínajícím naftalen. Není čistě kondenzovaným polycyklickým aromatickým uhlovodíkem, v jeho stavbě je mezi dva aromatické kruhy vmezeřen jeden atom uhlíku. Sumární vzorec je $C_{13}H_{10}$, číslo CAS 86-73-7. Molekulární hmotnost je 166,2 g/mol, hustota 1,2 g/cm³. Teplota tání fluorenu je 112–115 °C, teplota varu 295 °C (EuroChem). Fluoren má schopnost fluorescence (od toho je odvozen jeho název), excituje se při 264 nm, emituje při 301 nm (Ikeda 2008). Je málo rozpustný ve vodě (1,98 mg/l), dobře se rozpouští v acetonu, benzenu, éteru, ledové kyselině octové (Lu 2008). Koeficient log $K_{o/w}$ je 4,18 (ATSDR 1995).

Fluoranten

Obr. 29. Strukturální vzorec fluorantenu



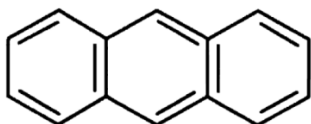
Zdroj: ATSDR 1995

Fluoranten (Obr. 29) se skládá z benzenové a naftalenové jednotky dohromady spojené pětiuhlíkovým kruhem. Za pokojové teploty se vyskytuje ve formě bezbarvých nebo nažloutlých krystalků nebo jehliček. Jeho sumární vzorec je $C_{16}H_{10}$, číslo CAS 206-44-0. Teplota tání je 109–110 °C, teplota varu 384 °C. Molekulární hmotnost je 202,258 g/mol, hustota 1,252 g/cm³. Rozdělovací koeficient oktanol/voda log $K_{o/w}$ je 4,9 (ATSDR 1995). Má schopnost fluorescence (EuroChem). Ve vodě je prakticky nerozpustný (0,26 mg/l), je rozpustný v etanolu, etyléteru, benzenu, chloroformu, sirouhlíku a ledové kyselině octové (Lu 2008).

Antracén

Za pokojové teploty je čistý antracén (Obr. 30) bezbarvá krystalická látka, která na světle tmavne. Je tvořen třemi aromatickými kruhy, které jsou uspořádány v řadě za sebou, takže nevytváří nebezpečné regiony (fjord nebo zátoku). Sumární vzorec je $C_{14}H_{10}$, číslo

Obr. 30. Strukturální vzorec antracenu

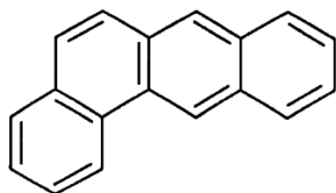


Zdroj: ATSDR 1995

CAS 1120-12-7. Molekulární hmotnost antracenu je 178,24, hustota 1,25 g/cm³. Taje při 216–218 °C, bod varu je 342 °C. Je málo rozpustný ve vodě (0,073 mg/l), dobře se rozpouští v etanolu, metanolu, benzenu, toluenu, sirouhlíku, hůř v acetonu (Lu 2008). Koeficient log K_{o/w} je 4,45 (ATSDR 1995). Má schopnost fluorescence, excituje se při 250 nm.

Benz[a]antracen

Obr. 31. Strukturální vzorec benz[a]antracenu



Zdroj: ATSDR 1995

Benz[a]antracen (Obr. 31) je tvořen čtyřmi kondenzovanými kruhy, které vytváří reaktivní „bay-region“, strukturu spojenou s vyšší karcinogenitou sloučenin PAU. Za pokojové teploty je benz[a]antracen žlutozelená krystalická látka. Sumární vzorec je C₁₈H₁₂, číslo CAS 55-56-3. Molekulární hmotnost benz[a]antracenu je 228,29, hustota 1,19 g/cm³. Taje při 160,7 °C, bod varu je při 438 °C. Je špatně rozpustný ve vodě (0,014 mg/l), dobře rozpustný je ve většině organických rozpouštědel (Lu 2008). Rozdělovací koeficient oktanol/voda Log K_{o/w} je 5,61 (ATSDR 1995).

PRAKTICKÁ ČÁST

5. Materiál a metodika

5.1 Chemikálie a spotřební materiál

Chemikálie potřebné pro provedení testů transdermální absorpce: antracen (kat. č. 10580), benz[a]antracen (kat. č. B2209), benzo[a]pyren (kat. č. B1760), fenantren (kat. č. 77470), fluoranten (kat. č. 423947), fluoren (kat. č. 128333), kofein (kat. č. 27600), naftalen (kat. č. 84679), pyren (kat. č. 82648), aceton (kat. č. 34 850), Hanksův roztok (kat. č. H8264), gentamicin (kat. č. G1264) a bovinní sérový albumin (kat. č. A9418) byly dodány firmou Sigma-Aldrich spol. s r.o., Praha. Dále byl použit NaCl p. a. (Lachema, Brno) a slunečnicový olej (*Oleum helianthi*) zakoupený v lékárně. Fyziologický roztok (0,9% NaCl) byl připravován v laboratoři. Všechny použité chemikálie byly v čistotě vhodné pro fluorescenci, HPLC nebo tkáňové kultury.

Chemikálie pro analytické účely: acenaften (Sigma-Aldrich); 1-naphtol-2,3,4,5,6,7,7,8-d7 (ISOTEC), etylacetát PESTANAL (Fluka), n-hexan (iso-hexanes, PESTANAL, Fluka), směs BSTFA+TMCSi (Sigma-Aldrich), acetonitril HPLC pro UV/Gradient Grade (J. T. Baker) a ledová kyselina octová p. a. (Merck). K produkci ultračisté vody sloužila stanice SYNERGY UV (Millipore).

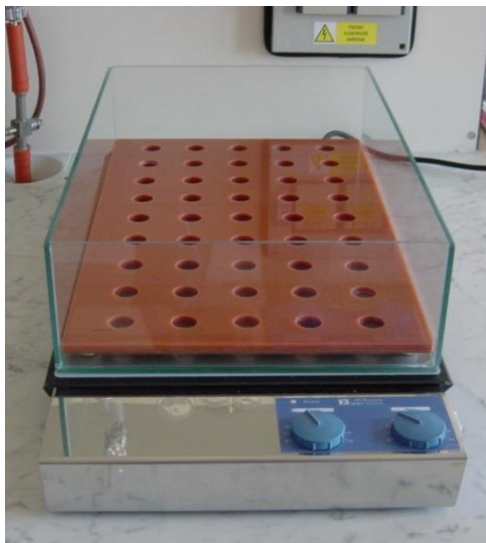
Spotřební materiál: nastavitelné mechanické pipety Biohit mLINe s originálními špičkami Optifit (Sartorius), jednorázové injekční stříkačky o objemu 10 ml (Chirana), polyetylenové Pasteurovy pipety (kat. č. K082337, dodavatel P-lab Praha), polypropylenové zkumavky Eppendorf 3810X o objemu 1,5 ml (kat. č. 344700, dodavatel Eppendorf).

5.2 Přístroje

Základem testovacího zařízení bylo plošné magnetické míchadlo s ohřevem IKAMAG-RT 15 (výrobce IKA-Werke GmbH&Co KG, Staufen, Německo; dodavatel: Fischer Scientific, Pardubice, katalogové číslo 6111.2015) a silnostěnný skleněný box zakoupený v maloobchodní síti (Obr. 32).

K míchání receptorové tekutiny v difúzních komůrkách sloužila válcová magnetická míchadla se středovým prstýnkem (dodavatel Fischer Scientific, Pardubice,

Obr. 32. Základní aparatura



Legenda: Aparatura k provádění testů transdermální absorpce: magnetické míchadlo s ohřevem IKAMAG-RT 15 (Fischer Scientific, Pardubice) a skleněná nádoba s plastovým držákem na difúzní komůrky. Zdroj: vlastní fotografie

kat. č. 6116.0803). Plastový držák na difúzní komůrky vyrobili pracovníci provozně-technického oddělení Lékařské fakulty UK v Hradci Králové. Teplota kožního povrchu vzorků byla měřena dotykovým teploměrem Oberflächen-Thermosstick DOT 150 (výrobce Voltcraft, Conrad Electronic GmbH, Německo; dodavatel I & CS s.r.o., Třebíč). Epidermální ztráta vody (TEWL) byla měřena přístrojem MPA-5 (výrobce Courage+Khazaka, Köln, Germany; dodavatel Syncare Plus, s.r.o, Brno, Obr. 33-a). Transdermální elektrický odpor (TER) byl stanovován pomocí přístroje TECPEL LCR 612 (výrobce Tecpel Co., Taiwan; dodavatel: I & CS s.r.o., Třebíč,

Obr. 33-b). Chlupy byly z povrchu kůže odstraňovány stříhacím strojkem Silver Crest (Hair & Beard Clippers, zakoupen v řetězci Lidl).

Obr. 33. Přístroje k měření TEWL a TER



a)



b)

Legenda: a) Přístroj na měření transepidermální ztráty vody (TEWL) – MPA 5 (Courage+Khazaka, Köln, Germany); b) přístroj k měření transdermálního elektrického odporu (TER) – TECPEL LCR 612 (Tecpel Co, Taiwan). Zdroj: vlastní fotografie

Pro analytické účely byly využívány vortex BenchMixer, Model BV1010 (Labicom), vortex REAX Control (Heidolph), a centrifuga ROTINA 380 (Hettich). Při

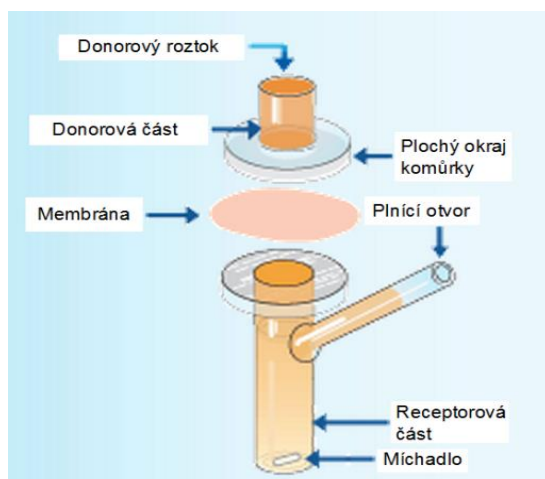
provádění testu rozpustnosti PAU v receptorové tekutině byla použita třepací vodní lázeň GFL-1083 (GFL).

Při pilotních experimentech byl pyren v receptorové tekutině stanovován pomocí kapilární plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS), pracující na principu iontové pasti s vnější ionizací a možností skenu MS^n (Focus- ITQ 1100, Thermo Fischer Scientific). U následných experimentů byla využita vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC). Použitý HPLC systém Prominence (výrobce Shimadzu, Japonsko) se skládal z vysokotlaké pumpy LC20AD opatřené čtyřcestným nízkotlakým ventilem a degaserem DGU-20A₅, autosampleru SIL-20AC, termostatu kolon CTO-20AC a fluorescenčního detektoru RF-10AXL. Pro stanovení kofeinu byla užita UV detekce (PDA detektor SPD-M20A). K ovládání HPLC systému, sběru a zpracování primárních dat byl užit software LC Solution (Shimadzu).

K dalšímu hodnocení výsledků analýz a k tvorbě grafů byl použit stolní počítač DELL s operačním programem Windows 2007 a programem Excel 2010, ke statistické analýze výsledků potom program NCSS 2007.

5.3 Testovací zařízení

Obr. 34. Schéma statické difúzní komůrky



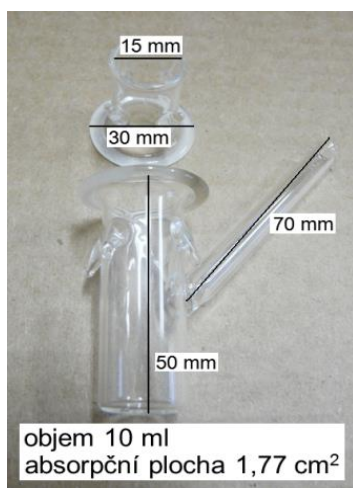
Zdroj: modifikováno dle <http://www.permeGear.com/franz.htm>

Transdermální absorpce pyrenu byla testována pomocí upravených vertikálních statických difúzních „Franzových“ komůrek (Franz 1975). Jejich tvar a velikost byly modifikovány dle komerčních produktů firmy PermeGear Inc. USA (dostupné na <http://www.permeGear.com/franz.htm>, Obr. 34) a dle informací z odborné literatury. Průměr skleněné válcové nádoby byl 1,5 cm; obsah penetrační plochy 1,77cm² a objem receptorové části komůrky 10 ml. Komůrky vyrobila firma

Laboratorní sklo Jiří Pokorný, Hradec Králové (Obr. 35). Velikost komůrek odpovídala požadavkům směrnice Evropské komise (EU SCCP 2006) na minimální velikost absorpční plochy (0,64 cm²). Jak je vidět na obrázku, donorová i receptorová část difúzní komůrky

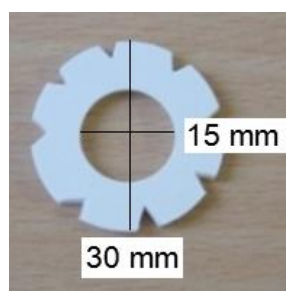
má v místě kontaktu (kam je vkládán vzorek kůže) oblý vnitřní okraj (Obr. 35). K přesnějšímu vymezení penetrační plochy kůže byly užity 3 mm silné kroužky ze silikonové gumy (materiál Řempe Holoubek a.s., Hradec Králové; kroužky byly vyrobeny pracovníky provozně-technického oddělení Lékařské fakulty UK v Hradci Králové; Obr. 36). Vnější průměr kroužků byl 3 cm, vnitřní 1,5 cm. Kroužky se vkládaly se na horní stranu kůže mezi donorovou a receptorovou část difúzní komůrky. Pro lepší fixaci obou částí komůrky pomocí pryžových spon byly do okrajů kroužků vystříženy trojúhelníkové zářezy.

Obr. 35. Donorová (nahore) a receptorová (dole) část komůrky



Zdroj: vlastní fotografie

Obr. 36. Kroužek ze silikonové gumy



Legenda: Kroužek k vymezení penetrační plochy, vnější průměr 3 cm, vnitřní průměr 1,5 cm, tloušťka 3 mm.
Zdroj: vlastní fotografie

5.4 Kůže

Jako penetrační membrána byla použita kůže z ušního boltce prasete domácího (*Sus scrofa f. domestica*). Na obrázku 37 je zachycena zadní plocha omytého, neostříhaného ušního boltce (vlevo) a odpreparované kůže z tohoto boltce (vpravo).

Boltce byly zakoupeny na lokálních jatkách a zpracovány do 24 hodin od usmrcení zvířete. Vzorky pocházely od obou pohlaví. Prasata přicházející na jatka byla v porážkovém věku okolo šesti měsíců s hmotností zhruba 80 kg. Boltce byly odebírány ihned po usmrcení a vykrvení prasete (před spařením vařící vodou). Na našem pracovišti byly omyty vlažnou tekoucí vodou a tekutým kosmetickým mýdlem a zbaveny viditelných chlupů (ostříháním nůžkami nebo elektrickým strojkem). Potom byla pomocí chirurgického skalpelu a pinzety odpreparována kůže na zadní straně boltce. Vzorky kůže

byly zabaleny jednotlivě do aluminiové folie a zamraženy při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. V experimentech byly používány vzorky kůže skladované po dobu jednoho dne až šesti měsíců.

Obr. 37. Ušní boltce (vlevo) a odpreparované kůže z tohoto boltce (vpravo)



Zdroj: vlastní fotografie

V den zahájení experimentu byly vzorky kůže přeneseny do chladničky k šetrnému rozmražení při cca $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byla provedena vizuální kontrola stavu a vyhovující vzorky kůže byly rozděleny na menší části, které byly instalovány do difúzních komůrek. Testování absorpce bylo prováděno přes plnou (nedermatomovanou) kůži.

5.5 Receptorová tekutina a rozpustnost PAU

Pro výběr receptorové tekutiny je rozhodující rozpustnost dané testované látky ve vodě. Kofein je látka ve vodě dobře rozpustná ($\log K_{o/w} = -0,07$), a proto v jeho případě stačil fyziologický roztok. S ohledem na dobu trvání experimentů (24 h) nebylo nutné přidávat antibiotika.

Tab. 3. Vybrané fyzikálně chemické vlastnosti PAU

PAU	Log $K_{o/w}$	Rozpustnost ve vodě (mg/l)
naftalen	3,33	31,7
fluoren	4,18	1,98
antracen	4,45	0,073
fenantren	4,45	1,29
pyren	4,88	0,135
fluoranten	4,90	0,26
benz[a]antracen	5,61	0,014
benzo[a]pyren	6,06	0,0038

Legenda: vybrané vlastnosti PAU - rozdělovací koeficient oktanol / voda ($\log K_{o/w}$); (ATSDR 1995), rozpustnost ve vodě (mg/l); (Lu 2008).

Polyaromáty patří mezi látky lipofilní ($\log K_{o/w} > 3$) s velmi malou rozpustností ve vodě (Tab. 3). V jejich případě se stal základem receptorové tekutiny Hanksův roztok (složení viz Tab. 4). Dalšího požadovaného zvýšení rozpustnosti PAU ve vodném prostředí bylo dosaženo přidávkem 4 % bovinního sérového albuminu (Cross 2003, Sartorelli 1998). Pokud plánovaná doba trvání experimentu přesáhla 24 hod, byl jako prevence proti mikrobiální infekci přidán gentamicin v koncentraci 50 mg/l (Ng 1992, Sartorelli 1998).

Tab. 4. Složení Hanksova roztoku

Látka	Koncentrace (g/l)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,185
MgSO ₄ (anhyd)	0,09767
KCl	0,4
KH ₂ PO ₄ (anhyd)	0,06
NaHCO ₃	0,35
NaCl	8
Na ₂ HPO ₄ (anhyd)	0,04788
D-glukóza	1

Legenda: Složení Hanksova roztoku, dodavatel Sigma, kat.č. H8264, (zdroj: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Formulation/h9269for.pdf>)

Před vlastními experimenty bylo provedeno testování rozpustnosti PAU (individuálně nebo ve směsích) v receptorové tekutině (nutné pro zachování „sink conditions“ v průběhu experimentů). K substanci (substancím) polyaromátů ve 25 ml Erlenmayerově baňce bylo přidáno 10 ml receptorové tekutiny a baňka byla třepána 66 h na vodní třepací lázni GFL 1083 vytemperované na 37 °C. Odběry cca 1 ml vzorku byly prováděny v intervalech 18, 42 a 66 hodin. Odebraný podíl byl zfiltrován (filtr Corning 431212; membrána z regenerované celulózy o porozitě 0,2 µm). Filtrát byl rozpipetován po 0,1 ml do dvou 10 ml odměrných baněk, tyto doplněny po značku čistou receptorovou tekutinou a ponechány stát přes noc ve tmě. Podíly (0,2 ml) odebrané z odměrných baněk do 1,5 ml zkumavek Eppendorf byly do doby analýzy uchovávány při –20 °C. Stanovení polyaromátů ve vzorcích receptorové tekutiny bylo prováděno níže popsanou HPLC metodou. K 0,2 ml vzorku bylo přidáno 0,3 ml deproteinačního činidla, tj. acetonitrilu obsahujícího acenaften v koncentraci 3,0 µmol/l (stanovení naftalenu, fenantrenu, pyrenu, benzo[a]pyrenu), resp. benzo[a]pyren v koncentraci 200 nmol/l (stanovení fluorenu, antracenu, fluorantenu a benz[a]antracenu). Na kolonu bylo nanášeno 10 µl supernatantu. Kalibrační řady byly připraveny v receptorové tekutině v rozsahu koncentrací 1,2 až

30 $\mu\text{mol/l}$ (naftalen), 0,6 až 15 $\mu\text{mol/l}$ (fenantren, fluoren, fluoranten), 0,2 až 5 $\mu\text{mol/l}$ (pyren), 0,04 až 1 $\mu\text{mol/l}$ (antracen) a 0,02 až 0,5 $\mu\text{mol/l}$ (benz[a]antracen, benzo[a]pyren).

Rozpustnost v receptorové tekutině byla testována pro každý vybraný polyaromát i pro jejich směsi (v kombinacích dále aplikovaných na kůži). Odvažována byla ekvimolární množství polyaromátů tak, aby při jejich úplném rozpuštění v 10 ml receptorové tekutiny bylo dosaženo koncentrace 3,75 mmol/l. Z tabulky (Tab. 5) je patrné, že navážka substance byla dostatečná, neboť v žádném případě nedošlo k jejímu úplnému rozpuštění. V jednom experimentu byla testována vždy čtveřice polyaromátů a jejich směs (po jedné Erlenmayerově baňce), daný experiment byl dvakrát opakován.

Výsledky testu rozpustnosti jednotlivých PAU (u každého vzorku $n = 6$) shrnuje tabulka 5, výsledky testu rozpustnosti směsí PAU ($n = 6$) shrnuje tabulka 6. Koncentrační

Tab. 5. Výsledky rozpustnosti jednotlivých PAU v receptorové tekutině

PAU jednotlivě	Průměrná koncentrace PAU v RT ($\mu\text{mol/l}$)					
	po 18 h		po 42 h		po 66 h	
	aritmetický průměr	variační koeficient (%)	aritmetický průměr	variační koeficient (%)	aritmetický průměr	variační koeficient (%)
Naftalen	1557,73	5,52	1471,09	9,20	1665,25	3,06
Fenantren	478,72	8,03	483,51	7,20	464,45	1,59
Pyren	131,98	13,81	151,59	11,73	160,29	13,91
BaP	4,40	11,34	5,94	6,72	7,32	11,93
Fluoren	437,57	13,50	433,47	3,42	439,14	8,42
Fluoranten	307,86	4,33	317,69	2,71	329,13	10,37
Antracen	21,58	12,07	24,36	10,50	25,12	12,41
BaA	18,21	7,96	18,05	7,28	18,32	6,78

Legenda: BaP = benzo[a]pyren, BaA = benz[a]antracen

Tab. 6. Výsledky testu rozpustnosti směsí PAU v receptorové tekutině

PAU směsi	Průměrná koncentrace PAU v RT ($\mu\text{mol/l}$)					
	po 18 h		po 42 h		po 66 h	
	aritmetický průměr	variační koeficient (%)	aritmetický průměr	variační koeficient (%)	aritmetický průměr	variační koeficient (%)
Naftalen	1280,90	7,77	1359,83	7,88	1556,43	4,12
Fenantren	252,48	8,23	256,40	12,06	254,62	12,06
Pyren	69,81	7,18	76,99	9,03	80,50	7,89
BaP	9,59	8,38	10,72	4,89	10,85	6,26
Fluoren	361,12	10,90	386,29	11,89	401,42	22,96
Fluoranten	223,30	6,14	270,23	2,35	274,28	5,58
Antracen	16,81	12,47	18,22	12,47	18,22	18,09
BaA	16,07	19,72	15,95	6,66	15,60	11,63

Legenda: BaP = benzo[a]pyren, BaA = benz[a]antracen

hodnoty se týkají rozpustností zjištěných po 18, 42 a 66 hodinách rozpouštění (třepání).

Porovnání experimentálně zjištěných hodnot maximální rozpustnosti PAU s hodnotami naměřenými při analýze receptorové tekutiny v průběhu testů transdermální absorpce udává tabulka 7.

Tab. 7. Porovnání rozpustností PAU v RT a rozpětí koncentrací PAU naměřené v RT při testech transdermální absorpce

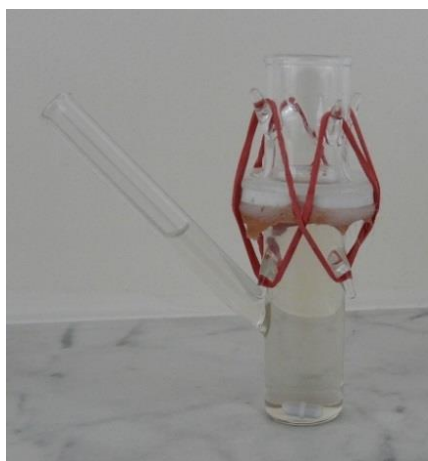
PAU	Samostatná aplikace		Aplikace směsi	
	Maximální koncentrace ($\mu\text{mol/l}$) v RT změřená v testu rozpustnosti po 66 h	Rozpětí koncentrací ($\mu\text{mol/l}$) v RT při testu transdermální absorpce (po 72 h)	Maximální koncentrace ($\mu\text{mol/l}$) v RT změřená v testu rozpustnosti po 66 h	Rozpětí koncentrací ($\mu\text{mol/l}$) v RT při testu transdermální absorpce (po 72 h)
Naftalen	1713,38	0,68 - 2,25	1682,48	0,48 – 2,29
Fenantren	474,96	0,29 - 3,73	296,20	0,13 – 2,19
Pyren	190,26	0,25 - 1,94	92,43	0,02 – 0,43
BaP	8,605	0,004 – 0,010	11,992	0 – 0,002
Fluoren	498,04	0,08 – 0,41	519,27	0,11 – 0,69
Fluoranten	373,65	0,01 – 2,67	292,43	0,12 – 0,65
Antracen	29,21	0,13 – 0,52	22,28	0,03 – 0,17
BaA	19,97	0,001 – 0,060	17,77	0,001 – 0,003

5.6 Metodika testování transdermální absorpce in vitro

Rozmražené, vizuálně zkontrolované vzorky plné kůže zadní plochy ušního boltce prasete byly zamontovány mezi donorovou a receptorovou část difúzní komůrky (epidermální stranou kůže nahoru). Mezi donorovou část komůrky a kůži byl vložen vymezovací kroužek ze silikonové gumy, který sloužil k přesnému ohraničení penetrační

plochy. Spojení donorové a receptorové části bylo zajištěno pomocí pryžových spon, které zabezpečily těsné přilnutí všech částí penetračního zařízení. Do receptorové části komůrky (objem 10 ml) bylo vloženo magnetické míchadlo a následně byla akceptorová část pomocí jednorázové injekční stříkačky naplněna receptorovou tekutinou tak, aby pod membránou nezůstaly žádné bublinky vzduchu.

Obr. 38. Difúzní komůrka



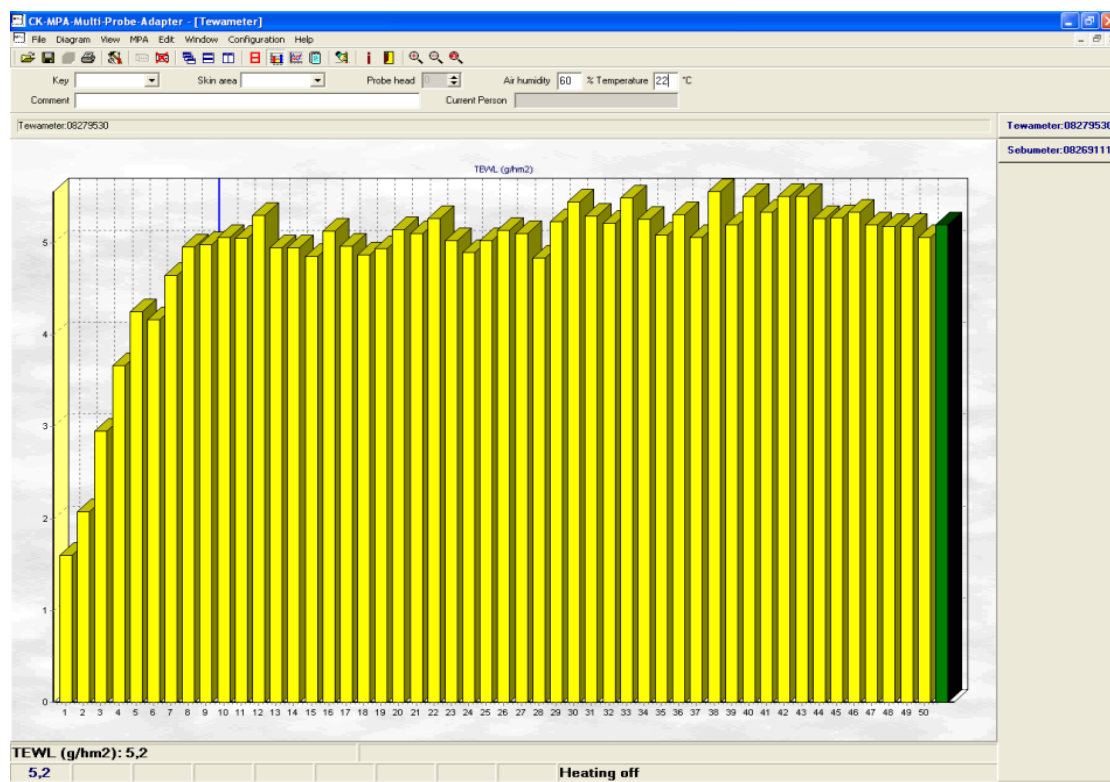
Legenda: Difúzní komůrka se zamontovanou kožní membránou připravená k testu transdermální absorpce. Do receptorové části je vloženo magnetické míchadlo.

Tímto způsobem byl připraven potřebný počet komůrek (Obr. 38), který se v jednotlivých experimentech lišil. V odborné literatuře neexistuje žádné závazné stanovisko, které by udávalo potřebný počet komůrek v jednom experimentu. Směrnice

OECD číslo 428 (OECD 2004c) požaduje minimálně čtyři vzorky testované látky, směrnice Evropské komise (EU-SCCP 2006) uvádí minimální počet šest vzorků kůže od nejméně tří dárců. Nejnovější doporučení (EFSA 2012) požaduje osm komůrek od čtyř dárců; toto doporučení však bylo přijato v době, kdy naše experimenty již probíhaly. S ohledem na výše uvedené byla naše experimentální sada pro jednu testovanou látku tvořena minimálně šesti komůrkami s kůžemi od minimálně tří různých dárců (na které byl aplikován roztok testované látky) a třemi komůrkami s kůžemi stejných tří dárců jako negativní kontroly (na ně testovaná látka aplikována nebyla).

Po instalaci vzorků kůže byly komůrky ponechány v temperované vodní lázni po dobu jedné hodiny, aby došlo k opětné hydrataci kožní membrány (při skladování dochází k mírné lyofylizaci kůže). Po této době byla u jednotlivých vzorků změřena transepidermální ztráta vody (TEWL) přístrojem MPA 5 (Obr. 33a). Čidlo přístroje bylo přiloženo na povrch kůže, kde bylo ponecháno jednu minutu z důvodu vytvoření rovnovážného stavu. Následně byla automaticky v intervalech jedné sekundy měřena hodnota TEWL a data byla přenášena do počítače. Jako výsledná hodnota TEWL byl u každého vzorku brán průměr padesáti po sobě jdoucích měření. Žluté sloupečky na monitoru (Obr. 39) představují jednotlivá měření v intervalu jedné sekundy, zelený

Obr. 39. Příklad měření TEWL



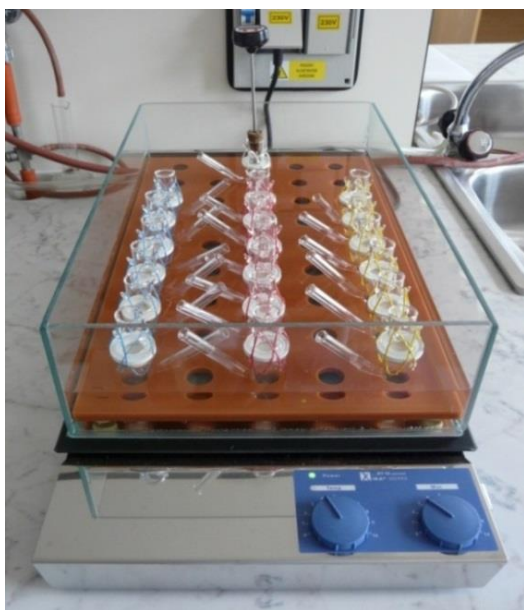
Zdroj: vlastní snímek

sloupeček na konci průměrnou hodnotu TEWL. K testování byly použity vzorky s hodnotou TEWL nižší než $15 \text{ g/m}^2/\text{h}$ (důvody pro použití tohoto kritéria viz diskuse, kap. 7.1). Nevyhovující vzorky byly vyměněny.

V následném kroku bylo na celou plochu vzorku kůže aplikováno 0,5 ml fyziologického roztoku a byl změřen elektrický kožní odpor (TER) pomocí přístroje TECPEL LCR 612 (Obr. 33b). První elektroda byla umístěna do fyziologického roztoku těsně nad povrch epidermis, druhá byla vedena odběrovým raménkem do prostoru receptorové tekutiny. Po několikasekundové stabilizaci bylo provedeno měření. Jako výsledný TER byl brán průměr tří po sobě jdoucích měření (mezi jednotlivými měřeními byla první elektroda vyjímána z fyziologického roztoku na povrchu epidermis). V experimentu byly použity vzorky s hodnotou TER vyšší než $2,8 \text{ k}\Omega$ (důvody pro použití tohoto kritéria viz diskuse, kap. 7.1). Nevyhovující vzorky byly nahrazovány záložními.

Po odsátí fyziologického roztoku a osušení povrchu kůže čtverečkem z buničité vaty byl na epidermální plochu penetrační membrány (kůže) aplikován roztok testované látky a v definovaných intervalech byly odebírány vzorky receptorové tekutiny. Difúzní komůrky v testech absorpce PAU byly po dobu experimentu ponechány bez okluze, pouze v případě absorpce kofeinu byla použita okluze Parafilmem. Okolní teplota vzduchu byla v rozmezí $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ a vlhkost vzduchu 50–60 %.

Obr. 40. Temperace komůrek



Zdroj: vlastní fotografie

Takto připravené komůrky byly umístěny do aparatury skládající se ze skleněného boxu (naplněného destilovanou vodou) a temperované magnetické míchací desky (Obr. 40). Teplota povrchu vzorku kůže byla měřena kontaktním teploměrem v difúzní komůrce bez aplikace testované látky a v průběhu experimentů se pohybovala v rozmezí $32 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ (WHO 2006, OECD 2004c). Aby nedocházelo k umělé hydrataci kůže instalované v difúzních komůrkách, musela být hladina vody ve skleněném boxu udržována pod úrovní kůže.

Pro validaci metodiky byl jako testovací látka zvolen kofein (OECD 2004a). Experimentální podmínky testu dermální absorpce kofeinu jsme vzhledem ke stejné

absorpční membráně (kůže zadní plochy ušního boltce prasete) volili v souladu s prací Duracher a kol. (Duracher 2009). Pro HPLC-UV stanovení kofeinu (po přímém nástřiku receptorové tekutiny na kolonu) byly modifikovány chromatografické podmínky popsané v práci Rubio a kol. (Rubio 2011).

Při testování transdermální absorpce PAU vycházely experimentální koncentrace polyaromátů z hodnot vyskytujících se reálně při léčbě psoriázy Goeckermanovu terapií. Základem této terapie je každodenní aplikace dehtové pasty (ve FN Hradec Králové je běžně používána pasta se 3–5 % farmaceutického dehtu, ve světě jsou používány též koncentrace několikanásobně vyšší [např. Petrozzi 1978]) s následnou expozicí UV záření. Abychom se vyhnuli problémům s mezí stanovitelnosti, zvolili jsme pro naše experimenty vyšší koncentrace PAU obsažené v 5% dehtové masti: antracen 0,7 mg/g rozpouštědla, benz(a)antracen 0,45 mg/g, benzo[a]pyren 0,45 mg/g, fenantren 2,8 mg/g, fluoranten 1,4 mg/g, fluoren 0,95 mg/g, naftalen 5,4 mg/g a pyren 0,95 mg/g.

Při hodnocení vlivu koncentrace testované látky na absorpci byly v případě pyrenu použity ještě i koncentrace desetinásobné a stonásobné (9,5 a 95 mg/g). Rozpouštědlem byl aceton (v souladu s literaturou) nebo slunečnicový olej. Donorové roztoky byly připravovány pokaždé těsně před jejich aplikací.

V průběhu testu byly v definovaných časových intervalech odebírány vzorky receptorové tekutiny k analýze. Odběr 1 ml vzorku z receptorové části komůrky byl prováděn plnicím raménkem pomocí polyethylenové Pasteurovy pipety. Každý z odebraných podílů byl přenesen do 1,5 ml polypropylenové zkumavky Eppendorf a uskladněn do doby analýzy při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Odebrané množství receptorové tekutiny bylo okamžitě nahrazeno novou (čistou) receptorovou tekutinou. Před posledním odběrem receptorové tekutiny (po 72 h) byl k ověření funkčnosti kůže znovu změřen TEWL a TER a po odběru posledních vzorků receptorové tekutiny byl pokus ukončen. Zbytky receptorové tekutiny byly naředěny a vypuštěny do běžné kanalizační sítě, použité kožní vzorky byly likvidovány jako biologický odpad. Sklo a silikonové kroužky byly omyty běžným způsobem (saponátový roztok, oplach vodou z vodovodu a následně destilovanou vodou) a poté ponořeny alespoň na 24 h do metanolu k odstranění sorbovaných polyaromátů.

5.7 Laboratorní analýzy

Ke stanovení koncentrací sledovaných látek byla použita plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Použití dvou metod bylo vynuceno časově omezenou dostupností prvé instrumentální techniky. Obě metody splňovaly podmínky GLP (Good Laboratory Practice) a jejich výsledky lze považovat za kompatibilní.

Analýza vzorku farmaceutického dehtu

K analýze zastoupení jednotlivých PAU ve vzorku farmaceutického dehtu byla použita metoda GC-MS (Hewlett Packard 5890/5971A, selective ion monitoring, SIM, technique) s následujícími parametry: kapilární kolona 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (cross-linked 5% fenylmethylsilikon, HP-5); průtok nosného plynu (helium) 1,0 ml/min; teplotní program kolony: 2,5 minuty 40 °C, potom nárůst na teplotu 300 °C rychlostí 10 °C za minutu a udržení teploty 300 °C po dobu 10 minut. Při analýze byl injekčně aplikován objem 1,0 µl (mode splitless); teplota nástřikové komůrky 260 °C, teplota detektoru 280 °C.

Rozbor vzorku farmaceutického dehtu používaného k přípravě dehtové masti (dehet zakoupen v Lékárně FN HK) byl proveden v laboratoři Úseku forenzní a klinické toxikologie Ústavu klinické biochemie a diagnostiky (ÚKBD), Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Výsledky rozboru vzorku shrnuje tabulka 8.

Tab. 8. Obsah jednotlivých PAU ve vzorku farmaceutického dehtu

PAU	obsah (% _{hm})
Naftalen	10,8
Fenantren	5,6
Fluoranten	2,8
Pyren	1,9
Fluoren	1,9
Antracen	1,4
Acenaftylen	0,9
Benz[a]antracen	0,9
Benzo[a]pyren	0,9
Chrysen	0,6
Benzo[b]fluoranten + benzo[k]fluoranten	0,5
Dibenz[a,h]antracen	< 0,5
Indeno[1,2,3-cd]pyren	0,4
Acenaften	0,3
Benzo[g,h,i]perylene	0,3

Stanovení koncentrace pyrenu pomocí GC-MS

Koncentrace pyrenu v receptorové tekutině (fáze I experimentů) byly stanovovány v akreditované laboratoři Úseku forenzní a klinické toxikologie ÚKBD, FN Hradec Králové metodou GC-MS. Před nástřikem byl pyren ze vzorku extrahován dvoustupňově (2 x 5 ml) ethylacetátem (PESTANAL, Fluka) a odstředován při 4 000 ot/min po dobu 5 min. Extrakty byly spojeny a odpařeny k suchu ve vakuové odparce a odparek rekonstituován v n-hexanu (iso-hexanes, PESTANAL, FLUKA) v poměru 190 µl hexanu + 100 µl derivační směsi BSTFA+TMCSi (Sigma-Aldrich). Následovala inkubace při 70 °C po dobu 30 min a nástřik 1 µl derivatizované směsi na kolonu. Pro kvantifikaci byla použita metoda isotopového zředění značeným (I.S.-d7) vnitřním standardem (1-naphthol-2,3,4,5,6,7,7,8-d7, ISOTEC) o výsledné koncentraci 20 ng/ml (1 350 ul vzorku + 150 ul I.S.-d7).

Stanovení koncentrací polyaromátů pomocí HPLC s fluorescenční detekcí

Koncentrace kofeinu (validace metodiky), naftalenu (fáze II experimentů), individuálních PAU a směsí PAU (fáze III experimentů) v receptorové tekutině byly stanovovány pomocí HPLC metody s fluorescenční detekcí. Tato metoda byla na Ústavu hygieny a preventivního lékařství nově zavedena (a validována) pro účely testování dermálních penetrací. Vzhledem k tomu, že se jedná o metodu zcela novou, byla v následující části práce popsána podrobně.

Separace analytů byly prováděny na 125 x 3 mm Nucleoduru C18ec, 3 µm (Macherey-Nagel). Zmíněná analytická kolona byla opatřena 3,2 x 4,0 mm předkolonou (Phenomenex) a temperována na 25 °C. Gradientová eluce byla prováděna při průtoku 0,6 ml/min s využitím směsi 25 % acetonitrilu + 75 % vody jako mobilní fáze A (MFA) a acetonitrilu s přídatkem ledové kyseliny octové (100 : 0,2; v/v) jako mobilní fáze B (MFB).

Složení eluentu a nastavení excitační a emisní vlnové délky fluorescenčního detektoru shrnují časové tabulky 9 a 10. Pro stanovení samotného naftalenu (vnitřní standard acenaften, ACP) v receptorové tekutině byla užita izokratická eluce směsí 61 % acetonitrilu + 39 % vody. Excitační a emisní vlnová délka pro naftalen a acenaften byly voleny tak, jak je uvedeno v časové tabulce.

Tab. 9. Časová tabulka pro stanovení NAP, PHE, PYR, BaP (vnitřní standard ACP)

T (min)	MFA (%)	MFB (%)	Excitace (nm)	Emise (nm)	Pro analyt
0,0	52	48	275	330	NAP
5,0	52	48	-	-	-
7,0	-	-	290	340	ACP
9,7	-	-	248	370	PHE
12,5	-	-	270	390	PYR
19,5	-	-	284	410	BaP
25,0	8	92	-	-	-
28,0	8	92	-	-	-
28,5	52	48	-	-	-
38,0	STOP				

Tab. 10. Časová tabulka pro stanovení FLR, ANT, FLT, BaA (vnitřní standard BaP)

T (min)	MFA (%)	MFB (%)	Excitace (nm)	Emise (nm)	Pro analyt
0,0	52	48	260	310	FLR
5,0	52	48	-	-	-
9,5	-	-	248	400	ANT
12,0	-	-	284	445	FLT
14,0	-	-	284	390	BaA
19,5	-	-	284	410	BaP
25,0	8	92	-	-	-
28,0	8	92	-	-	-
28,5	52	48	-	-	-
38,0	STOP				

Legenda: mobilní fáze A (MFA), mobilní fáze B (MFB), naftalen (NAP), fenantren (PHE), pyren (PYR), benzo[a]pyren (BaP), acenaften (ACP), fluoren (FLR), antracen (ANT), fluoranten (FLT), benz[a]antracen (BaA).

K přípravě kalibračních standardů v receptorové tekutině byly užity zásobní roztoky jednotlivých analytů v acetonitrilu v koncentraci 3,0 mmol/l (naftalen, fenantren), resp. 1,5 mmol/l (pyren, benzo[a]pyren, fluoren, antracen, fluoranten, benz[a]antracen), při 8 °C byly stálé minimálně po dobu tří měsíců. Ze zásobních roztoků byly připraveny pracovní roztoky analytů v 50% acetonitrilu, tedy kalibrační řada obsahující naftalen, fenantren, pyren a benzo[a]pyren a kalibrační řada obsahující fluoren, antracen, fluoranten a benz[a]antracen. Koncentrace analytů v jednotlivých kalibrátorech připravených v 50% acetonitrilu byly vždy 100x vyšší než požadované koncentrační úrovně zvolené pro receptorovou tekutinu.

Kalibrační řady v receptorové tekutině byly připraveny stonásobným naředěním jednotlivých kalibrátorů připravených v 50% acetonitrilu čistou receptorovou tekutinou. Tak byly připraveny kalibrační řady 6,0–15–60–150–600–1500–3000 nmol/l (naftalen, fenantren); 2,4–6,0–24–60–240–600–1200 nmol/l (pyren, benzo[a]pyren) a 4,8–12–30–

120–300–750–1500 nmol/l (fluoren, antracen, fluoranten, benz[a]antracen.). Připravené kalibrátory byly před rozpipetováním na aliquotní části a uložením při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ uchovávány přes noc za nepřístupu světla. Toto opatření zlepšilo reprodukovatelnost dat.

Vzorky kontroly kvality byly připravovány z nezávisle připravených zásobních roztoků analytů analogickým postupem jako kalibrační standardy pro koncentrační úrovně 6–30–500–2500 nmol/l (naftalen, fenantren), 2,4–12–200–1000 nmol/l (pyren, benzo[a]pyren), resp. 4,8–12–48–480–1 200 nmol/l (fluoren, antracen, fluoranten, benz[a]antracen). Při analýzách vzorků ze studií permeability byly do každé série vzorků zařazeny i vzorky kontroly kvality (v duplikátu) spolu se vzorky čisté receptorové tekutiny.

Před HPLC analýzou byly vzorky receptorové tekutiny zpracovávány dále uvedeným postupem, který byl stejný pro všechny typy analyzovaných vzorků (kalibrátory, kontroly, vzorky ze studie). Do 1,5 ml zkumavky Eppendorf s 0,3 ml deproteinačního činidla obsahujícího vnitřní standard (IS) bylo přidáno 0,2 ml vzorku. Obsah zkumavky byl protřepán na vortexu a po 30 min stání byl odstředěn (20 min, 12 000 ot/min). K analýze bylo odebráno 300 μl supernatantu, na HPLC kolonu nanášen jeho 50 μl podíl.

Pro stanovení naftalenu byl jako pracovní roztok vnitřního standardu užíván acenaften v acetonitrilu (koncentrace 150 nmol/l), pro stanovení naftalenu, fenantrenu, pyrenu a benzo[a]pyrenu acenaften v acetonitrilu (koncentrace 300 nmol/l), pro stanovení fluorenu, antracenu, fluorantenu, benz[a]antracenu potom benzo[a]pyren v acetonitrilu (koncentrace 90 nmol/l).

Získaná data byla kvantifikována metodou interní standardizace, z chromatogramů byly odečítány plochy píků analytů a interního standardu. K proložení kalibrační přímky experimentálními daty byla užita vážená regresní analýza.

5.8 Vyhodnocování dat a statistická analýza

Pomocí programu MS Excel 2010 byly koncentrace testovaných látek v receptorové tekutině (nmol/ml) přepočteny na absorbovaná množství adjustovaná na jednotku penetrační plochy a vztaženy k jednotce času (Nielsen 2010).

Ze získaných dat byly vypočítány a graficky zobrazeny základní kinetické charakteristiky dermální absorpce sledovaných PAU - *flux* a *lag time*. Veličina *flux* udává míru absorpce a je definována jako množství látky absorbované jednotkou plochy kůže za jednotku času v ustáleném stavu (viz Graf 2). *Lag time* bývá definován jako čas nutný

k vytvoření ustáleného stavu. K výpočtu výše uvedených charakteristik byl použit nový počítačový model „Iteration tool“. Pro tyto účely byl naprogramován v prostředí MS Excel VBA a používá zjednodušený absorpční model využívající aproximaci pomocí exponenciálních funkcí (jeho publikace se zpracovává). Pomocí tohoto programu byl z hodnot absorpce v čase (Příloha 1 – červené hvězdičky) pro každou jednotlivou difúzní komůrku vytvořen matematický model křivky odpovídající této absorpci (Příloha 1 – modrá křivka, zelené body odpovídají jednotlivým modelovým bodům v daném čase). Program též na křivce vybral inflexní bod (tj. bod, kdy se konvexní část křivky začíná měnit na konkávní) a přímka odpovídající lineární části absorpční křivky (Příloha 1 – černá přímka) je tečnou procházející tímto bodem. Flux je potom dán směrnici této přímky a lag time odpovídá času, v němž přímka protne osu x.

V dalším kroku byly vypočítány základní statistické charakteristiky a bylo provedeno statistické hodnocení souborů dat. Pro zpracování byl použit program NCSS 2007. V první části experimentů srovnávajících vliv různých koncentrací pyrenu a odlišného rozpouštědla (aceton, slunečnicový olej) na absorpci jsme použili statistický test ANOVA (mnohočetné srovnávání skupin vzorků). Ve druhé části experimentů jsme zjišťovali vliv typu aplikace PAU (samostatně nebo ve směsi) na jejich absorpci. Pro zjištění normality rozložení souborů dat byl použit D'Agostino Kurtosis Normality test, k hodnocení shody rozptylů F-test (Modified-Levene Equal-Variance test). Podle výsledků byly následně použity párové Equal Variance *t*-test nebo Aspin-Welch Unequal-Variance test. Pro veškerá hodnocení všech statistických testů byla zvolena hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

6. Metodika jednotlivých experimentů, výsledky

6.1 Transdermální absorpce kofeinu (validace metodiky)

V rámci validačního experimentu byl proveden test transdermální absorpce kofeinu dle metodiky popsané v práci Duracher a kol. (Duracher 2009). K hodnocení bylo použito dvanáct difúzních komůrek s kůží od čtyř různých dárců. Receptorová část komůrek byla naplněna 10 ml fyziologického roztoku a komůrky byly umístěny do vodní lázně udržující na povrchu kůže teplotu 32 ± 1 °C. Receptorová tekutina byla kontinuálně míchána magnetickým míchadlem (rychlost cca 300 rpm). Po 1 h ekvilibraci a ověření TEWL a TER bylo do osmi komůrek (po dvou kusech od jednoho dárce) aplikováno na donorovou část epidermis 44 μ l čerstvě připraveného vodného roztoku kofeinu (koncentrace 20 g/l), zbývající čtyři komůrky (po jednom kusu od dárce) byly ponechány bez aplikace testované látky (kontrolní komůrky). Na všechny komůrky byla použita okluze (Parafilm). Pokus probíhal za běžných laboratorních podmínek (teplota, vlhkost).

Odběry 1 ml receptorové tekutiny byly provedeny v intervalech 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 22 a 24 h, odebraná tekutina byla vždy nahrazována novou. Podíly receptorové tekutiny určené k analýze byly uchovávány při -20 °C. Jejich analýzou (HPLC) byly získány časové závislosti koncentrace kofeinu v testovacích komůrkách. V receptorové tekutině kontrolních komůrek nebyl kofein nalezen.

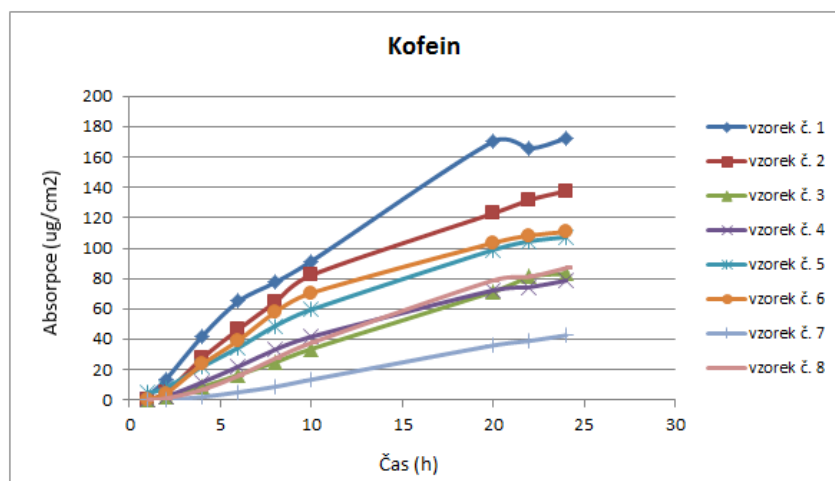
Tab. 11. Kinetika a parametry transdermální absorpce kofeinu

Vzorek č.	Kumulativní absorpce (μ g/cm ²) v jednotlivých časových intervalech (h)									Flux (μ g/cm ² /h)	Lag time (h)
	1	2	4	6	8	10	20	22	24		
1	2,54	13,56	42,00	65,10	77,46	91,41	170,33	165,66	172,33	11,03	0,58
2	0,71	4,86	27,56	46,65	64,34	82,26	123,02	131,81	137,65	10,08	1,44
3	0,45	2,21	8,67	16,67	24,84	33,71	71,40	81,22	83,29	4,44	2,39
4	0,40	2,38	11,70	22,16	33,20	41,74	72,32	74,36	78,76	5,35	1,89
5	4,66	8,21	22,00	34,61	48,74	59,6	98,92	104,61	107,40	6,80	0,79
6	0,68	4,23	23,56	39,41	57,73	70,51	103,52	108,39	110,82	9,13	1,61
7	0,08	0,27	2,12	5,22	8,76	13,48	36,00	39,00	42,65	2,39	4,39
8	0,21	1,22	6,82	16,02	27,38	37,71	78,83	81,23	86,97	5,59	3,19
AP	1,22	4,62	18,05	30,73	42,81	53,80	94,29	98,29	102,48	6,85	2,03
VSO	1,59	4,38	13,19	19,51	23,10	26,65	40,28	38,68	39,57	2,99	1,27
MED	0,57	3,31	16,85	28,39	40,97	50,67	88,88	92,92	97,19	6,20	1,75
MIN	0,08	0,27	2,12	5,22	8,76	13,48	36,00	39,00	42,65	2,39	0,58
MAX	2,54	13,56	42,00	65,10	77,46	91,41	170,33	165,66	172,33	11,03	4,39

Legenda: AP - aritmetický průměr; VSO - výběrová směrodatná odchylka; MED - medián; MIN - nejnižší hodnota; MAX – nejvyšší hodnota

Koncentrace naměřené v testovacích komůrkách (mg/l) byly přepočteny na hodnoty absorpce ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$; z důvodu porovnání se vzorovou prací nebyly v tomto případě přepočteny na hodnoty v mol/cm^2) v daných časových intervalech, hodnoty fluxu a lag time byly stanoveny pomocí matematického modelu (viz. kap. 5.8). Aritmetický průměr ($\pm\text{VSO}$) veličiny flux měl hodnotu $6,85\pm 2,99 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, aritmetický průměr veličiny lag time ($\pm\text{VSO}$) hodnotu $2,03\pm 1,27 \text{ h}$ (Tab. 11). Kinetiku absorpce zachycuje Graf 3.

Graf 3. Kinetika transdermální absorpce kofeinu



Legenda: Jednotlivé křivky znázorňují průběh transdermální absorpce na jednotlivých vzorcích kůže.

6.2 Transdermální absorpce PAU

Testování transdermální absorpce PAU bylo rozděleno do tří částí.

V první (úvodní) fázi byl testován pyren, jako standardní reprezentant skupiny PAU. Byly stanoveny základní parametry jeho absorpce (flux a lag time) a bylo studováno jejich ovlivnění charakterem rozpouštědla a koncentrací pyrenu. Ve druhé fázi byl sledován vliv rozpouštědla na parametry absorpce naftalenu a ve třetí fázi bylo u osmi vybraných PAU hodnoceno ovlivnění absorpčních parametrů způsobem aplikace látky (samostatně nebo ve směsi).

6.2.1 Fáze I. Transdermální absorpce pyrenu: vliv typu rozpouštědla a koncentrace na parametry absorpce

Výsledky experimentů hodnotících vliv typu rozpouštědla byly publikovány v časopise Hygiena (Kotingová L: Vliv rozpouštědla na dermální absorpci pyrenu in vitro, Hygiena 2012, 57 (2) 50-55). Článek je přiložen k disertační práci jako Příloha 2.

Výsledky testování vlivu použité koncentrace byly publikovány v časopise Pracovní lékařství (Kotingová L: Vliv koncentrace na transdermální absorpci pyrenu in vitro. Pracov Lék 2012, 64 (1) 18-22). Článek je přiložen k disertační práci jako Příloha 3.

Komentář k daným článkům je uveden v diskusi.

6.2.2 Fáze II. Transdermální absorpce naftalenu: vliv rozpouštědla na parametry absorpce

Při testování vlivu rozpouštědla na parametry absorpce naftalenu bylo použito 20 difúzních komůrek s kůžemi od čtyř různých dárců. Z tohoto počtu bylo 16 komůrek testovacích a čtyři komůrky kontrolní.

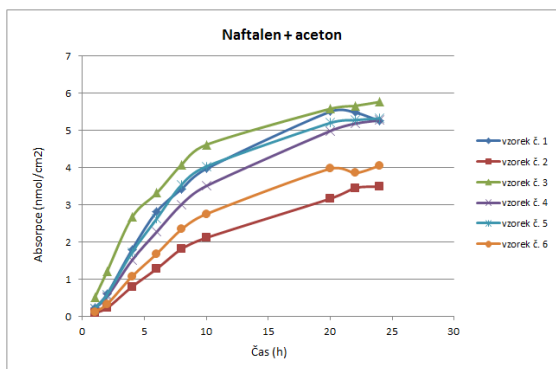
Receptorová část difúzních komůrek byla naplněna 10 ml receptorové tekutiny tvořené Hanksovým roztokem se 4 % bovinního sérového albuminu a gentamicinem o koncentraci 50 mg/l. Komůrky byly umístěny ve vodní lázni udržující na povrchu kůže teplotu 32 ± 1 °C, receptorová tekutina byla kontinuálně míchána magnetickým míchadlem (rychlost cca 300 rpm).

Po hodinové temperaci a ověření TEWL a TER bylo na donorovou část epidermis v osmi komůrkách (po dvou vzorcích kůže od každého dárce) aplikováno 50 µl čerstvě připraveného roztoku naftalenu v acetonu (koncentrace 5,4 mg/g). V dalších osmi komůrkách bylo aplikováno 50 µl roztoku naftalenu ve slunečnicovém oleji (koncentrace 5,4 mg/g). Povrch epidermis v kontrolních komůrkách zůstal bez aplikace donorového roztoku. Komůrky byly ponechány bez okluze. Experimenty probíhaly za běžných laboratorních podmínek.

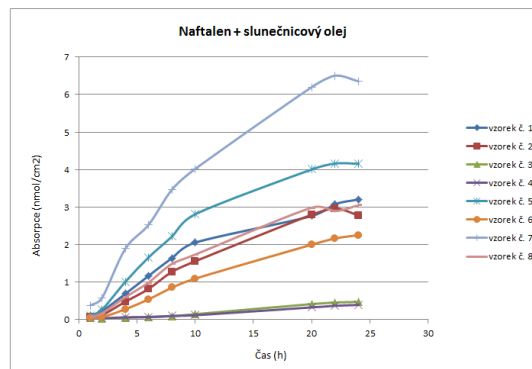
Receptorová tekutina byla odebírána v intervalech 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 22 a 24 h a odebrané množství bylo vždy nahrazeno čistou receptorovou tekutinou. Odebraná tekutina byla ihned zamrazena při -20 °C a všechny vzorky byly následně analyzovány pomocí HPLC. Ve dvou případech absorpce naftalenu z acetonového roztoku se projevil skrytý defekt kůže, tyto výsledky byly významně vyšší, a proto byly z dalšího hodnocení vyřazeny. Koncentrace naměřené v testovacích komůrkách (nmol/l) byly přepočteny na hodnoty absorpce (nmol/cm^2) v daných časových intervalech. Hodnoty flux a lag time byly stanoveny pomocí matematického modelu. Kinetiku absorpce zachycují grafy 4 a 5.

Kinetiku a parametry transdermální absorpce naftalenu ukazují tabulky 12 a 13. Průměrná hodnota veličiny flux při absorpci naftalenu z acetonového roztoku $0,468\pm 0,152$ nmol/cm²/h (aritmetický průměr \pm VSO) byla zhruba dvojnásobně vyšší než

Graf 4. Kinetika transdermální absorpce naftalenu v acetonu



Graf 5. Kinetika transdermální absorpce naftalenu ve slunečnicovém oleji



Legenda: Jednotlivé křivky znázorňují průběh transdermální absorpce na jednotlivých vzorcích kůže.

průměrná hodnota veličiny flux při absorpci naftalenu z olejového roztoku ($0,212 \pm 0,155 \text{ nmol/cm}^2/\text{h}$; aritmetický průměr \pm VSO). Naopak průměrná hodnota veličiny lag time při absorpci naftalenu z acetonového roztoku $0,75 \pm 0,33 \text{ h}$ (aritmetický průměr \pm VSO) byla téměř třikrát nižší než průměrná hodnota veličiny lag time při absorpci naftalenu z olejového roztoku ($2,07 \pm 1,50 \text{ h}$). Statisticky významný rozdíl byl nalezen pouze u veličiny flux ($p = 0,010$). V případě veličiny lag time byla hodnota statistické významnosti $p = 0,059$.

Tab. 12. Kinetika a parametry transdermální absorpce naftalenu v acetonu

Komůrka č.	Kumulativní absorpce (nmol/cm ²) v jednotlivých časových intervalech (h)									Flux (nmol/cm ² /h)	Lag time (h)
	1	2	4	6	8	10	20	22	24		
1	0,226	0,606	1,794	2,816	3,423	3,969	5,506	5,482	5,253	0,534	0,73
2	0,096	0,224	0,794	1,277	1,812	2,112	3,166	3,450	3,493	0,257	0,99
3	0,508	1,215	2,664	3,315	4,080	4,615	5,582	5,661	5,768	0,683	0,15
4	0,209	0,529	1,507	2,272	3,010	3,505	4,985	5,182	5,272	0,435	0,66
5	0,208	0,588	1,718	2,627	3,540	4,032	5,202	5,279	5,325	0,545	0,91
6	0,122	0,329	1,071	1,682	2,340	2,751	3,971	3,856	4,051	0,354	1,07
AP	0,228	0,582	1,591	2,332	3,034	3,497	4,735	4,818	4,860	0,468	0,75
VSO	0,147	0,345	0,651	0,752	0,834	0,920	0,963	0,927	0,882	0,152	0,33
MED	0,209	0,559	1,613	2,450	3,217	3,737	5,094	5,231	5,263	0,484	0,82
MIN	0,096	0,224	0,794	1,277	1,812	2,112	3,166	3,450	3,496	0,257	0,15
MAX	0,508	1,215	2,664	3,315	4,080	4,615	5,582	5,661	5,768	0,683	1,07

Legenda: AP - aritmetický průměr; VSO - výběrová směrodatná odchylka; MED - medián; MIN - nejnižší hodnota; MAX – nejvyšší hodnota

Tab. 13. Kinetika a parametry transdermální absorpce naftalenu ve slunečnicovém oleji

Komůrka č.	Kumulativní absorpce (nmol/cm ²) v časovém intervalu (h)									Flux (nmol/cm ² /h)	Lag time (h)
	1	2	4	6	8	10	20	22	24		
1	0,108	0,231	0,692	1,172	1,646	2,058	2,767	3,082	3,207	0,245	1,10
2	0,061	0,124	0,482	0,824	1,279	1,561	2,802	2,969	2,784	0,207	1,91
3	0,041	0,035	0,059	0,075	0,097	0,151	0,419	0,460	0,477	0,032	5,13
4	0,046	0,041	0,065	0,072	0,103	0,122	0,331	0,373	0,396	0,020	3,38
5	0,117	0,272	1,013	1,665	2,218	2,814	4,007	4,165	4,159	0,350	1,23
6	0,051	0,072	0,282	0,546	0,856	1,098	2,003	2,169	2,255	0,138	1,98
7	0,386	0,582	1,893	2,534	3,468	4,021	6,202	6,506	6,355	0,484	0,46
8	0,076	0,176	0,602	0,996	1,493	1,740	2,989	2,895	3,051	0,221	1,37
AP	0,111	0,192	0,636	0,986	1,395	1,696	2,690	2,827	2,836	0,212	2,07
VSO	0,115	0,180	0,602	0,826	1,115	1,311	1,904	1,981	1,934	0,155	1,50
MED	0,069	0,150	0,542	0,910	1,386	1,651	2,785	2,932	2,918	0,214	1,64
MIN	0,041	0,035	0,059	0,072	0,097	0,122	0,331	0,373	0,396	0,020	0,46
MAX	0,386	0,582	1,893	2,534	3,468	4,021	6,202	6,506	6,355	0,484	5,13

Legenda: AP - aritmetický průměr; VSO - výběrová směrodatná odchylka; MED - medián; MIN - nejnižší hodnota; MAX – nejvyšší hodnota

6.2.3 Fáze III. Transdermální absorpce vybraných PAU: vliv způsobu podání testované látky (samostatně nebo ve směsi) na parametry absorpce

S ohledem na kapacitu zařízení mohly být v jednom experimentu testovány maximálně čtyři látky (PAU). Ty byly aplikovány ve stejných koncentracích individuálně a ve směsích. Testování proběhlo ve dvou sadách. V první sadě byl naftalen, fenantren, pyren a benzo[a]pyren. Ve druhé sadě pak fluoren, fluoranten, antracen a benz[a]antracen. Látky byly vybírány podle jejich toxikologické významnosti a podle míry zastoupení v reálných směsích PAU. Souhrn všech výsledků je v tabulce v příloze 4.

6.2.3.1 Transdermální absorpce naftalenu, fenantrenu, pyrenu a benzo[a]pyrenu

V experimentu bylo použito 33 difúzních komůrek s kůžemi od tří různých dárců. Receptorová část difúzních komůrek byla naplněna 10 ml receptorové tekutiny tvořené Hanksovým roztokem se 4 % bovinního sérového albuminu a gentamicinem o koncentraci 50 mg/l. Komůrky byly umístěny ve vodní lázni udržující na povrchu kůže teplotu 32±1 °C, receptorová tekutina byla kontinuálně míchána magnetickým míchadlem (rychlost cca 300 rpm).

Po hodinové temperaci a ověření TEWL a TER bylo na donorovou část epidermis v šesti komůrkách (vždy po dvou vzorcích kůže od tří různých dárců) aplikováno 100 µl čerstvě připraveného acetonového roztoku fenantrenu (koncentrace 2,8 mg/g). Do dalších „baterií“ po šesti komůrkách bylo aplikováno 100 µl acetonového roztoku naftalenu (koncentrace 5,4 mg/g), 100 µl acetonového roztoku pyrenu (koncentrace 0,95 mg/g) a 100 µl acetonového roztoku benzo[a]pyrenu (koncentrace 0,45 mg/g). Do poslední

šestice testovacích komůrek bylo aplikováno 100 μl acetonového roztoku směsi PAU, která obsahovala fenantren, naftalen, pyren a benzo[a]pyren ve stejných koncentracích jako při samostatném podání. Do posledních tří komůrek (po jednom kusu od dárce), které sloužily jako kontrolní, byl aplikován pouze samotný aceton. Všechny komůrky byly ponechány bez okluze. Experimenty probíhaly za běžných laboratorních podmínek.

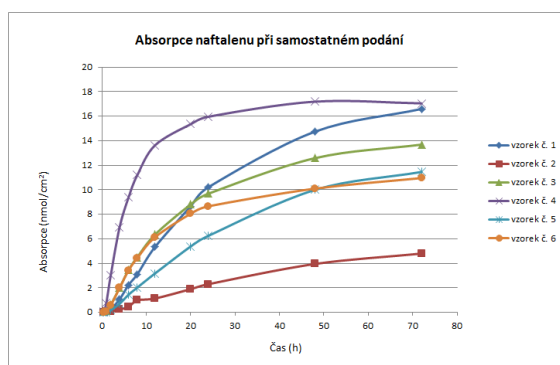
Vlastnímu experimentu předcházela pilotní pokus, v němž byla receptorová tekutina odebírána v intervalech 12, 24, 48 a 72 h. Na základě těchto výsledků byly stanoveny nové doby odběrů, které umožnily lépe zachytit absorpci jednotlivých polyaromátů (tyto výsledky nejsou prezentovány).

V rámci hlavního experimentu byla potom receptorová tekutina u naftalenu odebírána v intervalech 1/2, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 20, 24, 48, 72 h; u fenantrenu v intervalech 8, 12, 20, 24, 28, 44, 52, 68, 72 a 76 h a u pyrenu a benzo[a]pyrenu v intervalech 12, 20, 24, 28, 44, 52, 68, 72, 76 h. V případě směsi PAU byly odběry v intervalech 1/2, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 20, 24, 28, 44, 52, 68, 72, 76 h.

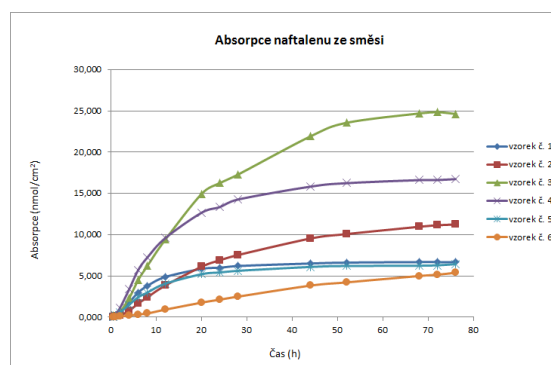
Odebrané množství bylo vždy nahrazeno čistou receptorovou tekutinou. Odebrané vzorky byly ihned zamrazeny při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně analyzovány pomocí HPLC. Koncentrace naměřené v testovacích komůrkách byly přepočteny na hodnoty absorpce v daných časových intervalech podle výše popsané metodiky. Hodnoty flux a lag time byly stanoveny pomocí matematického modelu.

Kinetiku transdermální absorpce naftalenu při samostatné aplikaci a při aplikaci směsi PAU zachycují grafy 6 a 7. Parametry transdermální absorpce při samostatné aplikaci a při aplikaci směsi PAU shrnují tabulky 14 a 15.

Graf 6. Kinetika transdermální absorpce naftalenu při samostatné aplikaci



Graf 7. Kinetika transdermální absorpce naftalenu při aplikaci směsi PAU



Legenda: Jednotlivé křivky znázorňují průběh transdermální absorpce na jednotlivých vzorcích kůže.

Tab. 14. Kinetika a parametry transdermální absorpce naftalenu při samostatné aplikaci

Vzorek č.	Kumulativní absorpce (nmol/cm ²) v jednotlivých časových intervalech (h)											Flux (nmol/cm ² /h)	Lag time (h)
	0,5	1	2	4	6	8	12	20	24	48	72		
1	0,045	0,061	0,247	1,068	2,233	3,115	5,347	8,650	10,213	14,744	16,594	0,506	1,75
2	0,034	0,077	0,090	0,245	0,454	0,981	1,138	1,896	2,302	3,952	4,799	0,106	0,95
3	0,073	0,115	0,611	1,998	3,456	4,509	6,353	8,806	9,681	12,583	13,689	0,572	0,26
4	0,051	0,734	3,010	6,947	9,362	11,207	13,638	15,350	15,960	17,189	17,047	1,769	0,25
5	0	0,023	0,177	0,703	1,438	2,031	3,184	5,377	6,247	9,994	11,460	0,302	1,53
6	0	0,079	0,567	1,990	3,420	4,432	6,140	8,047	8,654	10,097	10,958	0,582	0,43
AP	0,034	0,181	0,784	2,159	3,394	4,379	5,967	8,021	8,843	11,426	12,425	0,639	0,86
VSO	0,029	0,272	1,111	2,448	3,145	3,614	4,254	4,455	4,534	4,588	4,507	0,583	0,65
MED	0,040	0,078	1,529	1,529	2,827	3,773	5,743	8,349	9,168	11,340	12,575	0,540	0,69
MIN	0	0,023	0,090	0,245	0,454	0,981	1,138	1,189	2,302	3,952	4,799	0,106	0,25
MAX	0,073	0,734	3,010	6,947	9,362	11,207	13,638	15,350	15,960	17,189	17,047	1,769	1,75

Legenda: AP - aritmetický průměr; VSO - výběrová směrodatná odchylka; MED - medián; MIN - nejnižší hodnota; MAX – nejvyšší hodnota

Tab. 15. Kinetika a parametry transdermální absorpce naftalenu při aplikaci směsi PAU

Vzorek č.	Kumulativní absorpce (nmol/cm ²) v jednotlivých časových intervalech (h)															Flux (nmol/cm ² /h)	Lag time (h)
	0,5	1	2	4	6	8	12	20	24	28	44	52	68	72	76		
1	0,127	0,156	0,599	1,807	2,999	3,804	4,889	5,861	5,998	6,211	6,515	6,621	6,682	6,683	6,671	0,537	0,54
2	0,046	0,086	0,202	0,798	1,676	2,413	3,854	6,130	6,905	7,538	9,542	10,085	10,965	11,154	11,234	0,342	1,05
3	0,239	0,245	0,646	2,319	4,526	6,209	9,421	14,967	16,262	17,289	21,922	23,568	24,698	24,849	24,640	0,842	0,79
4	0,041	0,193	1,154	3,395	5,738	7,234	9,605	12,677	13,349	14,272	15,831	16,250	16,614	16,629	16,744	0,939	0,20
5	0,081	0,212	0,596	1,518	2,434	2,992	4,077	5,223	5,427	5,629	6,097	6,210	6,245	6,293	6,436	0,416	0,24
6	0,046	0,056	0,087	0,197	0,349	0,455	0,929	1,777	2,135	2,503	3,836	4,230	5,002	5,160	5,394	0,103	3,05
AP	0,097	0,158	0,547	1,672	2,954	3,851	5,463	7,773	8,346	8,907	10,624	11,161	11,701	11,795	11,853	0,530	0,98
VSO	0,077	0,074	0,378	1,129	1,945	2,504	3,412	4,992	5,336	5,656	6,919	7,405	7,661	7,676	7,559	0,315	1,06
MED	0,064	0,175	0,598	1,518	2,716	3,398	4,483	5,995	6,451	6,875	8,029	8,353	8,824	8,918	8,952	0,476	0,66
MIN	0,041	0,056	0,087	0,197	0,349	0,455	0,929	1,777	2,135	2,503	3,836	4,230	5,002	5,160	5,394	0,103	0,24
MAX	0,239	0,245	1,154	3,395	5,738	7,234	9,605	14,97	16,26	17,29	21,92	23,570	24,700	24,850	24,640	0,939	3,05

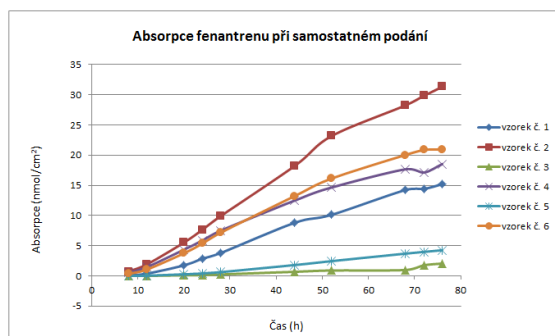
Legenda: AP - aritmetický průměr; VSO - výběrová směrodatná odchylka; MED - medián; MIN - nejnižší hodnota; MAX – nejvyšší hodnota

Jak vyplývá z tabulek, v případě samostatné aplikace naftalenu byla průměrná hodnota veličiny flux $0,639 \pm 0,583$ nmol/cm²/h (aritmetický průměr ± VSO). Při aplikaci směsi PAU byla hodnota flux naftalenu $0,530 \pm 0,315$ nmol/cm²/h. Rozdíl v hodnotách flux nebyl statisticky významný ($p = 0,694$). V případě samostatné aplikace naftalenu byla průměrná hodnota veličiny lag time $0,86 \pm 0,65$ h (aritmetický průměr ± VSO). Při aplikaci směsi PAU byla hodnota lag time naftalenu $0,98 \pm 1,06$ h. Rozdíl v hodnotách lag time nebyl statisticky významný ($p = 0,824$).

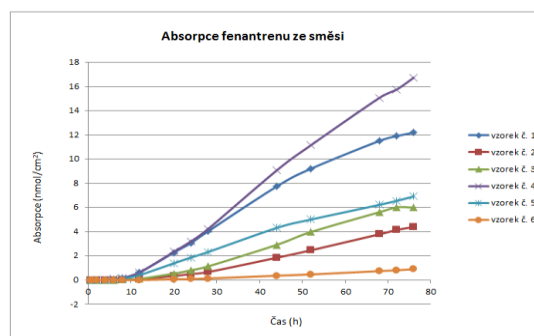
Kinetiku transdermální absorpce fenantrenu při samostatné aplikaci a při aplikaci směsi PAU zachycují grafy 8 a 9. Parametry transdermální absorpce při samostatné aplikaci a při aplikaci směsi PAU shrnují tabulky 16 a 17.

Jak vyplývá z tabulek, v případě samostatné aplikace fenantrenu byla průměrná hodnota veličiny flux $0,298 \pm 0,209$ nmol/cm²/h (aritmetický průměr ± VSO). Při aplikaci směsi PAU byla hodnota flux fenantrenu $0,149 \pm 0,104$ nmol/cm²/h. Rozdíl v hodnotách flux nebyl statisticky významný ($p = 0,147$). V případě samostatné aplikace fenantrenu

Graf 8. Kinetika transdermální absorpce fenantrenu při samostatné aplikaci



Graf 9. Kinetika transdermální absorpce fenantrenu při aplikaci směsi PAU



Legenda: Jednotlivé křivky znázorňují průběh transdermální absorpce na jednotlivých vzorcích kůže.

byla průměrná hodnota veličiny lag time $14,87 \pm 5,49$ h (aritmetický průměr \pm VSO). Při aplikaci směsi PAU byla hodnota lag time fenantrenu $16,88 \pm 6,06$ h. Rozdíl v hodnotách lag time nebyl statisticky významný ($p = 0,560$).

Tab. 16. Kinetika a parametry transdermální absorpce fenantrenu při samostatné aplikaci

Vzorek č.	Kumulativní absorpce (nmol/cm ²) v jednotlivých časových intervalech (h)										Flux (nmol/cm ² /h)	Lag time (h)
	8	12	20	24	28	44	52	68	72	76		
1	0,090	0,382	1,747	2,844	3,801	8,794	10,118	14,229	14,406	15,194	0,295	15,14
2	0,723	1,920	5,517	7,647	9,921	18,213	23,164	28,249	29,835	31,322	0,570	10,75
3	0	0	0,096	0,145	0,238	0,677	0,893	0,972	1,768	2,048	0,029	20,43
4	0,514	1,464	4,340	5,867	7,501	12,476	14,643	17,665	17,120	18,536	0,385	8,89
5	0	0,040	0,258	0,419	0,628	1,797	2,444	3,688	3,977	4,253	0,083	22,37
6	0,333	1,067	3,741	5,356	7,169	13,229	16,120	20,032	20,857	20,938	0,428	11,67
AP	0,277	0,812	2,617	3,713	4,876	9,198	11,230	14,139	14,661	15,382	0,298	14,87
VSO	0,299	0,795	2,250	3,071	3,958	6,867	8,524	10,284	10,537	10,923	0,209	5,49
MED	0,212	0,725	2,744	4,100	5,485	10,635	12,381	15,947	15,763	16,865	0,340	13,38
MIN	0	0	0,096	0,145	0,238	0,677	0,893	0,972	1,768	2,048	0,029	8,89
MAX	0,723	1,920	5,517	7,647	9,921	18,213	23,164	28,249	29,835	31,322	0,570	22,37

Legenda: AP - aritmetický průměr; VSO - výběrová směrodatná odchylka; MED - medián; MIN - nejnižší hodnota; MAX – nejvyšší hodnota

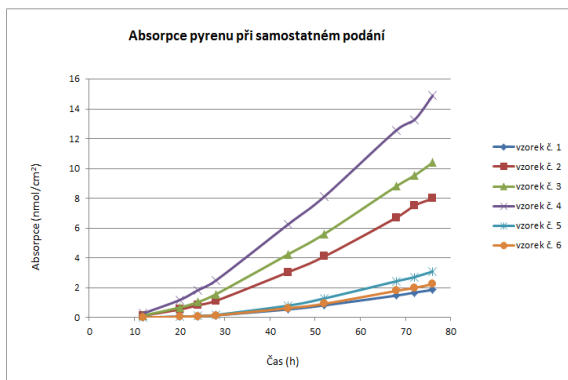
Tab. 17. Kinetika a parametry transdermální absorpce fenantrenu při aplikaci směsi PAU

Vzorek č.	Kumulativní absorpce (nmol/cm ²) v jednotlivých časových intervalech (h)											Flux (nmol/cm ² /h)	Lag time (h)	
	4	6	8	12	20	24	28	44	52	68	72			76
1	0	0,061	0,175	0,636	2,269	3,060	4,034	7,732	9,206	11,507	11,903	12,182	0,245	11,50
2	0	0,010	0,016	0,079	0,337	0,505	0,663	1,844	2,463	3,786	4,142	4,386	0,083	22,19
3	0	0	0,020	0,099	0,532	0,808	1,129	2,910	3,972	5,613	6,016	5,989	0,122	19,23
4	0	0,076	0,176	0,632	2,337	3,196	4,220	9,059	11,149	15,064	15,742	16,733	0,297	13,79
5	0	0,046	0,117	0,414	1,384	1,861	2,319	4,308	5,004	6,220	6,545	6,909	0,128	9,83
6	0	0	0	0	0,061	0,083	0,132	0,359	0,467	0,740	0,810	0,895	0,017	24,75
AP	0	0,032	0,084	0,310	1,153	1,586	2,083	4,369	5,377	7,155	7,527	7,849	0,149	16,88
VSO	0	0,033	0,082	0,288	0,995	1,332	1,741	3,403	4,067	5,239	5,412	5,699	0,104	6,06
MED	0	0,028	0,069	0,256	0,958	1,334	1,724	3,609	4,488	5,916	6,281	6,449	0,125	16,51
MIN	0	0	0	0	0,061	0,083	0,132	0,359	0,467	0,740	0,810	0,895	0,017	9,83
MAX	0	0,076	0,176	0,636	2,337	3,196	4,220	9,059	11,149	15,064	15,742	16,733	0,297	24,75

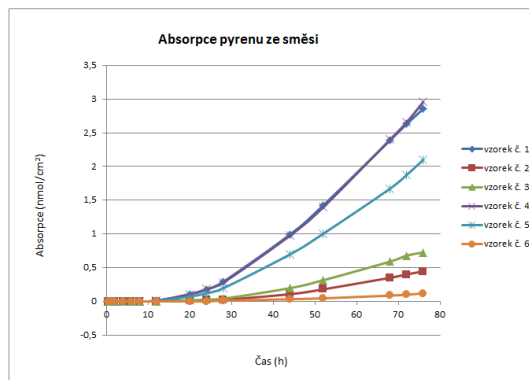
Legenda: AP - aritmetický průměr; VSO - výběrová směrodatná odchylka; MED - medián; MIN - nejnižší hodnota; MAX – nejvyšší hodnota

Kinetiku transdermální absorpce pyrenu při samostatné aplikaci a při aplikaci směsi PAU zachycují grafy 10 a 11. Parametry transdermální absorpce při samostatné aplikaci a při aplikaci směsi PAU shrnují tabulky 18 a 19.

Graf 10. Kinetika transdermální absorpce pyrenu při samostatné aplikaci



Graf 11. Kinetika transdermální absorpce pyrenu při aplikaci směsi PAU



Legenda: Jednotlivé křivky znázorňují průběh transdermální absorpce na jednotlivých vzorcích kůže.

Jak vyplývá z tabulek, v případě samostatné aplikace pyrenu byla průměrná hodnota veličiny flux $0,137 \pm 0,091$ nmol/cm²/h (aritmetický průměr \pm VSO). Při aplikaci směsi PAU byla hodnota flux pyrenu $0,034 \pm 0,027$ nmol/cm²/h. Rozdíl v hodnotách flux byl statisticky významný ($p = 0,038$). V případě samostatné aplikace pyrenu byla průměrná hodnota veličiny lag time pyrenu $30,78 \pm 7,15$ h (aritmetický průměr \pm VSO). Při aplikaci směsi PAU byla hodnota lag time pyrenu $33,11 \pm 4,05$ h. Rozdíl nebyl statisticky významný ($p = 0,506$).

Tab. 18. Kinetika a parametry transdermální absorpce pyrenu při samostatné aplikaci

Vzorek č.	Kumulativní absorpce (nmol/cm ²) v jednotlivých časových intervalech (h)									Flux (nmol/cm ² /h)	Lag time (h)
	12	20	24	28	44	52	68	72	76		
1	0	0,051	0,090	0,144	0,541	0,812	1,473	1,673	1,852	0,046	36,11
2	0,124	0,538	0,822	1,112	3,040	4,089	6,711	7,515	7,980	0,168	27,89
3	0,130	0,668	1,028	1,552	4,232	5,602	8,815	9,532	10,402	0,199	23,52
4	0,277	1,169	1,825	2,474	6,244	8,110	12,573	13,272	14,888	0,273	22,10
5	0	0,045	0,101	0,172	0,798	1,276	2,433	2,710	3,089	0,080	37,48
6	0	0,040	0,083	0,142	0,624	0,915	1,789	1,985	2,241	0,058	37,57
AP	0,089	0,418	0,658	0,933	2,580	3,467	5,632	6,115	6,742	0,137	30,78
VSO	0,111	0,460	0,706	0,961	2,346	2,995	4,512	4,759	5,269	0,091	7,15
MED	0,062	0,294	0,461	0,642	1,919	2,682	4,572	5,113	5,534	0,124	32,00
MIN	0	0,040	0,083	0,142	0,541	0,812	1,473	1,673	1,852	0,046	22,10
MAX	0,277	1,169	1,825	2,474	6,244	8,110	12,573	13,272	14,888	0,273	37,57

Legenda: AP - aritmetický průměr; VSO - výběrová směrodatná odchylka; MED - medián; MIN - nejnižší hodnota; MAX – nejvyšší hodnota

Tab. 19. Kinetika a parametry transdermální absorpce pyrenu při aplikaci směsi PAU

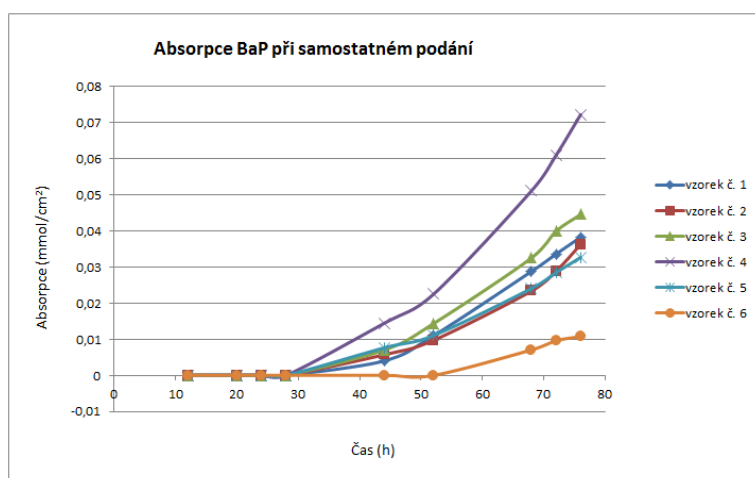
Vzorek č.	Kumulativní absorpce (nmol/cm ²) v jednotlivých časových intervalech (h)										Flux (nmol/cm ² /h)	Lag time (h)
	8	12	20	24	28	44	52	68	72	76		
1	0	0,010	0,103	0,175	0,290	0,990	1,424	2,388	2,629	2,857	0,061	28,48
2	0	0	0,010	0,016	0,023	0,107	0,179	0,350	0,400	0,447	0,013	40,22
3	0	0	0,015	0,027	0,040	0,197	0,314	0,590	0,679	0,726	0,018	34,74
4	0	0,010	0,108	0,181	0,276	0,974	1,396	2,398	2,656	2,959	0,066	31,40
5	0	0,005	0,072	0,120	0,194	0,696	1,003	1,671	1,874	2,102	0,046	32,80
6	0	0	0	0	0,0102	0,032	0,045	0,085	0,099	0,118	0,002	33,11
AP	0	0,004	0,051	0,087	0,139	0,499	0,727	1,247	1,390	1,535	0,034	32,10
VSO	0	0,005	0,049	0,082	0,130	0,440	0,624	1,038	1,143	1,260	0,027	4,05
MED	0	0,003	0,044	0,074	0,117	0,446	0,658	1,131	1,277	1,414	0,032	32,10
MIN	0	0	0	0	0,010	0,032	0,045	0,085	0,099	0,118	0,002	28,48
MAX	0	0,010	0,108	0,181	0,290	0,990	1,424	2,398	2,656	2,959	0,066	40,22

Legenda: AP - aritmetický průměr; VSO - výběrová směrodatná odchylka; MED - medián; MIN - nejnižší hodnota; MAX – nejvyšší hodnota

Absorpce benzo[a]pyrenu probíhala nejpomaleji a dosahovala nejnižších hodnot. V případě aplikace benzo[a]pyrenu ve směsi byla jeho absorpce zanedbatelná a stanovitelné hodnoty byly nalezeny pouze u dvou vzorků v posledním časovém intervalu odběru (po 76 h). Kinetiku transdermální absorpce benzo[a]pyrenu při samostatné aplikaci zachycuje graf 12. Parametry transdermální absorpce při samostatné aplikaci a při aplikaci směsi PAU shrnují tabulky 20 a 21.

Jak vyplývá z tabulky 20, v případě samostatné aplikace benzo[a]pyrenu byla průměrná hodnota veličiny flux $0,0017 \pm 0,0012$ nmol/cm²/h (aritmetický průměr ± VSO; vzhledem k velmi nízkým hodnotám je v tomto případě flux uveden s přesností na čtyři desetinná místa) a průměrná hodnota veličiny lag time $50,98 \pm 13,28$ h.

Graf 12. Kinetika transdermální absorpce benzo[a]pyrenu při samostatné aplikaci



Legenda: Jednotlivé křivky znázorňují průběh transdermální absorpce na jednotlivých vzorcích kůže.

Tab. 20. Kinetika a parametry transdermální absorpce benzo[a]pyrenu při samostatné aplikaci

Vzorek č.	Kumulativní absorpce (nmol/cm ²) v jednotlivých časových intervalech (h)									Flux (nmol/cm ² /h)	Lag time (h)
	12	20	24	28	44	52	68	72	76		
1	0	0	0	0	0,004	0,011	0,029	0,034	0,038	0,0012	44,08
2	0	0	0	0	0,006	0,010	0,023	0,029	0,036	0,0008	30,98
3	0	0	0	0	0,007	0,014	0,033	0,040	0,045	0,0014	44,25
4	0	0	0	0	0,014	0,022	0,051	0,061	0,072	0,0041	64,98
5	0	0	0	0	0,008	0,011	0,024	0,028	0,033	0,0016	60,21
6	0	0	0	0	0	0	0,007	0,010	0,011	0,0011	61,37
AP	0	0	0	0	0,006	0,011	0,028	0,034	0,039	0,0017	50,98
VSO	0	0	0	0	0,005	0,007	0,014	0,017	0,020	0,0012	13,28
MED	0	0	0	0	0,006	0,011	0,026	0,031	0,037	0,0013	52,23
MIN	0	0	0	0	0	0	0,007	0,010	0,011	0,0008	30,98
MAX	0	0	0	0	0,014	0,022	0,051	0,061	0,072	0,0041	64,98

Legenda: AP - aritmetický průměr; VSO - výběrová směrodatná odchylka; MED - medián; MIN - nejnižší hodnota; MAX – nejvyšší hodnota.

V případě transdermální absorpce benzo[a]pyrenu po aplikaci směsi PAU nebylo možno stanovit (z důvodu nedostatku dat) veličinu flux ani veličinu lag time (Tab. 21).

Tab. 21. Kinetika transdermální absorpce BaP při aplikaci směsi PAU

Vzorek č.	Kumulativní absorpce (nmol/cm ²) v jednotlivých časových intervalech (h)								
	12	20	24	28	44	52	68	72	76
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,006
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0,009
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0

6.2.3.2 Transdermální absorpce fluorenu, fluorantenu, antracenu a benz[a]antracenu

V experimentu bylo použito 33 difúzních komůrek s kůžemi od tří různých dárců. Receptorová část difúzních komůrek byla naplněna 10 ml receptorové tekutiny tvořené Hanksovým roztokem se 4 % bovinního sérového albuminu a gentamicinem o koncentraci 50 mg/l. Komůrky byly umístěny ve vodní lázni udržující na povrchu kůže teplotu 32±1 °C, receptorová tekutina byla kontinuálně míchána magnetickým míchadlem (rychlost cca 300 rpm).

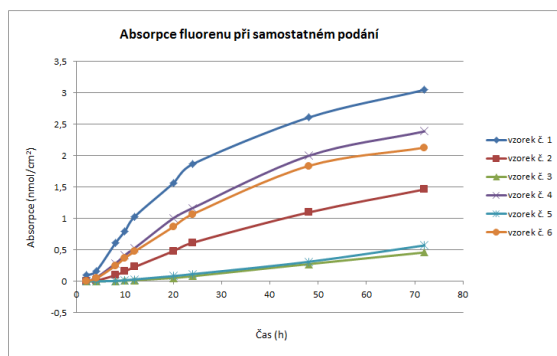
Po hodinové temperaci a ověření TEWL a TER bylo na donorovou část epidermis v šesti komůrkách (vždy po dvou vzorcích kůže od tří různých dárců) aplikováno 100 µl čerstvě připraveného acetonového roztoku fluorenu (koncentrace 0,95 mg/g). Do dalších „baterií“ po šesti komůrkách bylo aplikováno 100 µl acetonového roztoku fluorantenu (koncentrace 1,4 mg/g), 100 µl acetonového roztoku antracenu (koncentrace 0,7 mg/g)

a 100 μ l acetonového roztoku benz[a]antracenu (koncentrace 0,45 mg/g). Do poslední šestice testovacích komůrek bylo aplikováno 100 μ l acetonového roztoku směsi PAU, která obsahovala fluoren, fluoranten, antracen a benz[a]antracen ve stejných koncentracích jako při samostatném podání. Do posledních tří komůrek byl aplikován samotný aceton a sloužily jako kontrolní. Všechny komůrky byly ponechány bez okluze. Experimenty probíhaly za běžných laboratorních podmínek.

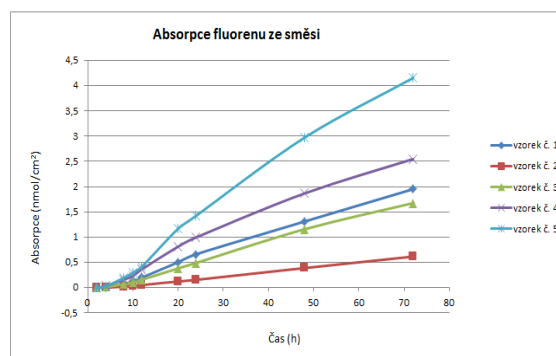
Receptorová tekutina byla odebírána v intervalech 2, 4, 8, 10, 12, 20, 24, 48 a 72 h. Odebrané množství bylo vždy nahrazeno čistou receptorovou tekutinou. Odebrané vzorky byly ihned zamrazeny při -20 $^{\circ}$ C a následně analyzovány pomocí HPLC. Koncentrace naměřené v testovacích komůrkách byly přepočteny na hodnoty absorpce v daných časových intervalech podle výše popsané metodiky. Hodnoty flux a lag time byly stanoveny pomocí matematického modelu.

Kinetiku transdermální absorpce fluorenu při samostatné aplikaci a při aplikaci směsi PAU zachycují grafy 13 a 14. Parametry transdermální absorpce při samostatné aplikaci a při aplikaci směsi PAU shrnují tabulky 22 a 23.

Graf 13. Kinetika transdermální absorpce fluorenu při samostatné aplikaci



Graf 14. Kinetika transdermální absorpce fluorenu při aplikaci směsi PAU



Legenda: Jednotlivé křivky znázorňují průběh transdermální absorpce na jednotlivých vzorcích kůže.

Jak vyplývá z tabulek, v případě samostatné aplikace fluorenu byla průměrná hodnota veličiny flux $0,042 \pm 0,032$ nmol/cm²/h (aritmetický průměr \pm VSO). Při aplikaci směsi PAU byla hodnota flux fluorenu $0,041 \pm 0,026$ nmol/cm²/h. Rozdíl v hodnotách flux nebyl statisticky významný ($p = 0,935$). V případě samostatné aplikace fluorenu byla průměrná hodnota veličiny lag time $8,14 \pm 8,10$ h (aritmetický průměr \pm VSO). Při aplikaci směsi PAU byla hodnota lag time fluorenu $7,00 \pm 1,77$ h. Rozdíl v hodnotách lag time nebyl statisticky významný ($p = 0,768$).

Tab. 22. Kinetika a parametry transdermální absorpce fluorenu při samostatné aplikaci

Vzorek č.	Kumulativní absorpce (nmol/cm ²) v jednotlivých časových intervalech (h)									Flux (nmol/cm ² /h)	Lag time (h)
	2	4	8	10	12	20	24	48	72		
1	0,096	0,162	0,607	0,801	1,031	1,564	1,866	2,608	3,049	0,090	1,21
2	0	0,011	0,097	0,163	0,229	0,481	0,615	1,097	1,464	0,030	4,46
3	0	0	0,006	0,012	0,019	0,054	0,082	0,275	0,46	0,009	15,70
4	0,006	0,057	0,283	0,418	0,53	1,005	1,167	1,998	2,388	0,058	3,06
5	0	0	0,006	0,018	0,031	0,084	0,115	0,311	0,572	0,011	20,88
6	0,006	0,046	0,248	0,374	0,476	0,868	1,069	1,837	2,129	0,054	3,49
AP	0,018	0,046	0,208	0,298	0,386	0,676	0,819	1,354	1,677	0,042	8,14
VSO	0,038	0,062	0,228	0,301	0,382	0,585	0,687	0,953	1,033	0,032	8,10
MED	0,003	0,029	0,173	0,269	0,353	0,675	0,842	1,467	1,797	0,042	3,98
MIN	0	0	0,006	0,012	0,019	0,054	0,082	0,257	0,46	0,009	1,21
MAX	0,096	0,162	0,607	0,801	0,031	1,564	1,866	2,608	3,049	0,090	20,88

Legenda: AP - aritmetický průměr; VSO - výběrová směrodatná odchylka; MED - medián; MIN - nejnižší hodnota; MAX – nejvyšší hodnota

Tab. 23. Kinetika a parametry transdermální absorpce fluorenu při aplikaci směsi PAU

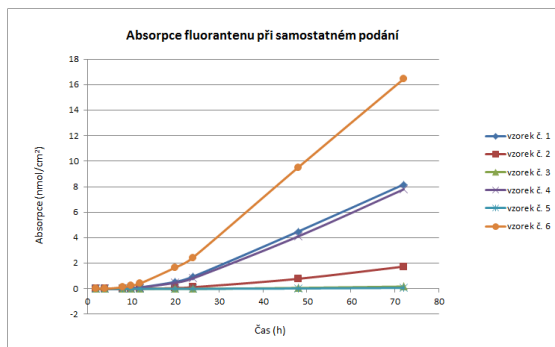
Vzorek č.	Kumulativní absorpce (nmol/cm ²) v jednotlivých časových intervalech (h)									Flux (nmol/cm ² /h)	Lag time (h)
	2	4	8	10	12	20	24	48	72		
1	0	0,005	0,077	0,116	0,199	0,503	0,662	1,310	1,951	0,034	6,38
2	0	0,000	0,020	0,028	0,051	0,122	0,155	0,388	0,615	0,010	9,52
3	0	0,010	0,072	0,106	0,157	0,381	0,490	1,157	1,674	0,030	7,80
4	0	0,031	0,161	0,230	0,364	0,812	0,995	1,866	2,548	0,050	4,78
5	0	0,025	0,196	0,294	0,417	1,168	1,424	2,972	4,153	0,079	6,52
AP	0	0,014	0,105	0,155	0,238	0,597	0,745	1,539	2,188	0,041	7,00
VSO	0	0,013	0,072	0,106	0,151	0,404	0,486	0,960	1,302	0,026	1,77
MED	0	0,010	0,077	0,116	0,199	0,503	0,662	1,310	1,951	0,034	6,52
MIN	0	0	0,020	0,028	0,051	0,122	0,155	0,388	0,615	0,010	4,78
MAX	0	0,031	0,196	0,294	0,417	1,168	1,424	2,972	4,153	0,079	9,52

Legenda: AP - aritmetický průměr; VSO - výběrová směrodatná odchylka; MED - medián; MIN - nejnižší hodnota; MAX – nejvyšší hodnota

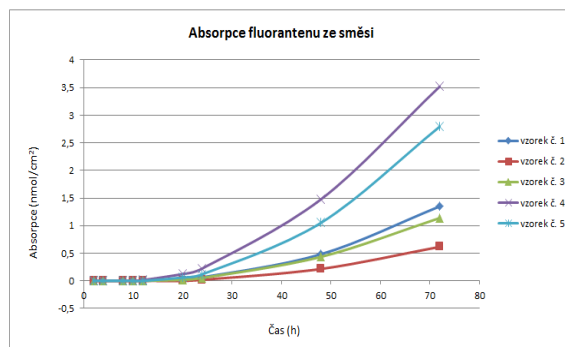
Kinetiku transdermální absorpce fluorantenu při samostatné aplikaci a při aplikaci směsi PAU zachycují grafy 15 a 16. Parametry transdermální absorpce při samostatné aplikaci a při aplikaci směsi PAU shrnují tabulky 24 a 25.

Jak vyplývá z tabulek, v případě samostatné aplikace fluorantenu byla průměrná hodnota veličiny flux $0,117 \pm 0,123$ nmol/cm²/h (aritmetický průměr \pm VSO). Při aplikaci směsi PAU byla hodnota flux fluorantenu $0,054 \pm 0,031$ nmol/cm²/h. Rozdíl v hodnotách flux nebyl statisticky významný ($p = 0,274$). V případě samostatné aplikace fluorantenu byla průměrná hodnota veličiny lag time $28,77 \pm 9,97$ h (aritmetický průměr \pm VSO). Při aplikaci směsi PAU byla hodnota lag time fluorantenu $37,93 \pm 4,22$ h. Rozdíl v hodnotách lag time nebyl statisticky významný ($p = 0,089$).

Graf 15. Kinetika transdermální absorpce fluorantenu při samostatné aplikaci



Graf 16. Kinetika transdermální absorpce fluorantenu při aplikaci směsi PAU



Legenda: Jednotlivé křivky znázorňují průběh transdermální absorpce na jednotlivých vzorcích kůže.

Tab. 24. Kinetika a parametry transdermální absorpce fluorantenu při samostatné aplikaci

Vzorek č.	Kumulativní absorpce (nmol/cm ²) v jednotlivých časových intervalech (h)									Flux (nmol/cm ² /h)	Lag time (h)
	2	4	8	10	12	20	24	48	72		
1	0	0	0,023	0,059	0,110	0,544	0,941	4,491	8,184	0,168	21,32
2	0	0	0	0	0	0,056	0,124	0,786	1,744	0,041	28,92
3	0	0	0	0	0	0	0	0,068	0,176	0,009	40,18
4	0	0	0,011	0,046	0,090	0,472	0,811	4,107	7,800	0,163	22,73
5	0	0	0	0	0	0	0	0,023	0,076	0,004	41,42
6	0	0	0,119	0,255	0,415	1,662	2,436	9,521	16,456	0,318	18,04
AP	0	0	0,026	0,060	0,103	0,456	0,719	3,166	5,739	0,117	28,77
VSO	0	0	0,047	0,099	0,161	0,638	0,937	3,692	6,388	0,123	9,97
MED	0	0	0,006	0,023	0,045	0,264	0,468	2,447	4,772	0,102	25,83
MIN	0	0	0	0	0	0	0	0,023	0,076	0,004	18,04
MAX	0	0	0,119	0,255	0,415	1,662	2,436	9,521	16,456	0,318	41,42

Legenda: AP - aritmetický průměr; VSO - výběrová směrodatná odchylka; MED - medián; MIN - nejnižší hodnota; MAX – nejvyšší hodnota

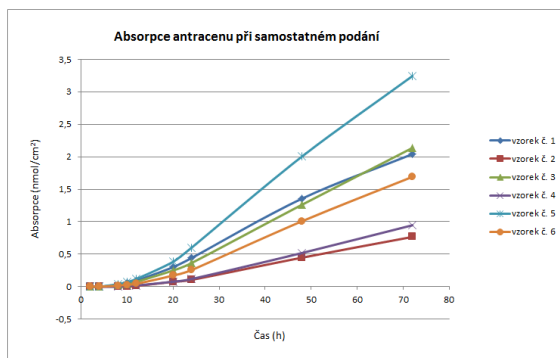
Tab. 25. Kinetika a parametry transdermální absorpce fluorantenu při aplikaci směsi PAU

Vzorek č.	Kumulativní absorpce (nmol/cm ²) v jednotlivých časových intervalech (h)									Flux (nmol/cm ² /h)	Lag time (h)
	2	4	8	10	12	20	24	48	72		
1	0	0	0	0	0	0,025	0,064	0,482	1,349	0,048	44,88
2	0	0	0	0	0	0	0,020	0,216	0,616	0,018	37,41
3	0	0	0	0	0	0,020	0,053	0,435	1,138	0,032	36,37
4	0	0	0	0	0,015	0,124	0,224	1,477	3,519	0,091	33,44
5	0	0	0	0	0	0,061	0,119	1,051	2,793	0,081	37,55
AP	0	0	0	0	0,003	0,046	0,096	0,732	1,883	0,054	37,93
VSO	0	0	0	0	0,007	0,049	0,080	0,518	1,220	0,031	4,22
MED	0	0	0	0	0	0,025	0,064	0,482	1,349	0,048	37,41
MIN	0	0	0	0	0	0	0,020	0,216	0,616	0,018	33,44
MAX	0	0	0	0	0,015	0,124	0,224	1,477	3,519	0,091	44,88

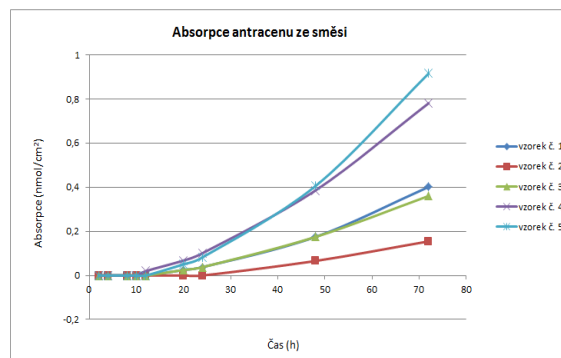
Legenda: AP - aritmetický průměr; VSO - výběrová směrodatná odchylka; MED - medián; MIN - nejnižší hodnota; MAX – nejvyšší hodnota

Kinetiku transdermální absorpce antracenu při samostatné aplikaci a při aplikaci směsi PAU zachycují grafy 17 a 18. Parametry transdermální absorpce při samostatné aplikaci a při aplikaci směsi PAU shrnují tabulky 26 a 27.

Graf 17. Kinetika transdermální absorpce antracenu při samostatné aplikaci



Graf 18. Kinetika transdermální absorpce antracenu při aplikaci směsi PAU



Legenda: Jednotlivé křivky znázorňují průběh transdermální absorpce na jednotlivých vzorcích kůže.

Jak vyplývá z tabulek, v případě samostatné aplikace antracenu byla průměrná hodnota veličiny flux $0,035 \pm 0,017$ nmol/cm²/h (aritmetický průměr±VSO). Při aplikaci směsi PAU byla hodnota flux antracenu $0,014 \pm 0,007$ nmol/cm²/h. Rozdíl v hodnotách flux byl statisticky významný ($p = 0,031$). V případě samostatné aplikace antracenu byla průměrná hodnota veličiny lag time $16,97 \pm 2,55$ h (aritmetický průměr±VSO). Při aplikaci směsi PAU byla hodnota lag time antracenu $34,12 \pm 6,59$ h. Rozdíl v hodnotách lag time byl statisticky významný ($p = 0,0002$).

Tab. 26. Kinetika a parametry transdermální absorpce antracenu při samostatné aplikaci

Vzorek č.	Kumulativní absorpce (nmol/cm ²) v jednotlivých časových intervalech (h)									Flux (nmol/cm ² /h)	Lag time (h)
	2	4	8	10	12	20	24	48	72		
1	0	0	0,028	0,059	0,093	0,300	0,441	1,356	2,042	0,040	13,30
2	0	0	0	0	0,011	0,075	0,105	0,447	0,767	0,015	18,79
3	0	0	0,023	0,042	0,074	0,250	0,364	1,262	2,138	0,040	16,34
4	0	0	0	0,017	0,019	0,077	0,118	0,519	0,947	0,019	20,49
5	0	0	0,040	0,072	0,118	0,383	0,600	2,005	3,245	0,062	15,36
6	0	0	0,017	0,030	0,044	0,172	0,256	1,008	1,692	0,033	17,53
AP	0	0	0,018	0,037	0,060	0,210	0,314	1,100	1,805	0,035	16,97
VSO	0	0	0,016	0,027	0,042	0,124	0,193	0,580	0,902	0,017	2,55
MED	0	0	0,020	0,036	0,059	0,211	0,310	1,135	1,867	0,037	16,97
MIN	0	0	0	0	0,011	0,075	0,105	0,447	0,767	0,015	13,30
MAX	0	0	0,040	0,072	0,118	0,383	0,600	2,005	3,245	0,062	20,49

Legenda: AP - aritmetický průměr; VSO - výběrová směrodatná odchylka; MED - medián; MIN - nejnižší hodnota; MAX – nejvyšší hodnota

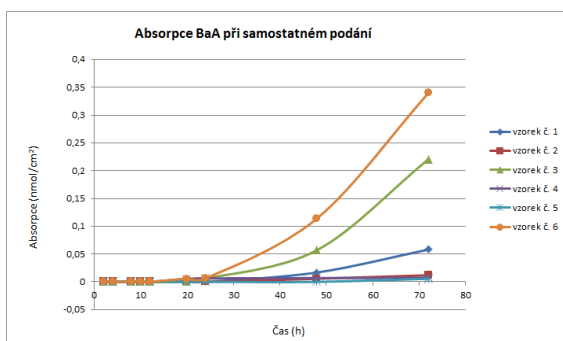
Tab. 27. Kinetika a parametry transdermální absorpce antracenu při aplikaci směsi PAU

Vzorek č.	Kumulativní absorpce (nmol/cm ²) v jednotlivých časových intervalech (h)									Flux (nmol/cm ² /h)	Lag time (h)
	2	4	8	10	12	20	24	48	72		
1	0	0	0	0	0	0,025	0,038	0,175	0,402	0,013	41,67
2	0	0	0	0	0	0	0	0,066	0,155	0,008	39,69
3	0	0	0	0	0	0,025	0,038	0,175	0,361	0,008	26,18
4	0	0	0	0	0,020	0,068	0,101	0,386	0,782	0,018	29,37
5	0	0	0	0	0	0,051	0,082	0,406	0,917	0,024	33,68
AP	0	0	0	0	0,004	0,034	0,0518	0,242	0,523	0,014	34,12
VSO	0	0	0	0	0,009	0,026	0,040	0,148	0,316	0,007	6,59
MED	0	0	0	0	0	0,025	0,038	0,175	0,402	0,013	33,68
MIN	0	0	0	0	0	0	0	0,066	0,155	0,008	26,18
MAX	0	0	0	0	0,020	0,068	0,101	0,406	0,917	0,024	41,67

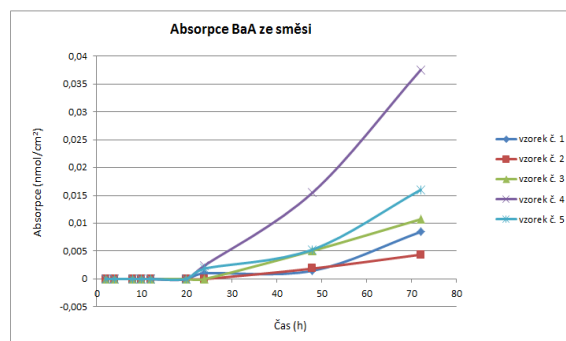
Legenda: AP - aritmetický průměr; VSO - výběrová směrodatná odchylka; MED - medián; MIN - nejnižší hodnota; MAX – nejvyšší hodnota

Kinetiku transdermální absorpce benz[a]antracenu při samostatné aplikaci a při aplikaci směsi PAU zachycují grafy 19 a 20. Parametry transdermální absorpce při samostatné aplikaci a při aplikaci směsi PAU shrnují tabulky 28 a 29.

Graf 19. Kinetika transdermální absorpce benz[a]antracenu při samostatné aplikaci



Graf 20. Kinetika transdermální absorpce benz[a]antracenu při aplikaci směsi PAU



Legenda: Jednotlivé křivky znázorňují průběh transdermální absorpce na jednotlivých vzorcích kůže.

Jak vyplývá z tabulek, v případě samostatné aplikace benz[a]antracenu byla průměrná hodnota veličiny flux $0,0058 \pm 0,0082$ nmol/cm²/h (aritmetický průměr ± VSO; vzhledem k velmi nízkým hodnotám je flux uveden s přesností na čtyři desetinná místa). Při aplikaci směsi PAU byla hodnota flux benz[a]antracenu $0,0005 \pm 0,0003$ nmol/cm²/h. Rozdíl v hodnotách flux nebyl statisticky významný ($p = 0,132$). V případě samostatné aplikace benz[a]antracenu byla průměrná hodnota veličiny lag time $37,95 \pm 25,02$ h (aritmetický průměr ± VSO). Při aplikaci směsi PAU byla hodnota lag time benz[a]antracenu $38,73 \pm 4,42$ h. Rozdíl v hodnotách lag time nebyl statisticky významný ($p = 0,947$).

Tab. 28. Kinetika a parametry transdermální absorpce benz[a]antracenu při samostatné aplikaci

Vzorek č.	Kumulativní absorpce (nmol/cm ²) v jednotlivých časových intervalech (h)									Flux (nmol/cm ² /h)	Lag time (h)
	2	4	8	10	12	20	24	48	72		
1	0	0	0	0	0	0	0	0,017	0,058	0,0027	41,75
2	0	0	0	0	0	0	0	0,006	0,012	0,0003	19,04
3	0	0	0	0	0	0	0,006	0,057	0,221	0,0206	76,85
4	0	0	0	0	0	0,006	0,006	0,007	0,007	0,0009	13,05
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0,006	0	n
6	0	0	0	0	0	0,006	0,006	0,114	0,340	0,0103	39,04
AP	0	0	0	0	0	0,002	0,003	0,033	0,107	0,0058	37,95
VSO	0	0	0	0	0	0,003	0,003	0,045	0,141	0,0082	25,02
MED	0	0	0	0	0	0	0,003	0,012	0,035	0,0018	39,04
MIN	0	0	0	0	0	0	0,000	0	0,006	0	13,08
MAX	0	0	0	0	0	0,006	0,006	0,114	0,340	0,0206	76,85

Legenda: AP - aritmetický průměr; VSO - výběrová směrodatná odchylka; MED - medián; MIN - nejnižší hodnota; MAX – nejvyšší hodnota. Vzhledem k malému počtu dat nebylo možno u vzorku č. 5 vyhodnotit lag time (n).

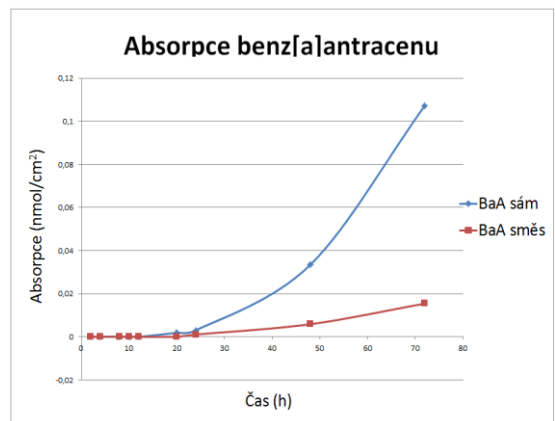
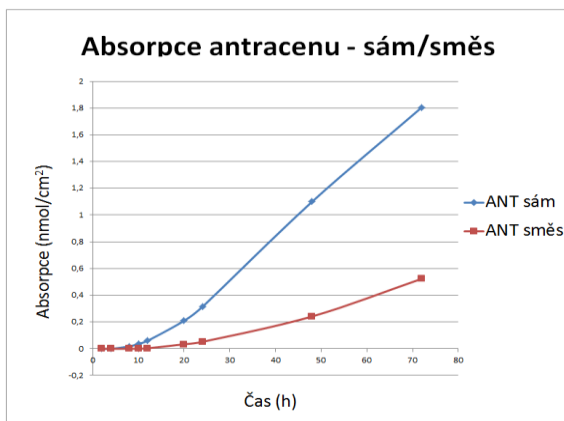
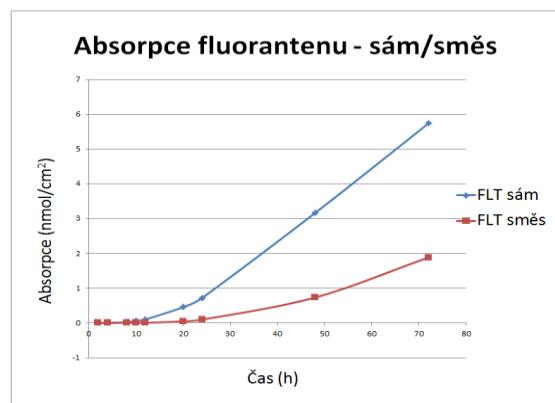
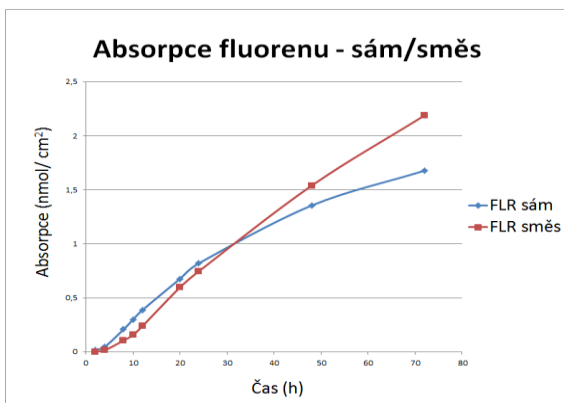
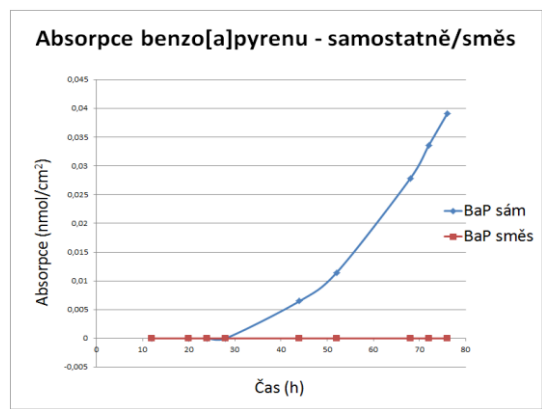
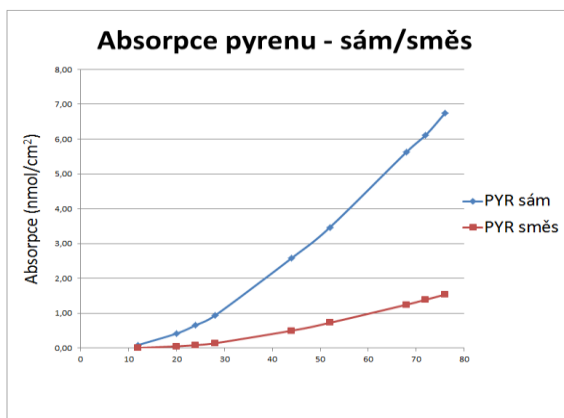
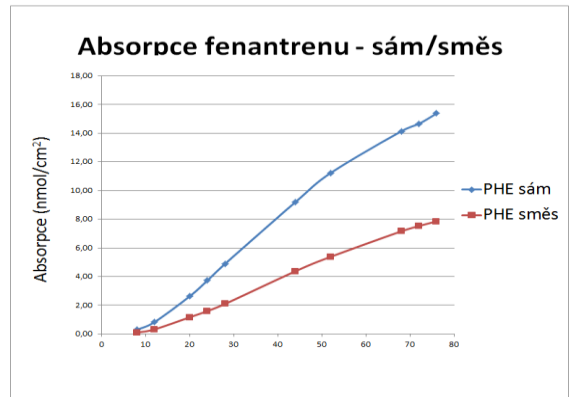
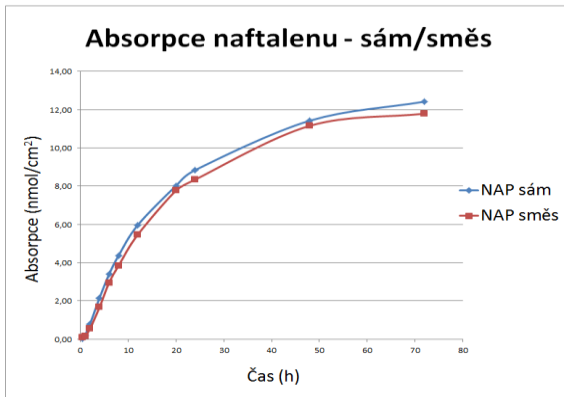
Tab. 29. Kinetika a parametry transdermální absorpce benz[a]antracenu při aplikaci směsi PAU

Vzorek č.	Kumulativní absorpce (nmol/cm ²) v jednotlivých časových intervalech (h)									Flux (nmol/cm ² /h)	Lag time (h)
	2	4	8	10	12	20	24	48	72		
1	0	0	0	0	0	0	0,001	0,001	0,008	0,0003	44,36
2	0	0	0	0	0	0	0	0,002	0,004	0,0002	39,54
3	0	0	0	0	0	0	0	0,005	0,011	0,0005	38,18
4	0	0	0	0	0	0	0,002	0,016	0,038	0,0009	32,04
5	0	0	0	0	0	0	0,002	0,005	0,016	0,0006	39,51
AP	0	0	0	0	0	0	0,001	0,006	0,015	0,0005	38,73
VSO	0	0	0	0	0	0	0,001	0,006	0,013	0,0003	4,42
MED	0	0	0	0	0	0	0,001	0,005	0,011	0,0005	39,51
MIN	0	0	0	0	0	0	0	0,001	0,004	0,0002	32,04
MAX	0	0	0	0	0	0	0,002	0,016	0,038	0,0009	44,36

Legenda: AP - aritmetický průměr; VSO - výběrová směrodatná odchylka; MED - medián; MIN - nejnižší hodnota; MAX – nejvyšší hodnota

Názorně ukazuje rozdíly mezi vlivem způsobu aplikace na transdermální absorpci vybraných zástupců PAU obrázků 41. Jsou na něm prezentovány grafy znázorňující rozdíly kinetiky transdermální absorpce mezi samostatným a směsným podáním jednotlivých zástupců PAU. Tyto grafy byly sestaveny z aritmetických průměrů absorpce v daných časových intervalech.

Obr. 41. Porovnání absorpce vybraných zástupců PAU v závislosti na způsobu podání (individuálně nebo ve směsi).



7. Diskuse

7.1 Zavádění metodiky

Penetrační membrána

Při výběru vhodné penetrační membrány byly zohledněny všechny argumenty uvedené výše (kap. 2.2.3). Alternativami bylo použití kůže laboratorních hlodavců, prasečí nebo lidské kůže. Kůže laboratorních hlodavců je sice dobře dostupná, avšak má odlišnou anatomickou stavbu (je mnohem tenčí, jednotlivé vrstvy epidermis obsahují mnohem méně buněk, než u lidské kůže). Tato kůže též obsahuje velké množství vlasových folikulů, které jsou významným místem usnadňujícím penetraci látek ze zevního prostředí. Bylo by sice možno použít kůži bezchlupých kmenů myši, potkanů a morčat, ale zde bylo lysosti dosaženo genetickou manipulací a nikoliv evolučním vývojem. Zvířecí srst je významným obranným mechanismem, znesnadňuje látkám z okolního prostředí přístup přímo k povrchu kůže. Genetická manipulace nevedla k vytvoření náhradního obranného mechanismu (k tvorbě odlišné korneální bariéry), jako je tomu u přirozeně lysých jedinců – člověka a prasete (Forslind 1998).

Vzhledem k důvodu experimentů (zjistit transdermální absorpci vybraných látek u člověka) by bylo ideální „nekomplikovat si výzkum použitím zvířecí kůže k získání lidských dat“ (Barry 1999). Získání lidské kůže však naráží jak na etické (informovaný souhlas dárce, schvalování experimentů etickou komisí) tak i technické problémy (kůže jedinců různého věku a zdravotního stavu, dezinfekce povrchu kůže před odběrem/operací). Z těchto důvodů je použití náhradního zvířecího modelu výhodnou alternativou. Jako nejvhodnější se zde jeví použití kůže prasečí (Sato 1991, Dick 1992, Sekkat 2002). Některé literární zdroje uvádějí, že prasečí kůže je pro daný účel vhodnější než uměle vytvořená lidská kůže (Schmook 2001). Schmook a kol. porovnávali absorpci čtyř různých nízkomolekulárních látek (terbinafinu, hydrokortizonu, klotrimazolu a kyseliny salicylové) skrz lidskou kůži, dva typy uměle vytvořené kůže (GraftskinTM a SkinethicTM) a dvě kůže zvířecí (potkaní a prasečí). Permeace lipofilních látek (klotrimazolu a terbinafinu) přes uměle vytvořené kožní modely byla až 800x vyšší než u lidské kůže a autoři tyto typy membrán označují jako nevhodné pro in vitro penetrační studie. Nejvíce podobná absorpčními charakteristikami byla prasečí kůže, kterou autoři doporučují jako nejvhodnější model lidské kůže.

Vzhledem k těmto argumentům byla jako absorpční membrána vybrána kůže ze zadní plochy ušního boltce prasete domácího. Jedná se o materiál relativně snadno dostupný, jeho získávání nepodléhá tak přísným etickým pravidlům, jako je tomu v případě použití lidské kůže. Jediným problémem při získávání uší byla neochota některých jatek prodávat nespářený biologický materiál (epidemiologické důvody).

Pro výběr kůže ušního boltce (oproti kůži zad a břicha) rozhodla její větší podobnost s lidskou kůží ve smyslu tloušťky kůže a množství vlasových folikulů. Tloušťka rohové vrstvy lidské kůže se pohybuje mezi 6–19 μm . Na zadní ploše ušního boltce prasete je tloušťka SC 17–28 μm , zatímco na jiných částech prasečího těla (záda, břicho) dosahuje tloušťky 26–80 μm . Tloušťka zbývajících vrstev lidské epidermis je na těle 34–56 μm , 70 μm na rameni, 82 μm na hýždích, což je velmi blízké tloušťce epidermis prasečího boltce (v průměru 72 μm). Na lidské kůži se nachází zhruba 14–32 chlupů na 1 cm^2 , na prasečím boltci to bylo 20 chlupů s příčným průměrem chlupu 82 μm . Na jiných částech prasečího těla byl průměr chlupů 186–260 μm u majoritních silných chlupů, minoritních slabých chlupů to bylo 38–71 μm . Lidské velusové chlupy mají příčný průměr 16–18 μm a terminální vlasy 57–68 μm . Mazové žlázy ústí u člověka i prasete ve stejné úrovni, cca 0,5 mm pod povrchem epidermis (Jacobi 2007, Godin 2007).

Kožní membrána může být v experimentech používána v podobě plné kůže (ta je zhruba 1–2 mm silná, obsahuje epidermis i dermis), nebo může být dermatomem seříznuta (většinou mívá tloušťku 200–500 μm , stále obsahuje část dermis). Dále může být použita samotná epidermis (oddělená tepelně, chemicky nebo enzymaticky) nebo jen samotné stratum corneum (oddělené enzymaticky). Poslední jmenovaná membrána je však již velmi tenká a manipulace s ní je velmi obtížná. Vzhledem k zavádění metodiky jsme zvolili nejsnadněji dostupný typ membrány (plnou kůži). Školící pracoviště není vybaveno dermatomem a příprava dermatomované kůže vyžaduje značnou praktickou zkušenost.

V případě použití hydrofilní donorové látky (kofein při validaci metodiky) nebyla silnější vrstva dermis u plné kůže překážkou a absorpce probíhala poměrně rychle (průměrný lag time $2,03 \pm 1,27$ h). Podobně při použití lipofilních PAU s malou molekulou (naftalen, fenantren, fluoren) postačila doba trvání experimentu (72 h) k dosažení doporučeného 2,7násobku doby lag time. Tento požadavek však nebyl splněn při testování PAU s větší molekulou (zejména benz[a]antracenu a benzo[a]pyrenu). Protože se jedná o látky silně hydrofobní, lze předpokládat, že přítomnost vodného prostředí dermis absorpci významně zpomaluje. Tomu jevu bychom se v budoucnu chtěli vyhnout použitím epidermální membrány, což je i v souladu s doporučením její preference u lipofilních látek

(Henning 2008). Odstranění dermis též lépe imituje reálnou situaci, kdy se svrchní kapilární pleteně nachází těsně pod bazální membránou pokožky.

Optimální variantou použití kůže je její aplikace do 24 h od odběru. Tato varianta je vhodná i pro souběžné testování absorpce a metabolismu procházející látky, neboť v kůži zůstává částečně zachována její enzymatické (biotransformační) kapacita. Druhou možností je použití kůže zmrazené, uchovávané při -18 až -20 °C. Tato varianta významně převažuje v pracích popisovaných v odborné literatuře a byla zvolena i pro naše experimenty. U zmrazené kůže bývá doporučováno její použití do jednoho roku od odběru (WHO 2006), nicméně ani po 466 dnech skladování nebyly nalezeny změny koeficientu permeability tritiované vody (Harrison 1984).

Jen na okraj, i vyšetření kůže 5 200 let staré zmrzlé mumie muže nalezeného v roce 1991 v Ötztalských Alpách (známého jako Ötzi) pomocí Ramanovské spektroskopie a elektronového mikroskopu neodhalilo významné změny ve stavbě a složení kůže. Byla nalezena mírná degradace proteinových komponent a oxidace některých olefinických vazeb, avšak integrita kůže zůstala zachována (Williams 1995).

Difúzní komůrky

Pro testování transdermální absorpce látek lze využít dva penetrační směry (vertikální a horizontální) a dva základní typy difúzních komůrek (statickou a průtokovou). V odborné literatuře převládá používání vertikálního směru penetrace a nebyly popsány významné rozdíly v hodnotách penetračních charakteristik při použití statické a průtokové komůrky (Clowes 1994). K testování *ex vivo* penetrace by bylo možné použít také mikrodialyzační metodu, kdy je část kůže pomocí svého cévního řečiště napojena na přístroj simulující krevní oběh v kůži a tekutina z venózní části oběhu je odebírána (a analyzována) v pravidelných intervalech (Schnetz 2001). Metoda je však přístrojově a finančně náročná. S ohledem na všechny výše uvedené důvody byla pro zavedení metodiky transdermální absorpce vybrána statická vertikální difúzní komůrka (komůrky byly vyrobeny na zakázku z borosilikátového skla).

Základními parametry komůrky je velikost penetrační plochy a objem receptorové části. Velikost penetrační plochy se pohybuje obvykle mezi $0,3$ – 5 cm² (OECD 2004a). Vnitřní průměr naší nádoby (1,5 cm) byl vybrán tak, aby splňoval doporučení Směrnice Evropské komise EU-SCCP/0970/06 (EU-SCCP 2006), která požaduje minimální velikost absorpční plochy $0,64$ cm². Absorpční plocha naší komůrky tak má $1,77$ cm².

Z kůže jednoho ucha bylo možno získat okolo 10 vzorků penetrační membrány. Při menším vnitřním průměru by sice bylo možné z kůže jednoho ucha získat více vzorků, nicméně menší vnitřní průměr by komplikoval zavádění sondy při měření TEWL.

Objem akceptorové části byl 10 ml. Doporučení OECD (OECD 2004a) udává objem receptorové části v rozmezí 2–20 ml. Menší objem by byl sice výhodnější vzhledem k nižší spotřebě materiálu (receptorové tekutiny), mohl by však nastat problém se zachováním „sink conditions“ (viz kap. 2.2.5) a frekvence odběrů a/nebo objemy odebírané RT by musely být proto u menší komůrky vyšší.

Testované látky

Výběr testované látky byl ovlivněn dlouhodobým zaměřením Ústavu hygieny a preventivního lékařství LF UK v Hradci Králové na problematiku expozice polycyklickým aromatickým uhlovodíkům (Borská 2006, 2009, 2010a,b, Fiala 2006). Problematika dermální expozice PAU zatím nebyla sledována soustavně a v odborné literatuře je možné najít pouze omezený počet prací na toto téma. Práce se většinou týkaly hodnocení profesionální expozice PAU (např. Jongeneelen 1990, 2001, Angerer 1997, Hansen 2008, Serdar 2012) nebo dermální kinetiky vybraných PAU v in vitro pokusech (Ng 1992, Moody 1995, vanRooij 1995, Sartorelli 1998, 1999, 2001, Kanikkannan 2001, Payan 2008).

Skupina PAU zahrnuje několik stovek sloučenin. Základními kritérii výběru vhodných reprezentantů pro dermální testování bylo jejich dostatečné zastoupení v běžné směsi PAU (kamenouhelném dehtu) a jejich potenciální zdravotní nebezpečnost. Procentuální zastoupení jednotlivých PAU v dehtu bylo posuzováno na základě rozboru jeho vzorku (kap. 5.7). Z uvedeného je zřejmé, že všech osm námi vybraných zástupců (antracen, benz[a]antracen, benzo[a]pyren, fenantren, fluoranten, fluoren, naftalen, pyren) se v analyzovaném vzorku vyskytovalo. S výjimkou naftalenu se všechny uvedené PAU nacházejí mezi látkami vybranými do seznamu 17 nejdůležitějších PAU podle ATSDR (ATSDR 1995). Benzo[a]pyren, benz[a]antracen, naftalen, fluoranten, fenantren a pyren jsou i na seznamu Priority List of Hazardous Substances (ATSDR 2013). Všechny se též nacházejí na seznamu 24 monitorovaných PAU podle doporučení EU, EU SCF a US EPA (Lerda 2011, EU SCF 2002). Šest z našich zástupců (benz[a]antracen, benzo[a]pyren, antracen, fluoren, fenantren, pyren) jsou též na seznamu National Waste Minimization Program US EPA (US EPA 2008).

V pracích zabývajících se transdermální absorpcí PAU in vitro bývá jako rozpouštědlo nejčastěji používán aceton (Yang 1986, Ng 1992, Moody 1995, Sartorelli 1998, 1999, 2001) nebo etanol (Payan 2008). Nutno však poznamenat, že tato rozpouštědla nejsou obvyklým nosným médiem v reálném životě (např. PAU v minerálních olejích a vazelině v průmyslu; unguentum leniens při Goeckermanově terapii lupénky). Porovnání vlivu acetonu a minerálního oleje (jako rozpouštědel) na absorpci 13 vybraných PAU provedli Sartorelli a kol. (Sartorelli 1999). V případě použití acetonového rozpouštědla byly fluxy přibližně 4–25krát vyšší a lag time srovnatelné až 5krát kratší než při použití olejového rozpouštědla.

Nicméně abychom mohli naše výsledky porovnat s literárními daty, použili jsme i my pro naše experimenty jako rozpouštědlo aceton. Řada prací Ústavu hygieny a preventivního lékařství LF U v Hradci Králové byla v minulosti zaměřena na studium účinků dermální expozice farmaceutickému dehtu při léčbě psoriázy (Borská 2006, 2009, 2010a,b, Fiala 2006). Abychom naše experimenty přiblížili reálné situaci při této aplikaci, provedli jsme souběžné testy transdermální absorpce vybraných PAU při použití acetonu a slunečnicového oleje jako rozpouštědla. Slunečnicový olej tvoří 50 % unguentum leniens, které je masťovým základem při přípravě dehtové pasty (MZ ČR 2009).

Nutno doplnit, že použití acetonu jako donorového rozpouštědla je problémovou volbou rovněž i z důvodu možného poškození kožní membrány, jak prokázali např. Tsai a kol. (Tsai 2001). Autoři testovali vliv acetonu na průchod látek (kofeinu, hydrokortizonu, estradiolu, progesteronu, sukrozy) přes myší kůži, kterou otírali tamponem namočeným v acetonu až do dosažení TEWL 10, 20, 30 a 40 g/m²/h (jako normální TEWL myší kůže uvádí 2,8–6,8 g/m²/h). Přes poškozenou kůži snadněji procházely hydrofilní látky, průchod lipofilních (estradiol, progesteron) ovlivněn nebyl. Při mikroskopickém vyšetření kůže zjistili, že počet jednotlivých vrstev SC zůstává stejný, ale korneocyty jsou expandované. Dále popsali ztenčení extracelulárních lipidových lamel, které na některých místech vymizely zcela a zbyly zde pouze „cell envelope“. V lamelách též našli lakuny vyplněné amorfní hmotou. Podobné výsledky našli při experimentech s myší kůží také Rissmann a kol. (Rissmann 2009). Kůži otírali tamponem smočeným v acetonu až do dosažení hodnoty TEWL 60 g/m²/h (jako normální udávají hodnotu TEWL 9,7±1,5 g/m²/h). Při histologickém vyšetření pomocí světelného mikroskopu autoři našli výrazně snížený počet vrstev korneocytů. Při analýze lipidového spektra zjistili, že bylo odstraněno cca 30 % množství lipidů, nicméně jejich složení zůstalo stejné, jako u neošetřené kůže. Při vyšetření v elektronovém mikroskopu bylo složení intercelulárních lamel stejné jako

u normální kůže. Autoři předpokládají, že během mytí acetonem se některé lipidy částečně rozpustily v acetonu, ale po odpaření acetonu se opět rekrystalizovaly a zformovaly do lipidových lamel. Svá pozorování uzavírají konstatováním, že při ošetření acetonem bylo poškození bariéry spíše vyvoláno mechanickým odstraněním korneocytů, než vlivem poškození lipidů.

Acetonové rozpouštědlo při testování absorpce PAU opakovaně používali též Sartorelli a kol. (Sartorelli 1998, 1999, 2001). Autoři uvádějí, že použití malého množství tohoto těkavého rozpouštědla nevede (po jeho brzkém odpaření) k poškození kožní bariéry (Sartorelli 1999).

Receptorová tekutina

Při validace metodiky pomocí kofeinu byl jako receptorová tekutina použit fyziologický roztok (Duracher 2009). Vzhledem k tomu, že kofein je látkou hydrofilní ($\log K_{o/w} = -0,07$), nebylo třeba jeho rozpustnost ve vodném prostředí modifikovat.

Složení vhodné receptorové tekutiny pro testy absorpce PAU bylo vybráno podle práce Ng a kol. (Ng 1992), kteří sledovali absorpci pyrenu, BaP a di(2-ethylhexyl)ftalátu. Základem této tekutiny je Hanksův roztok (vodný roztok obsahující glukózu a různé soli, složení viz tab. 4, kap. 5.5). I když je tento roztok používán poměrně často jako základ receptorové tekutiny, je nutno zmínit několik jeho nevýhod. Největší námi pozorovanou nevýhodou je uvolňování plynu, pravděpodobně CO_2 (Hanksův roztok obsahuje poměrně vysoké množství NaHCO_3), které vede k tvorbě bublinek, jež se usazují na spodní straně kožní membrány a snižují tím možnost absorpce látky do RT. Zároveň lze předpokládat změnu pH receptorové tekutiny v průběhu trvání pokusu (nebylo kontrolováno, neboť námi studované látky nejsou ionizovatelné), což může negativně ovlivnit absorpci některých, především ionizovatelných, látek. Z těchto důvodů pro další experimenty plánujeme použití jiného základu receptorové tekutiny, nejspíše fosfátového pufru o pH 7,4 (Selzer 2013).

Vzhledem k tomu, že PAU jsou látky lipofilní ($\log K_{o/w} > 3$; tab. 3, kap. 5.5), bylo nutno do vodné receptorové tekutiny přidat další nefyziologickou látku, která umožní zvýšení jejich rozpustnosti. V literatuře jsou nejčastěji používány 50% etanol, 6% polyetylen glykol 20 oleyl éter (PEG) nebo bovinní sérový albumin (BSA) používaný v koncentraci 3–5 % (OECD 2004a). Pro naše experimenty byl vybrán 4% BSA (Cross 2003). Jeho výhodou je, že na rozdíl od etanolu a PEG neovlivňuje kožní membránu a má

dostatečně velkou molekulu, která nepenetruje zpětně do kůže (Sarpotdar 1986). BSA by však nebyl vhodný při použití uměle vytvořené kůže, kterou poškozuje (Haberland 2006).

S ohledem na skutečnost, že doba experimentů přesahovala 24 h, bylo nutné přidávat do RT též antimikrobiální složku. Doporučovanými látkami jsou formaldehyd, azid sodný, nebo antibiotika (gentamicin, streptomycin, penicilin). Podle práce Ng a kol. (Ng 1992) jsme zvolili použití gentamicinu v koncentraci 50 mg/l. Za běžných podmínek byla tato koncentrace dostačující, avšak při některých experimentech, které probíhaly za extrémně teplého letního počasí, docházelo v průběhu druhého a třetího dne experimentu k záněvu RT. Při dalších experimentech budeme za těchto podmínek koncentraci antibiotika zvyšovat nebo použijeme kombinaci antibiotik (kombinace streptomycinu a penicilinu).

V průběhu experimentu je též důležité zachování „sink conditions“. Aby nebyla ovlivněna absorpce látky do receptorové tekutiny (a zpětná sorpce látky z RT do kůže) nesmí její koncentrace v RT přesáhnout 10 % její možné maximální rozpustnosti v RT. V dostupné literatuře jsme požadované informace nenalezli a z toho důvodu byla testována rozpustnost jednotlivých PAU v RT (viz tab. 5 a 6, kap. 5.5). Jak ukazují výsledky, hodnoty maximální rozpustnosti jednotlivých zástupců PAU ve vodném prostředí receptorové tekutiny se lišily. Nejlépe rozpustnou sloučeninou byl naftalen, jehož průměrná koncentrace v roztoku RT po 66 hodinách dosahovala 1 665,25 $\mu\text{mol/l}$ při samostatné aplikaci a 1 556,43 $\mu\text{mol/l}$ v případě testování rozpustnosti směsi PAU. Nejnižší rozpustnost v receptorové tekutině měl benzo[a]pyren, který při samostatné aplikaci dosáhl maximální průměrné koncentrace 7,32 $\mu\text{mol/l}$ a při aplikaci směsi PAU koncentrace 10,85 $\mu\text{mol/l}$. Benzo[a]pyren byl také jediným polyaromátem, který se lépe rozpouštěl v přítomnosti jiných látek. U ostatních testovaných PAU byla vždy vyšší koncentrace přítomna v případě individuální aplikace. Po 66 h rozpouštění byl nejvyšší rozdíl průměrné koncentrace látky mezi samostatnou aplikací a aplikací směsi PAU u naftalenu, kde činil 7 %; nejvyšší byl u pyrenu, kde dosahoval 99 %. V případě benzo[a]pyrenu byla zjištěna vyšší rozpustnost při aplikaci směsi PAU a rozdíl mezi individuální a směsnou aplikací činil 33 %. Opakování testu rozpustností benzo[a]pyrenu tento výsledek potvrdilo. Pro tento jev zatím nemáme vysvětlení.

Porovnání maximální rozpustnosti PAU v receptorové tekutině a rozpětí námi měřených koncentrací jednotlivých PAU v RT v průběhu testů transdermální absorpce udává Tab. 7 (kap. 5.5). Vzhledem k tomu, že maximální rozpustnosti PAU v RT dosahují

zhruba sto- až tisícinásobných násobných hodnot oproti měřeným hodnotám, lze konstatovat, že podmínky „sink conditions“ byly zachovány.

Receptorová tekutina byla po celou dobu experimentu míchána pomocí magnetického míchadla vloženého do dolní části komůrky. Pohyb RT usnadňuje přestup látky z membrány do roztoku a imituje „odsávání“ látky do krevních a lymfatických cév ve škáře za in vivo stavu. Rychlost míchání má být taková, aby nedocházelo ke vzniku víru v RT, v našich experimentech to odpovídalo rychlosti 300 otáček za minutu (rpm).

Hodnocení integrity kůže

Výběr nepoškozeného kožního vzorku je základním předpokladem pro správné provedení testu. Z možností hodnocení integrity kůže (popsány v kapitole 2.2.4) jsme v souladu s odbornou literaturou využívali vizuální hodnocení vzorků a vyřazení neodpovídajících (příliš vysokých, řádově deseti až stonásobně vyšších) výsledků, doplněné přístrojovým měřením TEWL (transepidermální ztráty vody) a TER (elektrické rezistence) kožních vzorků.

Vizuální kontrola byla prováděna bez přídavného vybavení, které představuje lupa, prosvětlení kůže nebo kontrola mikroskopem (Nangia 1998, Henning 2008, Frasch 2009). Součástí byla nejen kontrola kůže před instalací do difúzní komůrky, ale též po jednohodinové ekvilibraci kůže v komůrce. Zjistili jsme, že po uplynutí této doby má nepoškozená kůže mírně oschlý matový povrch. Pokud byl povrch kůže „vláčný“, byly její hodnoty TEWL obvykle vyšší než doporučené. Stejně poznatky popisují i Ackermann a kol. (Ackermann 2010).

K hodnocení TEWL byl používán přístroj MPA 5 (výrobce Courage-Khazaka, Německo), který je nástupcem přístroje Tewameter TM300 (stejný výrobce). Tento přístroj byl v testu srovnávacím přístroje pracující na různém principu (otevřený nebo uzavřený systém) vyhodnocen jako nejlepší (Fluhr 2006). I když je tato kontrolní metoda oficiálně i různými autory doporučována (OECD 2004a, WHO 2006, Raney 2006, Simonsen 2007, Elmahjoubi 2009), je nutno doplnit, že některými autory je kritizována (Chilcott 2002, Netzlauff 2006, Henning 2008). Důvodem je malá citlivost na bodové defekty kůže (propíchnutí), které však významně ovlivňují propustnost. Stejný jev jsme pozorovali i v našich experimentech, kdy významný vliv na zvýšení hodnot TEWL mělo vliv až několikanásobné propíchnutí kůže tenkou injekční jehlou, zatímco při poškrábání povrchu kůže (touto jehlou) stačil již cca 1 mm dlouhý defekt k významnému zvýšení hodnoty TEWL (nepublikovaná data).

Dalším potenciálním problémem používání metody TEWL je chybějící standardizace. Obecně jsou používány dva typy měření (otevřená nebo uzavřená komůrka sondy) ve značném počtu typů přístrojů od různých výrobců. Každý přístroj má svá specifika a jím získané hodnoty se liší. V literatuře jsou popisovány různé hodnoty TEWL kritéria pro použití nebo vyřazení kožního vzorku v experimentu. Většinou se pohybují v rozmezí 2–30 g/m²/h. Elmahjoubi a kol. používali uzavřený typ komůrky (přístroj AquaFlux, výrobce Biox Systems Ltd, Londýn, Velká Británie) a na kůži prasečího ucha naměřili průměrný TEWL 30,21±1,27 g/m²/h (Elmahjoubi 2009). Vallet a kol. (Vallet 2008) použili pro měření otevřený systém (přístroj Tewameter TM210, výrobce Courage-Khazaka, Německo) a uvádějí jako normální hodnoty TEWL pro prasečí kůži 2–30 g/m²/h, v experimentech následně používali vzorky s hodnotami 3–11 g/m²/h. Stejný přístroj a vzorky kůže prasečího ucha použili i Duracher a kol. (Duracher 2009), kteří v experimentech použili vzorky s TEWL do 15 g/m²/h. Elkeeb a kol. (Elkeeb 2010) provedli porovnání měření TEWL pomocí tří přístrojů a srovnávali tyto výsledky s testem použití tritiové vody. K testování používali dermatomovanou lidskou kůži. Při použití přístrojů Tewameter TM 210 (otevřený systém) a přístroje VapoMeter (uzavřený systém, výrobce Delfin Technologies Ltd., Finsko) naměřili hodnotu TEWL u nepoškozené kůže přibližně stejnou, okolo 10 g/m²/h. Přístrojem Aqua Flux AF200 (uzavřený systém) však naměřili hladiny až okolo 30 g/m²/h. Rubio a kol. (Rubio 2011) uvádí průměrnou hodnotu TEWL dermatomované kůže prasečích zad (měřenou přístrojem Tewameter TM210) 8,1±2 g/m²/h. Závěrem nutno doplnit, že na hodnoty TEWL má též vliv typ použité penetrační membrány, jiný je u plné kůže a jiný u dermatomované kůže (Atrux-Tallau 2007).

Vzhledem k tomu, že náš přístroj k měření TEWL (MPA 5) je nástupcem řady Tewameter, rozhodli jsme se jako kritérium pro vyřazování kožních vzorků užívat hodnotu TEWL nad 15 g/m²/h. Tuto hodnotu (nebo jí blízkou) používali u stejného typu kůže i jiní autoři (Duracher 2009, Vallet 2008).

Další použitou metodou k ověření integrity kůže bylo měření elektrické rezistence kůže (TER). Podobně jako při měření TEWL, ani zde neexistuje jedna jasná standardní hodnota udávající použitelnost kožního vzorku. Výjimku tvoří jen potkaní kůže, kde je OECD požadováno 5 kΩ (OECD 2013a). Hodnota TER byla v publikovaných studiích měřena různými přístroji pracujícími na různých frekvencích (od 1 do 1000 Hz), na různých penetračních membránách (kůže myší, potkaní, prasečí, lidská; každá z nich může být plná, dermatomovaná nebo jen epidermální membrána; přehled např. Fasano 2002,

White 2011). Nutno zmínit i další vlivy, které ovlivňují elektrický odpor kůže, jako jsou hydratace kůže (vyšší hydratace vede ke snížení elektrické rezistence) a ionizace média (Fasano 2002).

S ohledem na námi používanou kožní membráně (plnou prasečí kůži) jsme se rozhodli přijmout jako vylučující kritérium hodnotu TER $1,57 \pm 0,13 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$, kterou na stejném typu membrány publikovali Davies a kol. (Davies 2004). Vzorky kůže, kde byl naměřen nižší odpor (při poškození kůže se její elektrický odpor snižuje, na rozdíl od TEWL, který se u poškozené kůže zvyšuje), byly z experimentů vyřazeny.

Doba trvání experimentu

Doba trvání testu transdermální absorpce může být různá, v ideálním případě imituje podmínky reálné situace. OECD doporučuje jako nejvhodnější dobu trvání experimentu in vitro 24 h (OECD 2004c) a déle (OECD 2004a). Dolní hranice není v podstatě ničím omezena, horní hranice této doby je limitována enzymatickou a chemickou degradací kožní bariéry, kterou po 72 h již nelze považovat za intaktní. Nicméně v odborné literatuře byly popsány i delší studie (Ge 2010).

Doba testování by se měla rovnat zhruba 2,7 násobku lag time. Před touto dobou nedojde k vytvoření ustáleného stavu (Williams 2003, Selzer 2013). Hodnota lag time je přitom výrazně ovlivňován tloušťkou kožní membrány, nejdelší je při použití plné kůže (Henning 2008).

V případě testování validity našeho kožního modelu (za použití kofeinu jako testované látky) byla doba trvání experimentu dána podmínkami původní studie (Duracher 2009) a činila 24 hodin.

Při testování absorpce polyaromátů byla, v návaznosti na výsledky jiných autorů, zvolena doba trvání experimentu 72 h (Sartorelli 1998, 1999 Payan 2008). Pro zástupce PAU s menší molekulou byl tento interval více než dostačující. Například u naftalenu činil jeho průměrný lag time v případě použití acetonového rozpouštědla $0,75 \pm 0,33 \text{ h}$, za použití slunečnicového oleje $2,07 \pm 1,50 \text{ h}$. Při samostatném podání naftalenu byla průměrná hodnota lag time $0,86 \pm 0,65 \text{ h}$, při aplikaci ze směsi PAU byla $0,98 \pm 1,06 \text{ h}$. Uvedená doba byla vyhovující i pro absorpci fluorenu (průměrný lag time $8,14 \pm 8,10 \text{ h}$ při samostatné aplikaci a $7,00 \pm 1,77 \text{ h}$ při aplikaci směsi) a fenantrenu (průměrný lag time $14,87 \pm 5,49 \text{ h}$ při individuální aplikaci, $16,77 \pm 6,06 \text{ h}$ při aplikaci směsi).

V případě antracenu aplikovaného samostatně (průměrný lag time $16,97 \pm 2,55 \text{ h}$) byla doba 72 hodin ještě dostačující, avšak při aplikaci směsi obsahující antracen

(průměrný lag time $34,12 \pm 6,59$ h) již by byla vhodnější doba delší. Podobně tomu bylo u zbývajících zástupců PAU s větší molekulou. U benz[a]antracenu byla průměrná hodnota lag time při samostatné aplikaci $37,95 \pm 25,02$ h a $38,73 \pm 4,42$ h při aplikaci směsi; u pyrenu $30,78 \pm 7,15$ h při samostatné aplikaci a $33,11 \pm 4,05$ h při aplikaci směsi. U benzo[a]pyrenu byla hodnota lag time dokonce $50,98 \pm 13,28$ h při individuální aplikaci a v případě směsného podání k absorpci vůbec nedošlo.

Hodnocení transdermální absorpce

Zatím nejlepší metoda k hodnocení transdermální absorpce („total recovery“) stanovuje testovanou látku ve všech kompartmentech modelu (OECD 2004a). Je prováděna analýza testované látky z povrchu kůže, v rohové vrstvě, ve zbývající epidermis, v dermis a v receptorové tekutině. Rozdělení kůže na jednotlivé součásti s různými penetračními vlastnostmi umožňuje popsat chování testované látky uvnitř membrány. Lze odhadnout, kterými částmi testovaná látka prochází dobře a kterými hůře, a kde se může deponovat. Z takto získaných hodnot je potom možno vypočítat celkovou absorpci v procentech podané dávky nebo v hmotnostních jednotkách (gramy, moly) v závislosti na čase a resorpční ploše. Dále je možno spočítat flux (v případě podání *infinite* [„nekonečné“] dávky se jedná o steady state flux; v případě podání *finite* [„konečné“] dávky o pseudo-steady state flux), lag time a permeační koeficient testované látky.

Přístup „total recovery“ je složitý a vyžaduje určitou zkušenost s prováděním testů transdermální absorpce. Tyto zkušenosti nám (vzhledem k zavádění metodiky) chyběly, a proto jsme k hodnocení absorpce zvolili přístup jednodušší, kdy je kůže brána jako jeden celek (Selzer 2013) a k výpočtům základních parametrů absorpce (flux a lag time) se používá pouze analýza receptorové tekutiny. Procentuální hodnocení vstřebané dávky, které bývalo používáno ve starších publikovaných pracích (např. Ng 1992), se nám jevilo jako méně vhodný hodnotící parametr, neboť je velmi závislé na množství a koncentraci donorové látky a nepopisuje proces absorpce tak dobře, jako flux (množství látky, které prochází skrz membránu v době ustáleného průtoku) a lag time (doba potřebná k ustavení tohoto ustáleného průtoku). Obdobné stanovisko bylo nedávno publikováno v práci Frasch a kol. (Frasch 2014).

Hodnoty absorpce látek v jednotlivých difúzních komůrkách (v daných časových intervalech) byly vypočteny z hodnot koncentrací látek ve vzorcích receptorové tekutiny, k nimž byla přičítána množství odebraná v předchozích časových intervalech (Nielsen

2010). Mnohem obtížnějším je ale stanovení fluxu a lag time. Metodiky provádění testů transdermální absorpce popisuje poměrně podrobně řada oficiálních dokumentů (a odborných článků). Metodiky obsahují doporučené protokoly provádění testů a specifikují požadavky experimentů (typy komůrek, kožních vzorků, testovaných látek, receptorové tekutiny, způsob analýzy). Chybějí však přesnější definice způsobů, jak mají být získané hodnoty absorpce zpracovány a dále hodnoceny (Colipa 1997, Diembeck 1999, OECD 2004a, 2004c, EU 2004, US EPA 2004a, WHO 2006, OECD 2011, EFSA 2012). K výpočtu hodnoty fluxu zde bývá uváděn první Fickův zákon (viz kap. 2.2.9), který je však těžko použitelný k výpočtu fluxu ze získaných hodnot absorpce. Flux proto bývá počítán z lineární části křivky absorpce/čas (Frasch 2007, Duracher 2009, Baert 2010). Toto stanovení „lineární části křivky“ je však prováděno individuálně hodnotitelem (konzultováno s renomovanými pracovišti zabývajícími se problematikou transdermální absorpce) a záleží na rozhodnutí experimentátora, které body křivky budou zahrnuty do výpočtu. Hodnota fluxu je potom vypočtena pomocí lineární regrese přímé části grafu absorpce (Graf 2) podle rovnice přímky ($y = kx + q$). Hodnota fluxu odpovídá směrnici přímky (k) a hodnota lag time je dána hodnotou x pro $y = 0$.

Vzhledem k tomu, že neexistuje oficiální doporučení, které body by měly být zahrnuty do hodnocení pomocí lineární regrese, může být posuzování hodnot absorpce různými hodnotiteli zatíženo poměrně velkou interindividuální chybou. Na tento problém poukázali i Niedorf a kol. (Niedorf 2008), kteří v návaznosti vytvořili doporučení, které body do hodnocení zahrnout a které eliminovat. Avšak i tento algoritmus je do určité míry závislý na posouzení hodnotitele.

Pro odstranění výše jmenovaných nedostatků jsme ve spolupráci s Ústavem Lékařské biofyziky (Lékařská fakulta UK v Hradci Králové) sestavili počítačový model, který k odhadu parametrů fluxu a lag time využívá všechna experimentálně získaná data a eliminuje tak subjektivitu odhadu zanášenou hodnotitelem (viz kap. 5.8).

7.2 Experimentální část

Validace metodiky – test transdermální absorpce kofeinu

Ověření metodiky testování transdermální absorpce látek bylo provedeno pomocí dermální permeace kofeinu in vitro. Kofein spolu s testosteronem a benzoovou kyselinou jsou doporučovány OECD jako referenční látky pro provádění in vivo a in vitro testů

dermální absorpce (OECD 2004a). Vzhledem k tomu, že dermální kinetika kofeinu je dobře známa, je často používán k porovnávání různých testovaných parametrů. Jedná se například o vliv acetonu na poškození bariéry ve stratum corneum (Tsai 2001), vliv teploty na absorpci (Akomeah 2004), vliv typu kožní membrány na absorpci (Atrux-Tallau 2007), porovnání absorpce na kůži normální a uměle vytvořené (Netzlaff 2007), vliv různého typu urychlovačů (enhancerů) absorpce (Duracher 2009), vliv koncentrace donorové látky na absorpci (Mustapha 2011) a vliv podmínek skladování kůže na následnou absorpci (Nielsen 2011).

Základem pro validaci našeho modelu byla práce Duracher a kol. (Duracher 2009), v níž jsou pro absorpci kofeinu na nedermatované kůži prasete (získané v plné tloušťce z ušního boltce) uváděny hodnoty fluxu $4,90 \pm 2,10 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ a lag time 1.1 ± 0.5 h. Autoři na povrch kůže aplikovali 10 μl 2% vodného roztoku kofeinu, difúzní plocha činila $0,95 \text{ cm}^2$. Pro zajištění homogenní distribuce donorové tekutiny na povrchu kožní membrány bývá doporučován minimální aplikační objem $25 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ (van de Sandt 2004). V souladu s tímto doporučením jsme v rámci validačního experimentu zvolili aplikační objem $44 \mu\text{l}/1,77 \text{ cm}^2$. Oproti práci Duracher a kol. tak bylo množství kofeinu aplikované na cm^2 povrchu kůže přibližně 2,5x větší. Při srovnatelné rychlosti difúze bylo u našich experimentů možno očekávat pomalejší pokles koncentrace kofeinu v donorové tekutině s vyššími hodnotami odhadu fluxu. Stejným efektem by se měla projevit i rovnoměrnější distribuce donorové tekutiny na difúzní ploše.

Duracher a kol. použili jako receptorovou tekutinu fyziologické sérum (Versol NaCl 0,9%). V našem případě byl preferován, v souladu s výše citovanou prací van de Sandta, běžně užívaný fyziologický roztok (van de Sandt 2004). Rozpustnost kofeinu ve vodě je vysoká, Duracher a kol. (Duracher 2009) udávají hodnotu 31,4 g/l. Námi nalezené koncentrace kofeinu ve vzorcích receptorové tekutiny z testovacích komůrek se pohybovaly na hladinách $\leq 25,6 \text{ mg}/\text{l}$. Za této situace nebyla rychlost difúze ovlivňována omezenou rozpustností kofeinu a přítomnost proteinů v receptorové tekutině tak nebyla nutná. Absence proteinů ve vzorku umožnila přímý nástřik receptorové tekutiny na kolonu kapalinového chromatografu (vlastní HPLC analýze nemusela předcházet deproteinace vzorku).

Hodnota dat dermální absorpce, prezentovaných různými pracovišti, může být významně ovlivněna technikou výpočtu sledovaných parametrů. Variace se mohou projevit zejména při aplikaci konečné dávky (finite dose), kdy je z křivky popisující závislost koncentrace testované látky v receptorové tekutině na čase odhadována hodnota směrnice

v inflexním bodě (maximální hodnota směrnice pro danou křivku). Z těchto důvodů byl námi použitý software vyvinut se zřetelem na objektivizaci maximálního odhadu sledovaných parametrů.

Hodnoty parametrů absorpce zjištěné ve validačním experimentu činily $6,85 \pm 2,99 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ (flux) a $2,03 \pm 1,27 \text{ h}$ (lag time) a lze je považovat za srovnatelné s daty prezentovanými v práci Duracher a kol (Duracher 2009). Lze konstatovat, že test transdermální absorpce kofeinu (provedený v rámci validačního experimentu) potvrdil spolehlivost zavedené metodiky.

Námi získaná data jsou v souladu s rozsáhlou studií provedenou van de Sandtem a kol. (van de Sandt 2004). Autoři studie se snažili získat informace o validitě metodik percutánní absorpce porovnáním intra- a interlaboratorních rozdílů mezi 10 evropskými laboratořemi. Byly testovány absorpce tří látek (kofeinu, testosteronu a benzoové kyseliny) při standardizovaných experimentálních podmínkách (aplikovaná množství, doba provádění testu, rozpouštědla, receptorová tekutina, příprava penetračních membrán, analýza). V devíti laboratořích byla používána lidská kůže z různých míst těla (hrudník, břicho, stehno), v jedné laboratoři použili kůži potkaní. Všechny vzorky kůže byly před použitím zamrazeny (většinou při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, ve dvou laboratořích při $-70 \text{ }^\circ\text{C}$) a byly použity v průběhu jednoho roku od odběru. V případě použití lidské kůže byla tato použita většinou jako plná (tloušťka od 0,7 do 1,8 mm), ve třech laboratořích byla použita kůže dermatomovaná (tloušťka 0,3–0,7 mm). Kofein byl aplikován v koncentraci 4 mg/ml směsi etanol/voda (1 : 1, v/v), aplikační objem činil $25 \mu\text{l}/\text{cm}^2$. Získané vzorky (donorové aplikanty a receptorová tekutina) byly analyzovány centrálně ve vybraných laboratořích. Výsledky testů dermální absorpce kofeinu ukazuje níže uvedená tabulka.

V diskutované práci se průměrné hodnoty fluxu pro plnou lidskou kůži, udané jednotlivými laboratořemi, pohybují v rozmezí $0,46\text{--}2,83 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Námi získaná hodnota fluxu pro 5x vyšší aplikovanou koncentraci kofeinu v donorové tekutině (týž objem donorové tekutiny/ cm^2 kůže) činí $6,85 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Přes rozdíly ve složení donorové tekutiny (voda oproti 50% etanolu) a zdroji testované plné kůže (prase/člověk) je tedy náš odhad fluxu cca 5x vyšší.

Hodnota lag time by neměla záviset na koncentraci testované látky v donorové tekutině. V diskutované práci (van de Sandt 2004) se odhady lag time pro plnou lidskou kůži pohybují v rozmezí hodnot 1,7–5,2 h. Námi nalezená hodnota (2,03 h) potom leží v uvedeném rozmezí.

Výsledky testů transdermální absorpce kofeinu provedeného v různých evropských laboratořích (van de Sandt 2004)

Laboratoř	Typ kůže	Experiment číslo	Počet vzorků	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Lag time (h)
University of Newcastle, Velká Británie	lidská (hrudník) dermatomovaná	1	6	10,40	1,9
		2	7	3,92	1,0
		3	5	1,20	0,8
		průměr		5,17±4,73	1,2±0,8
Istituto di Medicina del Lavoro, Siena, Itálie	lidská (stehno) plná	1	3	0,82	3,1
		2	3	0,54	5,3
		3	6	0,59	5,7
		4	3	1,11	6,4
		5	3	0,83	5,3
		průměr		0,78±0,23	5,2±1,2
Universita di Trieste, Itálie	lidská (břicho) plná	1	5	0,56	2,7
		2	7	0,31	3,1
		3	6	0,51	2,7
		průměr		0,46±0,13	2,8±0,2
TNO Nutrition and Food Research, Zeist, Holandsko	lidská (břicho) plná	1	7	2,58	3,5
		2	7	2,77	3,5
		3	7	1,66	4,2
		průměr		2,34±0,59	3,7±0,4
Institut National de Recherche et de Sécurité, Vandoeuvre Cedex, Francie	potkaní	1	8	7,74	1,3
		2	7	6,17	1,0
		3	7	6,56	1,3
		průměr		6,82±0,82	1,2±0,2
Imperial College London, Velká Británie	lidská (břicho) plná	1	7	1,65	3,0
		2	7	2,36	2,1
		3	7	1,39	4,5
		průměr		1,80±0,50	3,2±1,2
Health and Safety Laboratory Sheffield, Velká Británie	lidská (břicho) dermatomovaná	1	5	3,09	1,3
		2	4	1,97	1,0
		3	3	2,69	1,2
		průměr		2,58±0,57	1,2±0,7
University of Southern Denmark, Odense, Dánsko	lidská (hrudník, břicho) plná	1	7	1,44	2,0
		2	7	1,37	2,0
		3	7	0,68	2,0
		průměr		1,16±0,42	2,0±0,0
University of Erlangen- Nuremberg, Erlangen, Německo	lidská (hrudník, stehno) plná	1	7	2,56	1,1
		2	7	2,46	1,7
		3	7	3,50	2,4
		průměr		2,83±0,58	1,7±0,7
Huntingdon Life Science, Eye, Velká Británie	lidská (břicho, stehno) dermatomovaná	1	5	2,46	1,3
		2	5	2,43	2,4
		3	6	4,18	2,4
		průměr		3,02±1,00	2,0±0,6

Legenda: výsledky testů transdermální absorpce kofeinu provedeného v 10 evropských laboratořích, tučně průměr±směrodatná odchylka (podle van de Sandt 2004)

Transdermální absorpce PAU

V *první fázi experimentálních prací* jsme sledovali vliv rozpouštědla a koncentrace látky na transdermální absorpci pyrenu. Analýzy receptorové tekutiny byly prováděny v akreditovaných laboratořích Úseku forenzní a klinické toxikologie ÚKBD FN Hradec Králové metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS). S ohledem na náklady spojené s využíváním tohoto analytického systému a v neposlední řadě i s ohledem na jeho vytížení v podmínkách fakultní nemocnice, jsme odběry receptorové tekutiny omezili na intervaly 12, 24, 48 a 72 hod. V rámci úvodních (pilotních) studií byl na kůži prasete aplikován pyren v dávce 0,95 mg/g, aplikační roztok byl připravován v acetonu a na kůži bylo nanášeno 100 μ l roztoku. V této části experimentů ještě nebyla známa míra sorpce PAU na stěny plastových laboratorních nádob a to i přes přítomnost albuminu v receptorové tekutině. Ztráty analytů během stání vzorků v plastových zkumavkách za pokojové teploty byly identifikovány a minimalizovány až během vývoje HPLC metody stanovení PAU. Stejně pozorování nedávno publikovali Fries a Zarfl (Fries 2012).

Odhad parametrů absorpce (flux a lag time) byl prováděn standardním postupem (proložením experimentálních dat přímkou). Hodnota lag time pyrenu se pohybovala na hladině 15,4 h (Příloha 2), resp. 14,4 h (Příloha 3). Ve třetí fázi experimentů bylo výše uvedené dávkové schéma zopakováno. Vzorky receptorové tekutiny byly odebírány v intervalech 12, 20, 24, 28, 44, 52, 68, 72, 76 h, analyzovány kapalinovou chromatografií (HPLC) a získané hodnoty absorpce v daných časových intervalech hodnoceny programem Iteration Tool. V tomto případě byl lag time pyrenu odhadnut na 30,8 h (Tab. 18).

V úvodních studiích byly k odhadům hodnot parametrů fluxu a lag time k dispozici pouze čtyři experimentální body z odběrů v rozmezí 12–72 h. Je doporučováno (Williams 2003), aby doba experimentu činila alespoň 2,7násobek doby lag time. Tomu v případě pyrenu (při hodnocení pomocí modelu Iteration Tool) odpovídá časová dotace 83 hodiny. Zpětný rozbor výsledků tedy připouští přítomnost systémové chyby v odhadu zmíněných parametrů provedených v rámci prvotních experimentů. V případě fluxu pyrenu je rozdíl mezi odhady provedenými v úvodních experimentech a ve třetí fázi experimentů dokonce řádový.

Přes výše uvedené výhrady je možné konstatovat, že úvodní experimenty byly prováděny dle standardních metodických postupů. Skutečnost, že výsledky byly zatíženy (týmiž) systematickými chybami, nebránila jejich vzájemnému porovnání při hodnocení vlivu rozpouštědla a koncentrace látky na transdermální absorpci pyrenu. Kritický rozbor

výsledků úvodních experimentů byl podnětem ke zdokonalení jak analytického koncovky, tak matematického hodnocení dat. Validovaná analytická metoda a počítačový model Iteration Tool byly užity ve druhé a třetí fázi experimentů. Odborné články o metodě a počítačovém modelu jsou připravovány do tisku.

Podnětem k hodnocení vlivu rozpouštědla na dermální absorpci pyrenu byla skutečnost, že ve většině publikovaných článků zabývajících se absorpcí PAU, byl jako rozpouštědlo (nosné medium) běžně používán aceton (Ng 1992, Sartorelli 1998, 1999, 2001) nebo etanol (Payan 2008). Ani jedno z těchto rozpouštědel však není typické pro reálné podmínky, při kterých dochází k dermální expozici osob PAU (oleje a maziva, benzín, dehet, saze či terapeutická aplikace dehtové pasty).

Při Goeckermanově terapii lupénky, na kterou byla soustředěna řada studií naší pracovní skupiny, je defektní povrch kůže ošetřován dehtovou pastou. Běžně je při léčbě užívána 3–5% dehtová pasta (5% dehtová pasta obsahuje 0,95mg pyrenu/g pasty); (Borská 2006). Mast'ový základ „Unguentum leniens“, který je používán pro výrobu dehtové pasty, obsahuje 50 % slunečnicového oleje (MZ ČR 2009).

Z výše uvedených důvodů byl pro testování vlivu rozpouštědla na parametry dermální absorpce vybrán aceton (pro možnost porovnání našich výsledků s odbornou literaturou) a slunečnicový olej (pro přiblížení experimentů reálným expozičním podmínkám při Goeckermanově terapii).

V odborné literatuře jsme o slunečnicovém oleji (ve smyslu míry ovlivňování dermálních expozic) nenalezli žádné informace. Jak bylo výše uvedeno, jako rozpouštědlo se obvykle užívá aceton. Ve srovnání se slunečnicovým olejem představuje aceton vysoce těkavé polární rozpouštědlo (neomezeně mísitelné s vodou), které ovlivňuje (rozpouští) lipidy rohové vrstvy. Nicméně odborná literatura uvádí, že k morfologickým změnám lidské kůže dochází zhruba až po pětihodinovém působení acetonu. V tomto případě byl pozorován nárůst transepidermální ztráty vody, viditelné narušení intercelulárních vrstev a ztráta soudržnosti mezi vrstvami (Fartasch 1997). Provádí-li se experiment bez okluze (jak tomu bylo i při našich experimentech), potom se aceton z donorového roztoku aplikovaného na kůži rychle odpaří. Sartorelli a kol. (Sartorelli 1999) při tomto přístupu kontrolovali integritu lidské kůže po odpaření acetonu pomocí $^3\text{H}_2\text{O}$. Permeabilita kůže nebyla působením acetonu ovlivněna (aplikováno bylo 30 μl acetonu na 1,77 cm^2 kůže).

Dalším cílem úvodních experimentů bylo zhodnocení vlivu donorové koncentrace pyrenu na transdermální absorpci. Na povrch kůže byly nanášeny aplikační roztoky obsahující pyren v koncentracích 0,95–9,5–95 mg/g. Jako rozpouštědlo byl v tomto

případě použit pouze aceton, neboť pyren v množství odpovídajícím nejvyšší koncentrační úrovni 95 mg/g se již ve slunečnicovém oleji plně nerozpustil. Srovnání acetonu a slunečnicového oleje pro koncentrační úrovně 0,95 a 9,5 mg/g bylo provedeno v paralelní studii. Veškeré experimenty byly prováděny bez okluze. Objem nanášeného aplikačního roztoku činil vždy 100 μ l. Vzorke receptorové tekutiny byly odebírány v intervalech 12, 24, 48, a 72 h a analyzovány pomocí GC-MS.

V první studii (Příloha 3) byly získány hodnoty fluxu a lag time pro tři koncentrační úrovně pyrenu (rozpuštědlo aceton). Bylo poněkud překvapivé, že rozdíly v hodnotách fluxu nebyly významné. Rozdíl mezi nejvyšší (pro střední koncentraci) a nejnižší (pro nejvyšší koncentraci) hodnotu parametru flux byl pouze trojnásobný a statisticky nevýznamný. Nárůst koncentrace pyrenu v aplikačním roztoku byl přitom stonásobný.

Nutno ovšem doplnit, že po aplikaci roztoku obsahujícího nejvyšší koncentraci pyrenu jsme po odpaření acetonu pozorovali tvorbu krystalků na povrchu kůže. Je pravděpodobné, že k tomuto jevu dochází i při nižších koncentracích (kdy jde o okem hůře zachytitelný jev). Velikost dávky potom určuje tloušťku této vrstvy a patrně i velikost částic penetrantu „vypadlého“ z roztoku. Pokud je povrch kůže (po odpaření rozpuštědla) pokryt rovnoměrnou vrstvou tuhého penetrantu, měla by být termodynamická aktivita tuhého pyrenu ve všech komůrkách prakticky totožná. Blízké by měly být i hodnoty veličiny flux.

Na velikosti dávky tedy zřejmě závisí pouze doba, po kterou soustava zůstává v ustáleném stavu. Situace však může být složitější, jak naznačuje pozorovaná (bodová) krystalizace pyrenu z nejkonzentrovanejšího roztoku. V tomto případě nejde o rovnoměrné pokrytí povrchu kůže vrstvou tuhého penetrantu. Vztah mezi velikostí částic penetrantu (relativně vůči tloušťce membrány) a jeho schopností do této membrány difundovat blíže popisuje Romonchuk a kol. (Romonchuk 2006).

Problematikou vlivu koncentrace látky na transdermální absorpci se zabýval Zorin a kol. (Zorin 1999). Autoři testovali průchod nikotinu z vodných nebo etanolových roztoků o různé koncentraci přes lidskou dermatomovanou kůži. I oni našli nelineární závislost hodnoty flux na použité koncentraci. Nejvyšší hodnota flux (1 341,5 μ g/cm²/h) byla nalezena při aplikaci 50% vodného roztoku (w/w), zatímco při použití 100% nikotinu a 1% vodného roztoku nikotinu (w/w) byly hodnoty flux podobné (82,0 a 88,2 μ g/cm²/h). Autoři vyslovili názor, že plocha exponované kůže je pro míru absorpce důležitější než koncentrace látky v donorovém roztoku.

Ve druhé studii (Příloha 2) byly získány hodnoty fluxu a lag time pro dvě koncentrace pyrenu rozpuštěné v acetonu a slunečnicovém oleji. Hodnoty fluxu v případě acetonového rozpouštědla se pohybovaly na úrovních 0,0192 nmol/cm²/h pro koncentraci pyrenu 0,95 mg/g a 0,0150 nmol/cm²/h pro koncentraci 9,5 mg/g. V případě slunečnicového oleje se pohybovaly na úrovních 0,0088 nmol/cm²/h pro koncentraci 0,95 mg/g a 0,0119 nmol/cm²/h pro koncentraci 9,5 mg/g. Z uvedeného je zřejmé, že změnou rozpouštědla (aceton/olej) dochází k významné změně hodnoty flux (v acetonu je hodnota flux zhruba dvojnásobná). Naproti tomu desetinásobné zvýšení koncentrace se na změně hodnoty flux projevilo jen nevýznamně. Lze se domnívat, že absorpce pyrenu prasečí kůží by mohla mít (na úrovni testovaných koncentrací) limitovanou kapacitu.

Ng a kol. (Ng 1992) naproti tomu rozdíly v hodnotách flux našli (v závislosti na koncentraci donorového roztoku). Tito autoři studovali dermální absorpci značeného pyrenu in vitro. V experimentech užili dermatomovanou živou prasečí kůži, na niž aplikovali 10 µl donorového roztoku pyrenu v acetonu. Odpovídající dávky činily 33,6 nmol/cm² a 185 nmol/cm² (v našem případě 212 nmol/cm², 2 120 mol/cm² a 21 200 nmol/cm²). V intervalech 24 h prostoupilo do receptorové tekutiny 57,4 % (tj. 1 928,6 nmol; nižší dávka) a 26,9 % (tj. 4 976,5 nmol; vyšší dávka) aplikované radioaktivity. V discích (vzorcích) kůže, na něž byl aplikován pyren, bylo po experimentu nalezeno 12,5 % (tj. 420 nmol; nižší dávka) a 13,9 % (tj. 2 571,5 nmol; vyšší dávka) aplikované radioaktivity. Z uvedeného vyplývá, že přibližně 5,5násobné zvýšení koncentrace donorového roztoku vedlo zhruba ke 2,5násobnému nárůstu množství pyrenu prošlého kůží. Je ovšem nutno zdůraznit, že v našich experimentech jsme aplikovali koncentrace 212 nmol/cm², 2 120 mol/cm² a 21 200 nmol/cm², tedy koncentrace významně vyšší než Ng a kol. Lze se domnívat, že při tak vysokých koncentracích jsme se pohybovali již nad transportní kapacitou kůže.

V první studii byly získány odhady parametru lag time pro tři koncentrační úrovně pyrenu (rozpuštědlo aceton). Nalezené hodnoty lag time klesaly s rostoucí donorovou koncentrací pyrenu a dosahovaly úrovní 14,4 h (koncentrace pyrenu 0,95 mg/g), 11,9 h (koncentrace pyrenu 9,5 mg/g), resp. 5,33 h (koncentrace pyrenu 95 mg/g). Statisticky významný byl rozdíl hodnot lag time mezi první a třetí koncentrační úrovní.

V následné studii, v níž byl jako vehikulum srovnáván aceton a slunečnicový olej na dvou koncentračních úrovních, byl opět patrný trend poklesu lag time s rostoucí donorovou koncentrací pyrenu, byl-li jako rozpouštědlo užit aceton. Nalezené hodnoty lag time v tomto případě činily 15,4 h (koncentrace pyrenu 0,95 mg/g), resp. 13,2 h

(koncentrace pyrenu 9,5 mg/g). V případě použití slunečnicového oleje jako rozpouštědla byly hodnoty lag time 17,4 h (koncentrace pyrenu 0,95 mg/g) a 18,1 h (koncentrace pyrenu 9,5 mg/g).

Z teoretických úvah vyplývá, že hodnota lag time závisí pouze na difuzním koeficientu penetrantu v daném prostředí a délce difuzní dráhy, která je obvykle aproximována tloušťkou membrány. Hodnota lag time by tudíž neměla významně záviset na koncentraci penetrantu v donorovém roztoku. Pro úplnost dodejme, že experimenty byly prováděny s mrtvou kůží, uplatňovat se proto mohla pouze pasivní difúze.

Pokud epidermis hodnotíme z pohledu obsahu vody, lze ji rozdělit na dvě vrstvy – vrchní rohovou vrstvu (stratum corneum, SC) a „živou“ epidermis (viable epidermis, VE). Rohová vrstva obsahuje „mrtvé“ silně odvodněné epidermální buňky (korneocyty), které spočívají v kontinuální lipidové matrici. Rohová vrstva je s ohledem na nízký obsah vody chápána jako lipofilní fáze. Vrstva VE obsahuje mnohem více vody než SC a je tudíž považována za fázi primárně hydrofilní. Hlavním proteinem epidermis je potom keratin. V rohové vrstvě představují keratinová vlákna přes 90 % váhy proteinů a tvoří základ její buněčné hmoty. Polyaromáty se na keratin mohou reverzibilně vázat, jejich afinita ke keratinu vzrůstá s rostoucí lipofilitou molekuly (Hansen 2011). Ve škáře je navíc přítomen albumin, který též váže PAU (Bert 1986, Dancik 2013). Rezervoárový efekt kůže pro pyren (jeho reverzibilní interakce s kůží) doložili ve svých experimentech prováděných na potkanech in vivo i in vitro Payan a kol. (Payan 2008).

Experiment srovnávající absorpci PAU v závislosti na rozpouštědle publikovali Sartorelli a kol. (Sartorelli 1999). Autoři popsali významné rozdíly v dermální absorpci pyrenu mezi acetonovým a olejovým nosným médiem. V jejich experimentu byla, stejně jako v naší práci, použita statická difúzní komůrka s absorpční plochou 1,77 cm². Penetrační membránu tvořila plná kůže z břicha kočkodana zeleného (*Cercopithecus aetiops*). Expoziční dávka (koncentrace pyrenu v donorovém vzorku) byla 9,3 nmol/cm². Použití acetonu vedlo při všech odběrech k významně vyšší absorpci pyrenu v hodnotách 0,25 nmol/cm²/24h; 0,45 nmol/cm²/48h a 2 nmol/cm²/72h. U oleje byly nalezeny hodnoty zhruba desetkrát nižší: 0,025 nmol/cm²/24h; 0,05 nmol/cm²/48h a 0,1 nmol/cm²/72h.

V souladu s výsledky studie Sartorelli a kol. byly i v našich experimentech ve všech případech nalezeny vyšší hladiny absorpce pyrenu u acetonového media (expoziční dávky: aceton: 209 nmol/cm² a 2 095 nmol/cm²; olej: 235 nmol/cm² a 2 347 nmol/cm²). Statisticky významný rozdíl mezi acetonem a olejem byl však nalezen, na rozdíl od Sartorelliho práce, pouze u hodnot zjištěných po 12 a 24 hodinách u nižší expoziční dávky

($p < 0,05$) a po 12 hodinách u expoziční dávky vyšší ($p < 0,01$; viz Příloha 2). Ačkoliv v práci Sartorelliho byla použita nižší koncentrace donorové fáze, jsou výsledky absorpce v jeho i v našem experimentu řádově srovnatelné. Domníváme se, že je to způsobeno odlišnou penetrační membránou. Sartorelli používal kůži z břicha opice kočkodana zeleného. Tato kůže obsahuje velké množství vlasových folikulů, které mohou penetraci látky výrazně zvyšovat.

Zatímco ve studii Sartorelliho byla nalezena zhruba desetinásobně vyšší úroveň absorpce pyrenu při použití acetonu jako rozpouštědla (v porovnání s olejem), v naší studii se vyšší absorpce pyrenu z acetonu pohybovala na úrovni dvou až pětinasobků (u nižší koncentrace pyrenu) resp. na úrovni srovnatelné s olejovým rozpouštědlem (u vyšší koncentrace pyrenu). Domníváme se, že jednou z příčin rozdílných úrovní absorpcí pyrenu může být složení použitých olejů. Zatímco Sartorelli a kol. ve svém experimentu použili syntetický olej („commercial synthetic lubricator for engines“), v našem experimentu byl použit olej slunečnicový (kompatibilita s Goeckermanovou terapií). Důležitou součástí slunečnicového oleje je kyselina olejová, která tvoří 14–40 % tohoto oleje (MZ ČR 2009). Tato mononenasyčená vyšší mastná kyselina je známa jako akcelerátor transdermální penetrace (např. Singh 2010). Literatura uvádí, že ve vyšších koncentracích olejová kyselina poškozuje vnitřní strukturu lipidových dvojvrstev. To může vést k defektům permeability a urychlit permeaci látek přes SC (Trommer 2006).

Jiné vysvětlení může spočívat v ovlivňování penetračních vlastností kůže použitým rozpouštědlem, jak vyplývá z recentní práce Gajjara a kol. (Gajjar 2014). Autoři studovali dermální absorpci těkavých rozpouštědel s cílem verifikovat matematický model. Značený aceton v množství 12,5–25–37,5–50 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ aplikovali na dermatomovanou lidskou kůži. Své experimenty prováděli bez okluze v digestoři (při průtoku vzduchu kolem statických komůrek 0,92 m/s) a v receptorové tekutině stanovovali značený aceton. Maximální flux acetonu registrovali v intervalu 15 min od aplikace, po 2 hod od aplikace již byl flux acetonu zanedbatelný.

Z uvedených výsledků vyplývá, že po aplikaci pyrenu rozpuštěného v acetonu rozpouštědlo penetruje do kůže, kde po dobu jeho průchodu zvyšuje s velkou pravděpodobností rozpustnost pyrenu ve vodné fázi živé epidermis (i ve škáře). Aceton s sebou potom unáší relativně vysokou koncentraci penetrantu, který je vychytáván vazebnými centry proteinů. Lze předpokládat, že úsek transportní dráhy, na němž se vazebná centra proteinů takto nasatí, se prodlužuje s rostoucí výchozí koncentrací pyrenu ve vehikulu. Molekuly pyrenu, které tímto úsekem následně procházejí, již nejsou brzděny

interakcemi s vazebnými centry proteinů. Důsledkem potom je jeho rychlejší průnik kůží a zkrácení jeho lag time, které je tím výraznější, čím vyšší koncentrace pyrenu byla na kůži aplikována

Slunečnicový olej, který je rozpouštědlem viskózním, relativně nepolárním a s vodou nemísitelným, analogický efekt nevyvolal.

Ve druhé fázi experimentálních prací jsme sledovali vliv rozpouštědla na transdermální absorpci naftalenu. Volba testovací látky byla determinována praktickými důvody. Naftalen je široce používaná látka, má ze studované skupiny PAU nejmenší molekulovou hmotnost a kůži proniká nejsnáze. K porovnání požadované časové závislosti jeho absorpce kůží postačoval experiment trvající 24 h.

Při hodnocení vlivu rozpouštědla na dermální absorpci naftalenu byl jako donorový roztok použit roztok naftalenu v acetonu v koncentraci 5,4 mg/g roztoku a roztok naftalenu ve slunečnicovém oleji v téže koncentraci. Na kůži bylo aplikováno vždy 50 μl donorového roztoku, což představuje dávku naftalenu 0,95 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ (roztok v acetonu), resp. 1,07 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ (roztok ve slunečnicovém oleji). Výsledky ukazují Tab. 12 a 13 (kap. 6.2.2). V případě acetonového rozpouštědla byla průměrná hodnota flux 0,468 \pm 0,152 nmol/cm²/h, při použití olejového roztoku byl zhruba poloviční (0,212 \pm 0,155 nmol/cm²/h), rozdíl dosáhl statisticky významné úrovně ($p = 0,010$). Průměrná hodnota lag time byla po aplikaci roztoku naftalenu v acetonu 0,75 \pm 0,33 h, po použití olejového roztoku byla skoro třikrát delší (2,07 \pm 1,50 h). Nicméně tento rozdíl nebyl statisticky významný ($p = 0,059$).

I v případě naftalenu, podobně jako u pyrenu, je úroveň absorpce testované látky výrazně menší a pomalejší při použití slunečnicového olejového jako donorového rozpouštědla. Tento závěr posiluje předpoklad, že za rozdílné hodnoty fluxu a lag time pyrenu i naftalenu pozorované po záměně donorového rozpouštědla je zodpovědný efekt vehikula. Naše výsledky lze podpořit i literárními údaji.

Sartorelli a kol. porovnávali aceton a syntetický minerální olej jako donorová rozpouštědla pro směs třinácti polyaromatických uhlovodíků (Sartorelli 1999). In vitro experimenty prováděli s plnou kůží kočkodana zeleného instalovanou ve statické difúzní komůrce s difúzní plochou 1,77 cm², na niž aplikovali 30 μl donorového roztoku (v acetonu a v oleji). Experimenty prováděli bez okluze, receptorovou tekutinou byl fyziologický roztok s přídatkem 4 % BSA a gentamicinem. Autoři pozorovali obdobný trend, jaký jsme pozorovali i my v našich experimentech - statisticky významný pokles

hodnoty fluxu a nárůst hodnoty lag time po náhradě acetonu jako donorového rozpouštědla syntetickým olejem. Trend pozorovali pro naftalen, fluoren, acenaften, antracen, fenantren a pyren.

V případě naftalenu byla Sartorellim a kol. aplikována dávka 160 nmol/cm^2 v acetonu nebo v minerálním oleji. Pro aceton byla nalezena hodnota flux $1,011 \text{ nmol/cm}^2/\text{h}$ a lag time 1,18 h a pro syntetický olej hodnota flux $0,274 \text{ nmol/cm}^2/\text{h}$ a lag time 4,86 h. V případě naší studie byla dávka naftalenu (v acetonu) aplikovaná na kůži v koncentraci šestkrát vyšší, nicméně hodnota flux byla dvakrát nižší, než hodnota nalezená ve studii Sartorelli a kol. (Sartorelli 1999).

Komplikovanost prezentované problematiky dokládá i následující studie. Frasch a kol. (Frasch 2007) studovali dermální absorpci naftalenu z tuhé substance. K experimentům užívali dermatomovanou prasečí dorsální kůži nainstalovanou ve statické Franzově komůrce, receptorovou tekutinou byl Hanksův roztok. Experimenty byly prováděny ve dvou nezávislých laboratořích a byly zjištěny následující hodnoty flux a lag time: flux 238 a $58,8 \text{ nmol/cm}^2/\text{h}$; lag time 0,82 a 2,02 h. Oproti našim výsledkům jsou uvedené hodnoty zhruba o dva řády vyšší.

Je zřejmé, že srovnání experimentálních dat s literárními údaji je velmi komplikované a zatížené mnoha nejistotami. Hlavní nejistoty se týkají použití různých živočišných druhů (vzorky kůže), různých modelů studia dermální absorpce, různých podmínek aplikace penetrantu a variací ve způsobu hodnocení dat.

Ve třetí fázi experimentálních prací jsme porovnávali vliv formy aplikace (individuální/směsná) na parametry transdermální absorpce. Hodnoceno bylo celkem osm zástupců PAU (antracen, benz[a]antracen, benzo[a]pyren, fenantren, fluoranten, fluoren, naftalen, pyren), které byly na donorovou část kůže prasečího ucha, zamontované ve statické difúzní komůrce, aplikovány v acetonovém roztoku buď samostatně, nebo ve směsi obsahující čtyři zástupce PAU najednou. Použité koncentrace byly v obou případech aplikace stejné.

Z výsledků je patrné, že rychlost, jakou jednotlivé polyaromáty penetrovaly kůží, se značně lišila. Zatímco polyaromát s nejmenší molekulovou hmotností (naftalen) vykázal lag time 0,86 h, u polyaromátu s největší molekulovou hmotností (benzo[a]pyrenu) již hodnota tohoto parametru činila 51 h. Obecně lze říci, v souladu s literárními údaji, že hodnota lag time PAU narůstala s jeho rostoucí molekulovou hmotností (Sartorelli 1999). Při posuzování výsledků je nutno brát v úvahu, že hodnota lag time není ovlivňována jen

tloušťkou membrány a difuzním koeficientem polyaromátu v daném prostředí, ale i jeho vazbou na proteiny kůže (difundovat může pouze volná frakce polyaromáty). Difuzivita makromolekul albuminu přítomných v dermis je mnohem menší, než difuzivita malých molekul polyaromátů (Dancik 2013).

Koncentrace polyaromátů v donorových roztocích byly voleny tak, aby odpovídaly jejich přibližnému obsahu ve farmaceutické pastě (používané při Goeckermanově terapii): 5,4 mg/g (naftalen), 2,8 mg/g (fenantren), 1,4 mg/g (fluoranten), 0,95 mg/g (fluoren, pyren), 0,7 mg/g (antracen), 0,45 mg/g (benz[a]antracen a benzo[a]pyren). Koncentrační úrovně, na nichž byly jednotlivé polyaromáty testovány, se tedy lišily o více než jeden řád. Lze proto předpokládat, že hodnoty flux, registrované při individuální aplikaci PAU, významně reflektovaly i rozdíly ve zvolených koncentračních úrovních. Hodnoty flux, nalezené při individuálních aplikacích polyaromátů, klesaly (podle očekávání) s klesajícím zastoupením PAU v donorové tekutině.

Pokud byly polyaromáty na kůži aplikovány ve směsi, byla hodnota flux vždy nižší než při individuálním podání, přičemž rozdíly mezi oběma způsoby podání narůstaly s rostoucí molekulovou hmotností testovaného polyaromátu (viz Obr. 41 a Příloha 4). U polyaromátů s nejmenší molekulovou hmotností (naftalen, fluoren) byl rozdíl mezi hodnotami fluxu vypočtenými z obou způsobů podání $\leq 17\%$. Přítomnost dalších polyaromátů v donorové tekutině tedy měla na jejich prostup kůží vliv minimální. Obdobné zákonitosti platily i pro hodnotu lag time. V případě antracenu, fenantrenu a fluorantenu představovala hodnota flux u směsi polyaromátů 40–50 % hodnoty registrované při samostatném podání. V případě pyrenu to bylo 25 % hodnoty a v případě benz[a]antracenu již jen 8,6 % hodnoty registrované při samostatném podání. Byl-li ve směsi podán benzo[a]pyren, pak jeho hladiny v receptorové tekutině zůstaly pod mezí stanovitelnosti metody (2,4 nmol/l) po celou dobu trvání pokusu (72 hodin.). Hodnoty flux a lag time pro směsné podání benzo[a]pyrenu tedy nebylo možno stanovit.

Hodnota lag time byla směsnou aplikací ovlivněna méně než hodnota flux. U většiny polyaromátů se hodnoty parametru lag time, vypočtené z individuální a směsné aplikace, nelišily o více než $\pm 14\%$. Výraznější nárůst hodnoty lag time při směsné aplikaci byl zjištěn pouze v případě fluorantenu (o 32 %) a především antracenu (o 101 %).

Dosažené výsledky naznačují, že aplikace PAU ve směsi může mít především negativní dopad na hodnotu flux (tj. na množství PAU, které kůží projde za jednotku času). Tento efekt byl obecně tím výraznější, čím větší byla molekulární hmotnost polyaromátu. Zdá se pravděpodobné, že ke kompetici mezi polyaromáty dochází v místě aplikace. Další

možností je omezená kapacita albuminu v receptorové tekutině. Výsledky provedené studie rozpustnosti PAU tuto alternativu však nepodporují (Tab. 5, 6, 7).

Aby se jednoznačně vyloučil možný vliv kumulace penetrantů v receptorové tekutině na jejich prostup kůží, bylo by žádoucí měnit při každém odběru vzorku celý objem receptorové tekutiny. Dále by bylo vhodné provádět experimenty na samotné epidermis (aby se vyloučil vliv vazby na dermální proteiny), nebo po ukončení experimentu na plné kůži provádět hodnocení „total recovery“ (stanovit množství penetrantu zbylé na povrchu kůže, ve stratum corneum, v „živé“ epidermis a ve zbývající dermis).

Námi zjištěné poznatky ukazují na komplikovanost a nejistotu odhadů zdravotního rizika v případě expozice směsím PAU. Jsou-li známy relevantní informace o transdermální kinetice PAU (zatím jen velmi limitovaná data), byly tyto většinou získány v experimentech hodnotících podání jednotlivých PAU, což je pro naprostou většinu expozic PAU ze životního a pracovního prostředí netypické (Ng 1992, Moody 1995, Frasch 2007, Payan 2008).

Vliv způsobu podání (samostatně nebo ve směsi) zásadně ovlivňuje míru absorpce PAU a významně zvyšuje nejistoty při odhadu souvisejících zdravotních rizik. Nicméně pokud by byly známy validní informace o maximální dermální absorpci jednotlivých PAU (individuální aplikace maximálně koncentrovaného donorového roztoku v „infinite dose“), bylo by možné předpokládat, že absorpce v případě směsi nebude vyšší. To by pro danou směs PAU umožnilo stanovení maximálních rizik (účinků) dermální expozice (dle konzervativního scénáře).

Požadované informace o dermálních charakteristikách PAU v současné době k dispozici nejsou. Flynnova databáze (viz kap. 2.3) obsahuje informace o 94 sloučeninách. Zahrnuje celkem 97 koeficientů permeability získaných v in vitro experimentech na lidské kůži (meta-analýza 15 literárních zdrojů); (Flynn 1990). Novější Kirchnerova databáze (vychází z Flynnovy databáze) obsahuje informace o 114 látkách (Kirchner 1997). Polyaromáty se však bohužel mezi těmito látkami nenacházejí. Z výše uvedených důvodů se výzkumná činnost našeho pracoviště bude i nadále orientovat na stanovení základních charakteristik vybraných PAU v závislosti na proměnlivých podmínkách expozice.

8. Závěr

Předkládaná disertační práce má název „Kinetika vybraných látek při dermální expozici (polycyklické aromatické uhlovodíky)“ a k jejím stěžejním cílům patřilo (1) zavedení a validace vhodné metodiky testování transdermální absorpce látek in vitro a (2) použití této metodiky k získání nových poznatků o vlivu koncentrace, typu rozpouštědla a formy aplikace na míru transdermální absorpce vybraných zástupců PAU.

Pro naplnění výše uvedených cílů byla vybrána metodika používající vertikální statickou difúzní komůrku dle Franze. Jako absorpční membrána v testovací soupravě sloužila plná kůže zadní plochy ušního boltce prasete domácího. Obsah stanovovaných látek ve vzorcích receptorové tekutiny (tvořené Hanksovým roztokem s BSA a gentamicinem) byl analyzován pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) a pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC), pro niž byla vyvinuta a validována nová metodika. Ze získaných dat byly počítány hodnoty základních charakteristik transdermální absorpce PAU (flux a lag time). Pro výpočty byl vytvořen nový počítačový model, který stanovení charakteristik transdermální absorpce významně zpřesňuje (publikace je připravována).

Disertační práce přináší nové poznatky v oblasti základních charakteristik transdermální absorpce PAU in vitro. Tyto poznatky lze využít při odhadu úrovně zdravotních rizik dermální expozice PAU.

Bylo prokázáno, že i relativně nízké donorové koncentrace PAU mohou naplňovat kapacitu transportních cest v kůži. Z pohledu faktorů ovlivňujících celkovou míru transdermálního přenosu PAU má velikost exponované plochy kůže větší vliv než koncentrace PAU v aplikovaném roztoku. PAU s malou molekulovou hmotností byly absorbovány rychleji a ve větším množství než PAU s vyšší molekulovou hmotností.

Míra dermální absorpce PAU významně závisela na charakteru rozpouštědla. Použití olejového rozpouštědla mělo za následek (v porovnání s použitím standardního rozpouštědla acetonu) nižší hodnotu míry dermální absorpce. Reálné expozice PAU v životním a pracovním prostředí bývají spojovány s tukovými (olejovými) bázemi (prostředím). Je pravděpodobné, že v případech, kdy jsou pro účely odhadů zdravotních rizik dermální expozice PAU používány „acetonové“ údaje, má odhadované riziko nadhodnocený (konzervativní) charakter.

Rovněž forma aplikace látky významně ovlivňovala míru dermální absorpce PAU (individuální/směsná aplikace). Ve všech experimentech byla nižší míra dermální absorpce

nalezena při aplikaci směsi PAU (v porovnání s aplikací individuální). S ohledem na skutečnost, že PAU se v životním a pracovním prostředí vyskytují téměř výhradně ve směsích, bude mít úroveň rizika dermální expozice směsi PAU, odhadovaná na základě dat získaných při individuální aplikaci, nadhodnocený (konzervativní) charakter.

Výsledky dílčích experimentů byly publikovány v odborných časopisech a na tuzemských a mezinárodních vědeckých konferencích. Souborný článek, shrnující všechny výsledky této studie, je v současné době připravován.

Experimenty s dermální expozicí PAU budou na Ústavu hygieny a preventivního lékařství Lékařské fakulty UK v Hradci Králové pokračovat. Chceme se zaměřit na hodnocení celkového profilu testovaných látek („total recovery“) a na využití těchto výsledků k výpočtu maximálních absorpcí vybraných zástupců PAU. Údaje by mohly přispět k dalšímu zpřesňování základních charakteristik transdermální absorpce pro účely hodnocení (odhadů) zdravotních rizik. Na tomto místě považuji za nutné upozornit, že stávající databáze informací o dermálních absorpcích látek (Flynn 1990, Kirchner 1997) neobsahuje informace o dermální kinetice (absorpci) PAU.

Souběžně plánujeme testování absorpce PAU přes samotnou epidermální membránu. Tento postup by měl významně redukovat nejistoty spojené s průchodem PAU přes hydrofilní dermis.

9. Použitá literatura

- ACKERMANN, K. The Phenion full-thickness skin model for percutaneous absorption testing. *Skin Pharmacol Physiol*, 2010, vol. 23, no. 2, s. 105-112.
- AGARWAL, R. Metabolism of benzo[a]pyrene by human melanocytes in culture. *Carcinogenesis*, 1991, vol. 12, no. 10, s. 1963-1966.
- AHLSTROM, L. A. The effects of freezing skin on transdermal drug penetration kinetics. *J Vet Pharmacol Ther*, 2007, vol. 30, no. 5, s. 456-463.
- AKOMEAH, F. Effect of heat on the percutaneous absorption and skin retention of three model penetrants. *Eur J Pharm Sci*, 2004, vol. 21, no. 2-3, s. 337-345.
- AKOMEAH, F. K. Variability in human skin permeability in vitro: Comparing penetrants with different physicochemical properties. *J Pharm Sci*, 2007, vol. 96, no. 4, s. 824-834.
- ALLAN, L. L. CYP1A1 in polycyclic aromatic hydrocarbon-induced B lymphocyte growth suppression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, vol. 342, no. 1, s. 227-235.
- ANDO, H. Y. Skin as an active metabolizing barrier. I. theoretical analysis of topical bioavailability. *J Pharm Sci*, 1977, vol. 66, s. 1525-1528.
- ANGERER, J. Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a graphite-electrode producing plant: biological monitoring of 1-hydroxypyrene and monohydroxylated metabolites of phenanthrene. *Int Arch Occup Environ Health*, 1997, vol. 69, no. 5, s. 223-231.
- ANDERSON K. E. Dietary intake of heterocyclic amines and benzo[a]pyrene: associations with pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, vol. 14, no. 9, s. 2261-2265
- ARMSTRONG, B. Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. *Environ Health Perspect*, 2004, vol. 112, no. 9, s. 970-978.
- ATRUX-TALLAU, N. Qualitative and quantitative comparison of heat separated epidermis and dermatomed skin in percutaneous absorption studies. *Arch Dermatol Res*, 2007, vol. 299, no. 10, s. 507-11.
- ATSDR. *Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons* [online]. c1995 [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.pdf>>.
- ATSDR. *ATSDR 2013 Priority List of Hazardous Substances* [online]. c2013 [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <<http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>>.
- BAERT, B. A new discriminative criterion for the development of Franz diffusion tests for transdermal pharmaceuticals. *J Pharm Pharm Sci*, 2010, vol. 13, no. 2, s. 218-230.
- BAIRD, W. M. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagen*, 2005, vol. 45, no. 1-2, s. 106-114.
- BARBERO, A. M. Transcellular route of diffusion through stratum corneum: results from finite element models. *J Pharm Sci*, 2006, vol. 95, no. 10, s. 2186-2194.
- BARBERO, A. M. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. *Toxicol In Vitro*, 2009, vol. 23, no. 1, s. 1-13.
- BARRY, B. W. Reflections on transdermal drug delivery. *Pharm Sci Technol Today*, 1999, vol. 2, no. 2, s. 41-43.
- BARTEK, M. J. Skin permeability in vivo: comparison in rat, rabbit, pig and man. *J Invest Dermatol*, 1972, vol. 58, no. 3, s. 114-123.
- BATHEJA, P. Effects of growth conditions on the barrier properties of a human skin equivalent. *Pharm Res*, 2009, vol. 26, no. 7, s. 1689-1700.
- BENSON, H. A.: Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques. *Curr Drug Deliv*, 2005, vol. 2, no. 1, s. 23-33.
- BENTSEN, R. K. The effect of dust-protective respirator mask and the relevance of work category on urinary 1-hydroxypyrene concentration in PAH exposed electrode paste plant workers. *Ann Occup Hyg*, 1998, vol. 42, no. 2, s. 135-144.
- BERGER, C. L. Langerhans cells: mediators of immunity and tolerance. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, vol. 38, no. 10, s. 1632-1636.
- BERT, J. L. Concentration of plasma albumin in its accessible space in postmortem human dermis. *Microvasc Res*, 1986, vol. 32, no. 2, s. 211-223.
- BLANK, I. H. Cutaneous barriers. *J Invest Dermatol*, 1965, vol. 45, s. 249-256.

- BLANK, I. H. Transport across the stratum corneum. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1969, vol. 3, s. 23-29.
- BINKOVÁ, B. DNA-adducts and atherosclerosis: a study of accidental and sudden death males in the Czech Republic. *Mutat Res*, 2002, vol. 501, no. 1-2, s. 115-128.
- BOFFETTA, P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control*, 1997, vol. 8, no. 3, s. 444-472.
- BONTE, F. Existence of a lipid gradient in the upper stratum corneum and its possible biological significance. *Arch Dermatol Res*, 1997, vol. 289, no. 2, s. 78-82.
- BORSKÁ, L. Cytogenetic and immunological changes after dermal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and UV radiation. *Physiol Res*, 2006, vol. 55, no. 3, s. 317-323.
- BORSKÁ, L. Plasma levels of p53 protein and chromosomal aberrations in patients with psoriasis treated with the Goeckerman regiment. *Clin Exp Dermatol*, 2009, vol. 34, no. 8, s. e881-883.
- BORSKÁ, L. Genotoxic and apoptotic effects of Goeckerman therapy for psoriasis. *Int J Dermatol*, 2010a, vol. 46, no. 3, s. 289-294.
- BORSKÁ, L. Urinary mutagenicity and genotoxic risk in children with psoriasis after therapeutic exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and ultraviolet radiation. *Mutat Res*, 2010b, vol. 696, no. 2, s. 144-147.
- BOS, J. D. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol*, 2000, vol. 9, no. 3, s. 165-169.
- BOURY-JAMOT, M. Expression and function of aquaporins in human skin: Is aquaporin-3 just a glycerol transporter? *Biochim Biophys Acta*, 2006, vol. 1758, no. 8, s. 1034-1042.
- BOURY-JAMOT, M. Skin aquaporins: function in hydration, wound healing, and skin epidermis homeostasis. *Handb Exp Pharmacol*, 2009, vol. 190, s. 205-217.
- BOUWSTRA, J. New aspects of the skin barrier organization. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 2001, vol. 14, no. Suppl 1, s. 52-62.
- BOUWSTRA, J. A. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog Lipid Res*, 2003a, vol. 42, no. 1, s. 1-36.
- BOUWSTRA, J. A. Water distribution and related morphology in human stratum corneum at different hydration levels. *J Invest Dermatol*, 2003b, vol. 120, no. 5, s. 750-758.
- BOUWSTRA, J. A. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim Biophys Acta*, 2006, vol. 1758, no. 12, s. 2080-2095.
- BOWMAN, K. F. Development of surgical techniques for preparation of in vitro-isolated perfused porcine skin flaps for percutaneous absorption studies. *Am J Vet Res*, 1991, vol. 52, no. 1, s. 75-82.
- BRINKMANN, J. Metabolically competent human skin models: activation and genotoxicity of benzo[a]pyrene. *Toxicol Sci*, 2013, vol. 131, no. 2, s. 351-359.
- BROHEM, C. A. Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2010, vol. 24, no. 1, s. 35-50.
- BRONAUGH, R. L.: Methods for in vitro percutaneous absorption studies IV: The flow-through diffusion cell. *J Pharm Sci*, 1985, vol. 74, no. 1, s. 64-67.
- BURKE, K. E. Synergistic damage by UVA radiation and pollutants. *Toxicol Ind Health*, 2009, vol. 25, no. 4-5, s. 219-224.
- BURSTYN, I. Mortality from obstructive lung diseases and exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons among asphalt workers. *Am J Epidemiol*, 2003, vol. 158, no. 5, s. 468-478.
- BURSTYN, I. Polycyclic aromatic hydrocarbons and fatal ischemic heart disease. *Epidemiology*, 2005, vol. 16, no. 6, s. 744-750.
- BURSTYN, I. Bladder cancer incidence and exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons among asphalt pavers. *Occup Environ Med*, 2007, vol. 64, no. 8, s. 520-526
- CAMPBELL, N.A. *Biology*. 5th ed., 1999. New York, NY; Addison-Wesley Longmann. ISBN 0-8053-3044-5.
- CASTANO-VINYALS, G. Biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental air pollution. *Occup Environ Med*, 2004, vol. 61, no. 4, s. e12.
- CAUSSIN, J. Lipid organization in human and porcine stratum corneum differs widely, while lipid mixtures with porcine ceramides model human stratum corneum lipid organization very closely. *Biochim Biophys Acta*, 2008, vol. 1778, no. 6, s. 1472-1482.
- CHEN, S. C. Health risk assessment on human exposed to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons pollution sources. *Sci Total Environ*, 2006, vol. 366, no. 1, s. 112-123.

- CHEN, S. Y. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in liver tissues of hepatocellular carcinoma patients and controls. *Int J Cancer*, 2002, vol. 99, no. 1, s. 14-21.
- CHILCOTT, R. P. Transepidermal water loss does not correlate with skin barrier function in vitro. *J Invest Dermatol*, 2002, vol. 118, no. 5, s. 71-75.
- CHILCOTT, R. P. Inter- and intralaboratory variation of in vitro diffusion cell measurements: an international multicenter study using quasi-standardized methods and materials. *J Pharm Sci*, 2005, vol. 94, no. 3, s. 632-638.
- CHOI, H. Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of intrauterine growth restriction. *Environ Health Perspect*, 2008, vol. 116, no. 5, s. 658-665.
- CHUONG, C. M. What is the 'true' function of skin? *Exp Dermatol*, 2002, vol. 11, no. 2, s. 159-87.
- CILURZO, F. Newborn pig skin as model membrane in in vitro drug permeation studies: a technical note. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2007, vol. 8, no. 4, s. E94.
- CLOWES, H. M. Skin absorption: flow-through or static diffusion cell. *Toxic In Vitro*, 1994, vol. 8, no. 4, s. 827-830.
- COLIPA. *Guidelines for Percutaneous Absorption/Penetration* [online]. c1997 [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: < <https://www.cosmeticseurope.eu/publications-cosmetics-europe-association/guidelines.html?view=item&id=26> >.
- COLLIER, S. W. Maintenance of skin viability during in vitro percutaneous absorption/metabolism studies. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1989, vol. 99, no. 3, s. 522-533.
- CONNAY, A. H. Dose-dependent differences in the profile of mutations induced by carcinogenic (R,S,S,R) bay- and fjord-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv Exp Med Biol*, 2001, vol. 500, s. 697-707.
- COSTA, C. Exposure of human skin to benzo[a]pyrene: role of CYP1A1 and aryl hydrocarbon receptor in oxidative stress generation. *Toxikology*, 2010, vol. 271, no. 3, s. 83-86.
- COSTIGAN, S. C. Estimations of lipid bilayer geometry in fluid lamellar phases. *Biochim Biophys Acta*, 2000, vol. 1468, no. 1-2, s. 41-54.
- COURTER, L. A. The influence of diesel exhaust on polycyclic aromatic hydrocarbon-induced DNA damage, gene expression, and tumor initiation in Sencar mice in vivo. *Cancer Lett*, 2008, vol. 265, no. 1, s. 135-347.
- CRONIN M. T. Investigation of the mechanism of flux across human skin in vitro by quantitative structure-permeability relationships. *Eur J Pharm Sci*, 1999, vol. 7, no. 4, s. 325-330.
- CROSS, S. E. Bovine-serum-albumin-containing receptor phase better predicts transdermal absorption parameters for lipophilic compounds. *J Invest Dermatol*, 2003, vol. 120, no. 4, s. 589-591.
- CROSS, S. E. Use of in vitro human skin membranes to model and predict the effect of changing blood flow on the flux and retention of topically applied solutes. *J Pharm Sci*, 2008, vol. 97, no. 8, s. 3442-3450.
- DANIELS, R. Galenics of dermal products--vehicles, properties and drug release. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2007, vol. 5, no. 5, s. 367-383.
- DANCIK, Y. Design and performance of spreadsheet-based model for estimating bioavailability of chemicals from dermal exposure. *Adv Drug Deliv Res*, 2013, vol. 65, no. 2, s. 221- 236.
- DAO, H. Jr. Gender differences in skin: a review of the literature. *Gend Med*, 2007, vol. 4, no. 4, s. 308-28.
- DAVIES, D. J. Multi-species assessment of electrical resistance as a skin integrity marker for in vitro percutaneous absorption studies. *Toxicol In Vitro*, 2004, vol. 18, no. 3, s. 351-358.
- DAVIES, R. E. M. Penetration of dermatological vehicles. *Pharm J*, 1950, s. 74-76.
- DEGIM, T. Prediction of skin penetration using artificial neural network (ANN) modeling. *J Pharm Sci*, 2003, vol. 92, no. 3, s. 656-664.
- DeBONO, R. The survival of human skin stored by refrigeration at 4 degrees C in McCoy's 5A medium: does oxygenation of the medium improve storage time? *Plast Reconstr Surg*, 1998, vol. 102, no. 1, s. 78-83.
- De JAGER, M. A. Novel in Vitro Percutaneous Penetration Model: Evaluation of Barrier Properties with P-Aminobenzoic Acid and Two of Its Derivatives. *Pharm Res*, 2006, vol. 23, no. 5, s. 951-960.
- De MAAGD, P. G.-J. Physicochemical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons: Aqueous solubilities, n-octanol/water partition coefficients, and Henry's law constants. *Environ Toxicol Chem*, 1998, vol. 17, no. 2, s. 251-257.
- DEJMEK, J. The impact of polycyclic aromatic hydrocarbons and fine particles on pregnancy outcome. *Environ Health Perspect*, 2000, vol. 108, no. 12, s. 1159-1164.

- DICK, I. P. Pig ear skin as an in-vitro model for human skin permeability. *J Pharm Pharmacol*, 1992, vol. 44, no. 8, s. 640-645.
- DIEMBECK, W. Test guidelines for in vitro assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. *Food Chem Toxicol*, 1999, vol. 37, no. 2-3, s. 191-205.
- DING, J. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on vascular endothelial growth factor induction through phosphatidylinositol 3-kinase/AP-1-dependent, HIF-1 α -independent pathway. *J Biol Chem*, 2006, vol. 281, no. 14, s. 9093-9100.
- DRAKE, D. R. Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface. *J Lipid Res*, 2008, vol. 49, no. 1, s. 4-11.
- DURACHER, L. The influence of alcohol, propylene glycol and 1,2-pentanediol on the permeability of hydrophilic model drug through excised pig skin. *Int J Pharm*, 2009, vol. 374, no. 1-2, s. 39-45.
- EFSA. *Scientific opinion - Guidance on Dermal Absorption* [online]. c2012 [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2665.pdf>>.
- ELIAS, P. M. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol*, 1983, vol. 80, Suppl. 1, s. 44s-9s.
- ELIAS, P. M. Structure and function of the stratum corneum extracellular matrix. *J Invest Dermatol*, 2012, vol. 132, no 9, s. 2131-3.
- ELKEEB, R. Correlation of transepidermal water loss with skin barrier properties in vitro: comparison of three evaporimeters. *Skin Res Technol*, 2010, vol. 16, no. 1, s. 9-15.
- ELMAHJoubi, E. Transepidermal water loss for probing full-thickness skin barrier function: correlation with tritiated water flux, sensitivity to punctures and diverse surfactant exposures. *Toxicol In Vitro*, 2009, vol. 23, no. 7, s. 1429-1435.
- EU. *Directive 2000/39/EC – indicative occupational exposure limit values* [online]. c1998-2013 [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <<https://osha.europa.eu/cs/legislation/directives/exposure-to-chemical-agents-and-chemical-safety/osh-directives/directive-2000-39-ec-indicative-occupational-exposure-limit-values>>.
- EU. *Directive 2003/15/EC* [online]. c2003 [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:066:0026:0035:en:PDF>>.
- EU. *Guidance Document on Dermal Absorption (Sanco/222/2000 rev. 7)* [online]. c2004 [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/guidance/wrkd20_rev_en.pdf>.
- EU. *Council Regulation (EC) No 440/2008* [online]. c2008 [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:142:0001:0739:en:PDF>>.
- EU-SCCNFP. *Opinion - Basic Criteria for the In Vitro Assessment of Dermal Absorption of Cosmetic Ingredients (EU-SCCNFP/0750/03)* [online]. c2003 [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <http://ec.europa.eu/health/archive/ph_risk/committees/sccp/documents/out231_en.pdf>.
- EU-SCCP. *Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients (EU-SCCP/0970/06)* [online]. c2006 [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_s_03.pdf>.
- EU-SCCS. *Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients* [online]. c2010 [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_002.pdf>.
- EU SCF. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons – Occurrence in foods, dietary exposure and health effects* [online]. c2002 [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out154_en.pdf>.
- EUROCHEM. *Správa chemických látek* [online]. c2002-2013 [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <<http://www.eurochem.cz/index.php?LA=CS>>.
- FACY, V. Langerhans cells integrated into human reconstructed epidermis respond to known sensitizers and ultraviolet exposure. *J Invest Dermatol*, 2004, vol. 122, no. 2, s. 552-3.
- FARTASCH, M. Ultrastructure of the epidermal barrier after irritation. *Microsc Res Tech*, 1997, vol. 37, no. 3, s. 193-199.
- FASANO, W. J. Rapid integrity assessment of rat and human epidermal membranes for in vitro dermal regulatory testing: correlation of electrical resistance with tritiated water permeability. *Toxicol In Vitro*, 2002, vol. 16, no. 6, s. 731-740.
- FEINGOLD, K. R. Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J Lipid Res*, 2007, vol. 48, no. 12, s. 2531-2546.

- FEINGOLD, K. R. Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochem Biophys Acta*, 2014, vol. 1841, no. 3, s. 280-294.
- FIALA, Z. Polycyclic aromatic hydrocarbons I - Environmental contamination and environmental exposure. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 1999, Suppl. 42, no. 2, s. 77-89.
- FIALA, Z. Polycyclic aromatic hydrocarbons II - Toxic effects. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2000, Suppl. 43, no. 1, s. 37-61.
- FIALA, Z. Environmental exposure of small children to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int Arch Occup Environ Health*, 2001, vol. 74, no. 6, s. 411-420.
- FIALA, Z. Genotoxic effect of Goeckerman regimen of psoriasis. *Arch Dermatol Res*, 2006, vol. 298, no. 5, s. 243-251.
- FILIPSSON, M. Exposure to contaminated sediments during recreational activities at a public bathing place. *J Hazard Mater*, 2009, vol. 171, no. 1-2, s. 200-207.
- FISCHER C. L. The roles of cutaneous lipids in host defense. *Biochim Biophys Acta*, 2014, vol. 1841, s. 319-322.
- FLYNN, G. L. *Physicochemical determinants of skin absorption*, in: Gerrity T. R., Henry C. J. (Eds): Principles of Route-to-Route Extrapolation for Risk Assessment, Elsevier, New York, 1990, s. 93-127.
- FLUHR, J. W. Transepidermal water loss reflects permeability barrier status: validation in human and rodent in vivo and ex vivo models. *Exp Dermatol*, 2006, vol. 15, no. 7, s. 483-492.
- FORSLIND, B. A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta Derm Venereol*, 1994, vol. 74, no. 1, s. 1-6.
- FORSLIND, B. A structural model for the human skin barrier. *Progr Colloid Polym Sci*, 1998, vol. 108, s. 40-46.
- FÖRSTER, M. Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery. *Eur J Dermatol*, 2009, vol. 19, no. 4, s. 309-323.
- FRANZ, T. J. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol*, 1975, vol. 64, s. 190-195.
- FRASCH, H. F. Skin penetration and lag times of neat and aqueous diethyl phthalate, 1,2-dichloroethane and naphthalene. *Cutan Ocul Toxicol* 2007, vol. 26, no. 2, s. 147-160.
- FRASCH, H. F. A paired comparison between human skin and hairless guinea pig skin in vitro permeability and lag time measurements for 6 industrial chemicals. *Cutan Ocul Toxicol*, 2009, vol. 28, no. 3, s. 107-113.
- FRASCH, H. F. Analysis of finite dose dermal absorption data: implications for dermal exposure assessment. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 2014, vol. 24, no. 1, s. 65-73.
- FRIES, E. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to low and high density polyethylene (PE). *Environ Sci Pollut Res Int*, 2012, vol. 19, no. 4, s. 1296-1304.
- FRUM, Y. Towards a correlation between drug properties and in vitro transdermal flux variability. *Int J Pharm*, 2007a, vol. 336, no. 1, s. 140-147.
- FRUM, Y. Evidence that drug flux across synthetic membranes is described by normally distributed permeability coefficients. *Eur J Pharm Biopharm*, 2007b, vol. 67, no. 2, s. 434-439.
- GAJJAR, R. M. Absorption of ethanol, acetone, benzene and 1,2-dichloroethane through human skin in vitro: a test of diffusion model predictions. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, vol. 281, no. 1, s. 109-117.
- GALLAGHER, R. P. Chemical exposures, medical history, and risk of squamous and basal cell carcinoma of the skin. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1996, vol. 5, no. 6, s. 419-424.
- GALLENGA, P. E. Polycyclic aromatic hydrocarbons in clear and cataractous human lenses. *Doc Ophthalmol*, 1994, vol. 85, no. 3, s. 243-245.
- GARIDEL, P. The microstructure of the stratum corneum lipid barrier: mid-infrared spectroscopic studies of hydrated ceramide:palmitic acid:cholesterol model systems. *Biophys Chem*, 2010, vol. 150, no. 1-3, s. 144-156.
- GASPARI, L. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human sperm as a marker of DNA damage and infertility. *Mutat Res*, 2003, vol. 535, no. 2, s. 155-160.
- GE, L. The viability change of pigskin in vitro. *Burns*, 2010, vol. 36, no. 4, s. 533-8.
- GODIN, B. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, vol. 59, s. 1152-1161.
- GRAINGER, J. Reference range of polycyclic aromatic hydrocarbons in the US population by measurement of urinary monohydroxy metabolites. *Environ Res*, 2006, vol. 100, s. 394-423.

- GUO, Y. Sources, distribution, and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Environ Health*, 2011, vol. 73, no. 9, s. 22-25.
- HABERLAND, A. The impact of skin viability on drug metabolism and permeation - BSA toxicity on primary keratinocytes. *Toxicol In Vitro*, 2006, vol. 20, no. 3, s. 347-354.
- HADGRAFT, J. Skin deep. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, vol. 58, no. 2, s. 291-299.
- HADGRAFT, J. W. A method for studying percutaneous absorption in the rat. *J Pharm Pharmacol*, 1954, vol. 6, s. 944-948.
- HADGRAFT, J. W. Percutaneous absorption. *J Pharm Pharmacol*, 1956, vol. 8, s. 625-634.
- HANSEN, A. M. Urinary 1-hydroxypyrene (1-HP) in environmental and occupational studies--a review. *Int J Hyg Environ Health*, 2008, vol. 211, no. 5-6, s. 471-503.
- HANSEN, S. An extended database of keratin binding. *J Pharm Sci*, 2011, vol. 100, no. 5, s. 1712-1726.
- HANSEN, S. Modeling the human skin barrier - towards a better understanding of dermal absorption. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, vol. 65, no. 2, s. 149-151.
- HARDING, C. R. The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatologic Therapy*, 2004, vol. 17, s. 6-15.
- HARRISON, S. M. Effects of freezing on human skin permeability. *J Pharm Pharmacol*, 1984, vol. 36, no. 4, s. 261-262.
- HATCH, M. C. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in spontaneously aborted fetal tissue. *Carcinogenesis*, 1990, vol. 11, no. 9, s. 1673-1675.
- HENNING, A. Influence of human skin specimens consisting of different skin layers on the result of in vitro permeation experiments. *Skin Pharmacol Physiol*, 2008, vol. 21, no. 2, s. 81-88.
- HERKENNE, C. Pig ear skin ex vivo as a model for in vivo dermatopharmacokinetic studies in man. *Pharm Res*, 2006, vol. 23, no. 8, s. 1850-1856.
- HIGUCHI, T. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from cream and ointments. *J Soc Cosmet Chem*, 1960, vol. 11, s. 85-97.
- HOATH, S. B. The organization of human epidermis: functional epidermal units and phi proportionality. *J Invest Dermatol*, 2003, vol. 121, no. 6, s. 1440-1446.
- HOLOUBEK, I. *Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) v prostředí*. Praha: Český ekologický ústav a Odbor ekologických rizik monitoringu MŽP ČR, 1. vydání, 1996. 136 s. ISBN 80-85087-44-8.
- IARC. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Human - Volume 92 - Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures* [online]. c2010 [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <[http:// monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/ vol92/mono92.pdf](http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/mono92.pdf)>.
- IKEDA, K. Partition property of pyrene onto synthetic membrane vesicles and the effects of natural organic matters. *KSCE Journal of Civil Engineering*, 2008, vol. 12, no. 2, s. 91-97.
- ISHIKAWA, J. Variations in the ceramide profile in different seasons and regions of the body contribute to stratum corneum functions. *Arch Dermatol Res*, 2013, vol. 305, no. 2, s. 151-162.
- ITO, K. Involvement of organic anion transport system in transdermal absorption of flurbiprofen. *J Control Release*, 2007, vol. 124, no. 1-2, s. 60-68.
- ITO, K. P-glycoprotein (Abcb1) is involved in absorptive drug transport in skin. *J Control Release*, 2008, vol. 131, no. 3, s. 198-204.
- IWAI, I. The human skin barrier is organized as stacked bilayers of fully extended ceramides with cholesterol molecules associated with the ceramide sphingoid moiety. *J Invest Dermatol*, 2012, vol. 132, no. 9, s. 2215-2225.
- JACOBI, O. About the mechanism of moisture regulation in the horny layer of the skin. *Proc Scient Sect Toilet Goods Ass*, 1959, vol. 31, s. 22-26.
- JACOBI, U. Comparison of four different in vitro systems to study the reservoir capacity of the stratum corneum. *J Control Release*, 2005a, vol. 103, no. 1, s. 61-71.
- JACOBI, U. Gender-related differences in the physiology of the stratum corneum. *Dermatology*, 2005b, vol. 221, no. 4, s. 312-317.
- JACOBI, U. Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Skin Res Technol*, 2007, vol. 13, no. 1, s. 19-24.
- JACOBS, J. J. Skin irritants and contact sensitizers induce Langerhans cell migration and maturation at irritant concentration. *Exp Dermatol*, 2006, vol. 15, no. 6, s. 432-440.

- JANSSENS, M. Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J Lipid Res*, 2012, vol. 53, no. 12, s. 2755-2766.
- JONGENEELLEN, F. J. Ambient and biological monitoring of cokeoven workers: determinants of the internal dose of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Br J Ind Med*, 1990, vol. 47, no. 7, s. 454-461.
- JONGENEELLEN, F. J. Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ann Occup Hyg*, 2001, vol. 45, no. 1, s. 3-13.
- JUNQUEIRA, L. C. *Základy histologie*. Jinočany: Nakladatelství a vydavatelství H&H, 1. vydání v ČR, 1997. ISBN 80-85787-37-7.
- KÁBRT, J. *Lexicon medicum*. Praha: Avicenum, 1. vydání, 1988. 736 s.
- KANIKKANNAN, N. Percutaneous absorption and skin irritation of JP-8 (jet fuel). *Toxicology*, 2001, vol. 161, no. 1-2, s. 1-11.
- KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*, 2002, vol. 12, no. 4, s. 390-399.
- KANĎÁROVÁ, H. Assessment of the human epidermis model SkinEthic RHE for in vitro skin corrosion testing of chemicals according to new OECD TG 431. *Toxicol In Vitro*, 2006, vol. 20, no. 5, s. 547-59.
- KARAKAYA, A. Effects of occupational polycyclic aromatic hydrocarbon exposure on T-lymphocyte functions and natural killer cell activity in asphalt and coke oven workers. *Hum Exp Toxicol*, 2004, vol. 23, no. 7, s. 317-322.
- KATZ, M. Corticoid, vehicle and skin interaction in percutaneous absorption. *J Soc Cosmet Chem*, 1972, vol. 23, s. 565-590.
- KEZIC, S. Absorption of chemicals through compromised skin. *Int Arch Occup Environ Health*, 2009, vol. 82, no. 6, s. 677-688.
- KIRCHNER, L. A. The prediction of skin permeability by using physico-chemical data. *ATLA*, 1997, vol. 25, s. 359-370.
- KOMMADDI, R. P. An alternatively spliced cytochrome P4501A1 in human brain fails to bioactivate polycyclic aromatic hydrocarbons to DNA-reactive metabolites. *J Neurochem*, 2007, vol. 102, no. 3, s. 867-877.
- KONRADSDOTTIR, F. Fish skin as a model membrane: structure and characteristics. *J Pharm Pharmacol*, 2009, vol. 61, no. 1, s. 121-124.
- KUBASIEWICZ, M. Case-referent study on skin cancer and its relation to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. II. Study results. *Pol J Occup Med Environ Health*, 1991, vol. 4, no. 2, s. 141-147.
- KUMAR, M. Protective effects of green and white tea against benzo[a]pyrene induced oxidative stress and DNA damage in murine model. *Nutr Cancer*, 2012, vol. 64, no. 2, s. 300-306.
- KUSHNER, J. Evaluation of the porosity, the tortuosity, and the hindrance factor for the transdermal delivery of hydrophilic permeants in the context of the aqueous pore pathway hypothesis using dual-radiolabeled permeability experiments. *J Pharm Sci*, 2007, vol. 96, no. 12, s. 3263-3282.
- LADEMANN, J. Hair follicles - a long-term reservoir for drug delivery. *Skin Pharmacol Physiol*, 2006, vol. 19, no. 4, s. 232-236.
- LADEMANN, J. Human percutaneous absorption of a direct hair dye comparing in vitro and in vivo results: implications for safety assessment and animal testing. *Food Chem Toxicol*, 2008, vol. 46, no. 6, s. 2214-2223.
- LAFONTAINE, M. Excretion of urinary 1-hydroxypyrene in relation to the penetration route of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polycyclic Aromatic Compd*, 2002, vol. 22, s. 579-588.
- LANGERHANS, P. Über die nerven der menschlichen haut. *Virchows Arch*, 1868, vol. 44, s. 325-337.
- LARSEN, R. H. Dermal penetration of fentanyl: inter- and intraindividual variations. *Pharmacol Toxicol*, 2003, vol. 93, no. 5, s. 244-248.
- LEHMAN, P. A. Percutaneous absorption of retinoids: influence of vehicle, light exposure, and dose. *J Invest Dermatol*, 1988, vol. 91, no. 1, s. 56-61.
- LEHMAN, P. A. Percutaneous absorption in man: in vitro-in vivo correlation. *Skin Pharmacol Physiol*, 2011, vol. 24, no. 4, s. 224-230.
- LERDA D. *Polycyclic aromatic hydrocarbons Factsheet, EC-JRC 66955-2011* [online]. c2011, [cit. 2014-06-10]. Dostupné z: < https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/Factsheet%20PAH_0.pdf?search>.

- LEVEQUE, N. Comparison of Franz cells and microdialysis for assessing salicylic acid penetration through human skin. *Int J Pharm*, 2004, vol. 269, no. 2, s. 323-328.
- LI, D. Molecular epidemiology of pancreatic cancer. *Int J Gastrointest Cancer*, 2003, vol. 33, no. 1, s. 3-14.
- LI, D. In vitro benzo[a]pyrene diol epoxide-induced dna adducts and risk of squamous cell carcinoma of head and neck. *Cancer Res*, 2007, vol. 67, no. 12, s. 5628-5634.
- LI, Q. Characterization of the transdermal transport of flurbiprofen and indomethacin. *J Control Release*, 2006, vol. 110, no. 3, s. 542-556.
- LI, Z. Concentration and profile of 22 urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in the US population. *Environ Res*, 2008, vol. 107, no. 3, s. 320-331.
- LOMAS, A. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol*, 2012, vol. 166, no. 5, s. 1069-1080.
- LORETO, C. Bitumen products alter bax, bcl-2 and cytokeratin expression: an in vivo study of chronically exposed road pavers. *J Cutan Pathol*, 2007, vol. 34, no. 9, s. 699-704.
- LOTTE, C. Permeation and skin absorption: reproducibility of various industrial reconstructed human skin models. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 2002, vol. 15, Suppl 1, s. 18-30.
- LU, G.-N. Estimation of water solubility of polycyclic aromatic hydrocarbons using quantum chemical descriptors and partial least squares. *QSAR Comb Sci*, 2008, vol. 27, no. 5, s. 618-626.
- MACHADO, M. The relationship between transepidermal water loss and skin permeability. *Int J Pharm*, 2010, vol. 384, no. 1-2, s. 73-77.
- MADISON, K. C. Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol*, 2003, vol. 121, no. 2, s. 231-241.
- MAERTENS, R. M. Mutagenic and carcinogenic hazards of settled house dust. I: Polycyclic aromatic hydrocarbon content and excess lifetime cancer risk from preschool exposure. *Environ Sci Technol*, 2008, vol. 42, no. 5, s. 1747-1753.
- MAGNUSSON, B. M. Molecular size as the main determinant of solute maximum flux across the skin. *J Invest Dermatol*, 2004, vol. 112, no. 4, s. 993-999.
- MANCHESTER, D. K. Determinants of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human placenta. *Cancer Res*, 1992, vol. 52, no. 6, s. 1499-1503.
- MASTRANGELO, G. Exposure to diesel exhaust enhances total IgE in non-atopic dockers. *Int Arch Occup Environ Health*, 2003a, vol. 76, no. 1, s. 63-68.
- MASTRANGELO, G. Polyaromatic hydrocarbons administered in humans by dermal route increase total IgE. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2003b, vol. 16, no. 2, s. 145-150.
- MASUKAWA, Y. Comprehensive quantification of ceramide species in human stratum corneum. *J Lipid Res*, 2009, vol. 50, no. 8, s. 1708-1719.
- MARCZYNSKI, B. Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage by industry: a nationwide study in Germany. *Arch Toxicol*, 2009, vol. 83, no. 10, s. 947-957.
- MARKS, R. The stratum corneum barrier: the final frontier. *J Nutr*, 2004, vol. 134, 8 Suppl, s. 2017S-2021S.
- McCLEAN, M. D. Inhalation and dermal exposure among asphalt paving workers. *Ann Occup Hyg*, 2004, vol. 48, no. 8, s. 663-671.
- MEIDAN, V. M. Inter- and intra-individual variability in human skin barrier function: a large scale retrospective study. *Toxicol In Vitro*, 2008, vol. 22, no. 4, s. 1062-1069.
- MESE, G. Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*, 2007, vol. 127, no. 11, s. 2516-2524.
- MICHAELS, A. S. Drug permeation through human skin: theory and in vitro experimental measurement. *Am Inst Chem Eng J*, 1975, vol. 21, s. 985-996.
- MILLER, R. L. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolite levels and pediatric allergy and asthma in an inner-city cohort. *Pediatr Allergy Immunol*, 2010, vol. 21, no. 2 Pt 1, s. 260-267.
- MITRAGOTRI, S. Modeling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways. *J Control Release*, 2003, vol. 86, no. 1, s. 69-92.
- MOLLERUP, S. Sex differences in risk of lung cancer: Expression of genes in the PAH bioactivation pathway in relation to smoking and bulky DNA adducts. *Int J Cancer*, 2006, vol. 119, no. 4, s. 741-744.

- MONTEIRO, P. AhR- and c-maf-dependent induction of beta7-integrin expression in human macrophages in response to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, vol. 358, no. 2, s. 442-448.
- MOODY, R. P. In vivo and in vitro dermal absorption of benzo[a]pyrene in rat, guinea pig, human and tissue-cultured skin. *J Dermatol Sci*, 1995, vol. 9, no. 1, s. 48-58.
- MOODY, R. P. Skin decontamination: Importance of the wash-in effect. *Food Chem Toxicol*, 2006, vol. 44, no. 11, s. 1783-8.
- MOSS, G. P. Quantitative structure-permeability relationships (QSPRs) for percutaneous absorption. *Toxicol In Vitro*, 2002, vol. 16, no. 3, s. 299-317.
- MOTTA, S. Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim Biophys Acta*, 1993, vol. 1182, no. 2, s. 147-151.
- MURRAY, G. I. Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res*, 1997, vol. 57, no. 14, s. 3026-3031.
- MUSTAPHA, R. B. Influence of drug concentration on the diffusion parameters of caffeine. *Indian J Pharmacol*, 2011, vol. 43, no. 2, s. 157-162.
- MZ ČR. *Český lékopis 2009*. Praha: Grada, 2009. 3968 s., CD-ROM. ISBN 978-80-247-2994-7.
- MŽP ČR. *Statistická ročenka životního prostředí České republiky 2010* [online]. c2011 [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <[http://www.cenia.cz/web/www/web-pub2.nsf/\\$pid/CENMJG45 KYBJ/\\$FILE/final_pdf_10.pdf](http://www.cenia.cz/web/www/web-pub2.nsf/$pid/CENMJG45%20KYBJ/$FILE/final_pdf_10.pdf)>.
- MŽP ČR. *Statistická ročenka životního prostředí České republiky 2014* [online]. c2014 [cit. 2015-06-04]. Dostupné z: <<http://www1.cenia.cz/www/sites/default/files/Ro%C4%8Denka%20%C5%BDP%20%C4%8CR%202014.pdf>>.
- NAIR, S. UVR exposure sensitizes keratinocytes to DNA adduct formation. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*, 2009, vol. 2, no. 10, s. 895-902.
- NANGIA, A. In vitro measurement of transepidermal water loss: a rapid alternative to tritiated water permeation for assessing skin barrier functions. *Int J Pharm*, 1998, vol. 170, s. 33-40.
- NEMES, Z. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med*, 1999, vol. 31, no. 1, s. 5-19.
- NETZLAFF, F. The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, vol. 60, no. 2, s. 167-178.
- NETZLAFF, F. TEWL measurements as a routine method for evaluating the integrity of epidermis sheets in static Franz type diffusion cells in vitro. Limitations shown by transport data testing. *Eur J Pharm Biopharm*, 2006, vol. 63, no. 1, s. 44-50.
- NETZLAFF, F. Permeability of the reconstructed human epidermis model EpiSkin in comparison to various human skin preparations. *Eur J Pharm Biopharm*, 2007, vol. 66, no. 1, s. 127-134.
- NG, K. M. Percutaneous absorption and metabolism of pyrene, benzo[a]pyrene, and di(2-ethylhexyl) phthalate: comparison of in vitro and in vivo results in the hairless guinea pig. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1992, vol. 115, no. 2, s. 216-223.
- NICOLI, S. Characterization of rabbit ear skin as a skin model for in vitro transdermal permeation experiments: histology, lipid composition and permeability. *Skin Pharmacol Physiol*, 2008, vol. 21, no. 4, s. 218-226.
- NIEDORF, F. The automated, accurate and reproducible determination of steady-state permeation parameters from percutaneous permeation data. *Altern Lab Anim*, 2008, vol. 36, no. 2, s. 201-213.
- NIELSEN, J. B. Defense against dermal exposures is only skin deep: significantly increased penetration through slightly damaged skin. *Arch Dermatol Res*, 2007, vol. 299, no. 9, s. 423-431.
- NIELSEN, J. B. Efficacy of skin wash on dermal absorption: an in vitro study on four model compounds of varying solubility. *Int Arch Occup Environ Health*, 2010, vol. 83, no. 6, s. 683-690.
- NIELSEN, J. B. Storage conditions of skin affect tissue structure and subsequent in vitro percutaneous penetration. *Skin Pharmacol Physiol*, 2011, vol. 24, no. 2, s. 93-102.
- NISHIFUJI, K. The stratum corneum: the rampart of the mammalian body. *Vet Dermatol*, 2013, vol. 24, no. 1, s. 60-72.
- NOCK, N. L. Associations between smoking, polymorphisms in polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) metabolism and conjugation genes and PAH-DNA adducts in prostate tumors differ by race. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007, vol. 16, no. 6, s. 1236-1245.

- NORLEN, L. Skin barrier structure and function: the single gel phase model. *J Invest Dermatol*, 2001, vol. 117, no. 4, s. 830-6.
- NOTMAN, R. Simulations of skin barrier function: free energies of hydrophobic and hydrophilic transmembrane pores in ceramide bilayers. *Biophys J*, 2008, vol. 95, no. 10, s. 4763-4771.
- NOTMAN, R. Breaching the skin barrier--insights from molecular simulation of model membranes. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, vol. 65, no. 2, s. 237-250.
- ODLAND, G.F. The lamellar granular of epidermis. *Curr Prac Dermatol*, 1981, vol. 9, s. 29-49.
- OECD. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals - Test No. 431: In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test* [online]. c2002 [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-431-in-vitro-skin-corrosion-human-skin-model-test_9789264071148-en>.
- OECD. *Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 28* [online]. c2004a [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2004\)2&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2004)2&doclanguage=en)>.
- OECD. *OECD Guideline for Testing of Chemicals - Guideline 427 : Skin Absorption: In Vivo Method* [online]. c2004b [cit.2014-06-04]. Dostupné z: < http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-427-skin-absorption-in-vivo-method_9789264071063-en >.
- OECD. *OECD Guideline for Testing of Chemicals - Guideline 428 : Skin Absorption: In Vitro Method* [online]. c2004c [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: < http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-428-skin-absorption-in-vitro-method_9789264071087-en >.
- OECD. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals - Test No. 430: In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)* [online]. c2004d [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: < http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-430-in-vitro-skin-corrosion-transcutaneous-electrical-resistance-test-ter_9789264071124-en >.
- OECD. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals - Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method* [online]. c2004e [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-117-partition-coefficient-n-octanol-water-hplc-method_9789264069824-en>.
- OECD. *OECD Guideline for the Testing of Chemicals –Test No 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method* [online]. c2010 [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-439-in-vitro-skin-irritation_9789264090958-en>.
- OECD. *Guidance Notes on Dermal Absorption – Series on Testing and Assessment No 156* [online]. c2011 [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/48532204.pdf>>.
- OECD. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals - Test No. 430: In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)* [online]. c2013a [cit. 2014-06-10]. Dostupné z: < http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-430-in-vitro-skin-corrosion-transcutaneous-electrical-resistance-test-method-ter_9789264203808-en >.
- OECD. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals – Test No 431: In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Method* [online]. c2013b [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: < http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-431-in-vitro-skin-corrosion-reconstructed-human-epidermis-rhe-test-method_9789264203822-en>.
- OESCH, F. Drug-metabolizing enzymes in the skin of man, rat, and pig. *Drug Metab Rev*, 2007, vol. 39, no. 4, s. 659-698.
- OGISO, T. Transfollicular drug delivery: penetration of drugs through human scalp skin and comparison of penetration between scalp and abdominal skins in vitro. *J Drug Target*, 2002, vol. 10, no. 5, s. 369-78.
- OTBERG, N. Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. *J Invest Dermatol*, 2004, vol. 122, no. 1, s. 14-19.
- PAYAN, J. P. In vivo and in vitro percutaneous absorption of [(14)C]pyrene in Sprague Dawley male rats: skin reservoir effect and consequence on urinary 1-OH pyrene excretion. *Arch Toxicol*, 2008, vol. 82, s. 739-747.
- PENN, A. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC Working Paper 7/1/1. Mutational events in the etiology of arteriosclerotic plaques. *Mutat Res*, 1990, vol. 239, no. 3, s. 149-162.

- PERERA, F. P. Recent developments in molecular epidemiology: A study of the effects of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons on birth outcomes in Poland. *Am J Epidemiol*, 1998, vol. 147, no. 3, s. 309-314.
- PESCH, B. Dose-response modeling of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with biomarkers of exposure and effect. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007, vol. 16, no. 9, s. 1863-1873.
- PETROZZI, J.W. Updating the Goeckerman regimen for psoriasis. *Br J Dermatol*, 1978, vol. 98, no. 4, s. 437-444.
- PINKERTON, K. E. Influence of air pollution on respiratory health during perinatal development. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006, vol. 33, no. 3, s. 269-272.
- PODECHARD, N. Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo[a]pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. *Toxicol Lett*, 2008, vol. 177, no. 2, s. 130-7.
- POLAKOVIČOVÁ, S. Merkel cells--review on developmental, functional and clinical aspects. *Bratisl Lek Listy*, 2011, vol. 112, no. 2, s. 80-87.
- PONEC, M. Lack of desquamation - the Achilles heel of the reconstructed epidermis. *Int J Cosmet Sci*, 2002a, vol. 24, no. 5, s. 263-272.
- PONEC, M. Skin constructs for replacement of skin tissues for in vitro testing. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002b, vol. 54, Suppl 1, s. S19-30.
- POTT, P. Cancer Scroti. *Chirurgical Observation*, London, 1775, s. 63-68.
- POTTS, R. O. Predicting skin permeability. *Pharm Res*, 1992, vol. 9, no. 5, s. 663-669.
- PRAUSNITZ, M. R. Transdermal drug delivery. *Nat Biotechnol* 2008, vol. 26, no. 11, s. 1261-8.
- PROKSCH, E. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*, 2008, vol. 17, no. 2, s. 1063-1072.
- RAMOS, K. S. Bioactivation of polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens within the vascular wall: implications for human atherogenesis. *Drug Metab Rev*, 2005, vol. 37, no. 4, s. 595-610.
- RANEY, S. G. The effect of bilayer and hexagonal H(II) phase lipid films on transepidermal water loss. *Exp Dermatol*, 2006, vol. 15, no. 7, s. 493-500.
- RAWLINGS, A. V. Stratum corneum moisturization at the molecular level: an update in relation to the dry skin cycle. *J Invest Dermatol*, 2005, vol. 124, no. 6, s. 1099-1110.
- RAWLINGS, A. V. Ethnic skin types: are there differences in skin structure and function? *Int J Cosmet Sci*, 2006, vol. 28, s. 79-93.
- REGENSBURGER, J. Tattoo inks contain polycyclic aromatic hydrocarbons that additionally generate deleterious singlet oxygen. *Exp Dermatol*, 2010, vol. 19, no. 8, s. e275-281.
- REIN, H. Experimental studies on electroosmosis in surviving human skin. *Z Biol*, 1924, vol. 81, s. 125-140.
- RISSMANN, R. Skin barrier disruption by acetone: observations in a hairless mouse skin model. *Arch Dermatol Res*, 2009, vol. 301, no. 8, s. 609-13.
- RITCHIE, G. D. A review of the neurotoxicity risk of selected hydrocarbon fuels. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2001, vol. 4, no. 3, s. 223-312.
- RIVIERE, J. E. Determination of the effective dermal penetration barrier pH of porcine skin. *J Vet Pharmacol Ther*, 2009, vol. 32, no. 4, s. 407-410.
- ROEMER, E. SKH-1 mouse skin painting: a short-term assay to evaluate the tumorigenic activity of cigarette smoke condensate. *Toxicol Lett*, 2010, vol. 192, no. 2, s. 155-161.
- ROMONCHUK, W. J. Permeation of 4-cyanophenol and methyl paraben from powder and saturated solution through silicone rubber membranes and human skin. *J Pharm Sci*, 2006, vol. 95, no. 11, s. 2526-2533.
- ROMUNDSTAD, P. Cancer incidence and cause specific mortality among workers in two Norwegian aluminum reduction plants. *Am J Ind Med*, 2000, vol. 37, no. 2, s. 175-183.
- ROOS, P. H. Cytochrome P450 interactions in human cancers: new aspects considering CYP1B1. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2005, vol. 1, no. 2, s. 187-202.
- ROSA, M. J. Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, environmental tobacco smoke and asthma. *Respir Med*, 2011, vol. 105, no. 6, s. 869-876.
- ROTHMAN, S. The principles of percutaneous absorption. *J Lab Clin Med*, 1943, vol. 28, s. 1305-1321.
- RUBIO, L. Barrier function of intact and impaired skin: percutaneous penetration of caffeine and salicylic acid. *Int J Dermatol*, 2011, vol. 50, no. 7, s. 881-889.
- RYBICKI, B. A. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct formation in prostate carcinogenesis. *Cancer Lett*, 2006, vol. 239, no. 2, s. 157-167.

- SARPOTDAR, P. P. Effect of polyethylene glycol 400 on the penetration of drugs through human cadaver skin in vitro. *J Pharm Sci*, 1986, vol. 75, no. 1, s. 26-28.
- SARTORELLI, P. Prediction of percutaneous absorption from physicochemical data: a model based on data of in vitro experiments. *Ann Occup Hyg*, 1998, vol. 42, no. 4, s. 267-276.
- SARTORELLI, P. Dermal exposure assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons: in vitro percutaneous penetration from lubricating oil. *Int Arch Occup Environ Health*, 1999, vol. 72, no. 8, s. 528-532.
- SARTORELLI, P. Dermal exposure assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons: in vitro percutaneous penetration from coal dust. *Toxicol Ind Health*, 2001, vol. 17, no. 1, s. 17-21.
- SATO, K. Species differences in percutaneous absorption of nicorandil. *J Pharm Sci*, 1991, vol. 80, no. 2, s. 104-107.
- SCHMOOK, F. P. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int J Pharm*, 2001, vol. 215, no. 1-2, s. 51-56.
- SCHNETZ, E. Microdialysis for the evaluation of penetration through the human skin barrier - a promising tool for future research? *Eur J Pharm Sci*, 2001, vol. 12, no. 3, s. 165-174.
- SCOTT, R. C. The influence of skin structure on permeability: an intersite and interspecies comparison with hydrophilic penetrants. *J Invest Dermatol*, 1991, vol. 96, no. 6, s. 921-925.
- SEKKAT, N. Biophysical study of porcine ear skin in vitro and its comparison to human skin in vivo. *J Pharm Sci*, 2002, vol. 91, no. 11, s. 2376-2381.
- SEKKAT, N. Development of an in vitro model for premature neonatal skin: biophysical characterization using transepidermal water loss. *J Pharm Sci*, 2004, vol. 93, no. 12, s. 2936-2940.
- SELEVAN, S. G. Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution. *Environ Health Perspect*, 2000, vol. 108, no. 9, s. 887-894.
- SELZER, D. Finite and infinite dosing: difficulties in measurements, evaluations and predictions. *Adv Drug Deliv Rev* 2013, vol. 65, no. 2, s. 278-294.
- SERDAR, B. Biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and DNA damage: a cross-sectional pilot study among roofers in South Florida. *BMJ Open*, 2012, vol. 2, no. 4, s. e001318.
- SHIMADA, T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2006a, vol. 21, no. 4, s. 257-276.
- SHIMADA, T. Inhibition of human cytochrome P450 1A1-, 1A2-, and 1B1-mediated activation of procarcinogens to genotoxic metabolites by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem Res Toxicol*, 2006b, vol. 19, no. 2, s. 288-294.
- SHIMADA, T. Different mechanisms for inhibition of human cytochromes P450 1A1, 1A2 and 1B1 by polycyclic aromatic inhibitors. *Chem Res Toxicol*, 2007, vol. 20, no. 3, s. 489-496.
- SIDDENS, L. K. Polycyclic aromatic hydrocarbons as skin carcinogens: comparison of benzo[a]pyrene, dibenzo[def,p]chrysene and three environmental mixtures in the FVB/N mouse. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, vol. 264, no. 3, s. 377-386.
- SIDHU, G. S. Merkel cells, normal and neoplastic: an update. *Ultrastruct Pathol*, 2005, vol. 29, no. 3-4, s. 287-294.
- SIEWERT, M. FIP guidelines for dissolution of solid oral products. *Pharm Ind*, 1997, vol. 59, s. 760-766.
- SIMONSEN, L. Development of an in vitro skin permeation model simulating atopic dermatitis skin for the evaluation of dermatological products. *Skin Pharmacol Physiol*, 2007, vol. 20, no. 5, s. 230-236.
- SINGH, I. Percutaneous penetration enhancement in transdermal drug delivery. *Asian J Pharm*, 2010, vol. 4, s. 92-101.
- SINGH, S. Percutaneous absorption, biophysical, and macroscopic barrier properties of porcine skin exposed to major component of JP-8 jet fuel. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2003, vol. 14, s. 77-85.
- SINHA, R. Dietary benzo[a]pyrene intake and risk of colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, vol. 14, no. 8, s. 2030-2034.
- SROGI, K. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environ Chem Lett*, 2007, vol. 5, s. 169-195.
- STAHL, J. Characterisation of epidermal lipid composition and skin morphology of animal skin ex vivo. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, vol. 72, no. 2, s. 310-316.
- STARK, H. J. Epidermal homeostasis in long-term scaffold-enforced skin equivalents. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2006, vol. 11, no. 1, s. 93-105.

- STRAIF, K. Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Lancet Oncol*, 2005, vol. 6, no. 12, s. 931-932.
- STIRN, A. Prevalence, sociodemography, mental health and gender differences of tattooing and body piercing. *Psychother Psychosom Med Psychol*, 2006, vol. 56, no. 11, s. 445-449.
- SWANBECK, G. A study of the state of aggregation of the lipids in normal and psoriatic horny layer. *Acta Derm Venereol*, 1962, vol. 42, s. 445-447.
- SWARBRICK, J. Drug permeation through human skin: I. Effect of storage conditions of skin. *J Invest Dermatol*, 1982, vol. 78, no. 1, s. 63-66.
- SWARTZENDRUBER, D. C. Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum. *J Invest Dermatol*, 1989, vol. 92, no. 2, s. 251-257.
- TAKEUCHI, H. Usefulness of rat skin as a substitute for human skin in the in vitro skin permeation study. *Exp Anim*, 2011, vol. 60, no. 4, s. 373-384.
- TANG, Y. Neurotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and simple chemical mixtures. *J Toxicol Environ Health A*, 2003, vol. 66, no. 10, s. 919-940.
- TEICHMANN, A. Differential stripping: determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. *J Invest Dermatol*, 2005, vol. 125, no. 2, s. 264-269.
- THIER, R. Cytochrome P450 1B1, a new keystone in gene-environment interactions related to human head and neck cancer? *Arch Toxicol*, 2002, vol. 76, no. 5-6, s. 249-256.
- TODO, H. Permeation pathway of macromolecules and nanospheres through skin. *Biol Pharm Bull*, 2010, vol. 33, no. 8, s. 1394-1399.
- TRAUER, S. Development of an in vitro modified skin absorption test for the investigation of the follicular penetration pathway of caffeine. *Skin Pharmacol Physiol*, 2010, vol. 23, no. 6, s. 320-327.
- TROMMER, H. Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacol Physiol*, 2006, vol. 19, no. 2, s. 106-121.
- TSAI, J. C. Effect of barrier disruption by acetone treatment on the permeability of compounds with various lipophilicities: implications for the permeability of compromised skin. *J Pharm Sci*, 2001, vol. 90, no. 9, s. 1242-1254.
- UPHAM, B. L. Tumor promoting properties of a cigarette smoke prevalent polycyclic aromatic hydrocarbon as indicated by the inhibition of gap junctional intercellular communication via phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *Cancer Sci*, 2008, vol. 99, no. 4, s. 696-705.
- US EPA. *In Vitro Dermal Absorption Rate Testing of Certain Chemicals of Interest to the Occupational Safety and Health Administration* [online]. c2004a [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <<http://www.epa.gov/EPA-TOX/2004/April/Day-26/t9409.htm>>.
- US EPA. *Risk assessment guidance for Superfund, Vol. I: Human health evaluation manual (part E, supplemental guidance for dermal risk assessment)* [online]. c2004b [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <<http://www.epa.gov/oswer/riskassessment/ragse/>>.
- US EPA. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)* [online]. c2008 [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <<http://www.epa.gov/waste/hazard/wastemin/minimize/factshts/pahs.pdf>>.
- USP. *In-vitro and in-vivo evaluation of dosage form* [online]. c1995 [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1088.html>.
- VALLET, V. Percutaneous penetration and distribution of VX using in vitro pig or human excised skin. Validation of demeton-S-methyl as adequate simulant for VX skin permeation investigations. *Toxicology*, 2008, vol. 246, no. 1, s. 73-82.
- VALLETTE, G. Percutaneous absorption. *Pharm J*, 1953, vol. 20, s. 461-462.
- VAN DE SANDT, J. J. In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: a multi-centre comparison study. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2004, vol. 39, no. 3, s. 271-281.
- VAN GREVENYNGHE, J. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit differentiation of human monocytes into macrophages. *J Immunol*, 2003, vol. 170, no. 5, s. 2374-2381.
- VAN RAVENZWAAY, B. A comparison between in vitro rat and human and in vivo rat skin absorption studies. *Hum Exp Toxicol*, 2004, vol. 23, no. 9, s. 421-430.
- VANROOIJ, J. G. Estimation of individual dermal and respiratory uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons in 12 coke oven workers. *Br J Ind Med*, 1993, vol. 50, no. 7, s. 623-632.

- VANROOIJ, J. G. Reduction of urinary 1-hydroxypyrene excretion in coke-oven workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons due to improved hygienic skin protective measures. *Ann Occup Hyg*, 1994, vol. 38, no. 3, s. 247-256.
- VANROOIJ, J. G. Dermal absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons in the blood-perfused pig ear. *J Appl Toxicol*, 1995, vol. 15, no. 3, s. 193-200.
- VÁVROVÁ, K. Amphiphilic transdermal permeation enhancers: structure-activity relationships. *Curr Med Chem*, 2005, vol. 12, no. 19, s. 2273-22791.
- VÁVROVÁ, K. Role ceramidů v kůži. *Praktické lékárenství*, 2006, vol. 2, s. 55-58.
- VONDRÁČEK, J. Modulation of estrogen receptor-dependent reporter construct activation and G0/G1-S-phase transition by polycyclic aromatic hydrocarbons in human breast carcinoma MCF-7 cells. *Toxicol Sci*, 2002, vol. 70, no. 2, s. 193-201.
- VYSKOČIL, A. Environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in Czech Republic. *Hum Exp Toxicol*, 1997, vol. 16, no. 10, s. 589-595.
- VYSKOČIL, A. Assessment of multipathway exposure of small children to PAH. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2000, vol. 8, no. 2, s. 111-118.
- WAGNER, H. Drug distribution in human skin using two different in vitro test systems: comparison with in vivo data. *Pharm Res*, 2000, vol. 17, no. 12, s. 1475-1481.
- WAGNER, H. pH profiles in human skin: influence of two in vitro test systems for drug delivery testing. *Eur J Pharm Biopharm*, 2003, vol. 55, no. 1, s. 57-65.
- WALLER, J. M. Age and skin structure and function, a quantitative approach (I): blood flow, pH, thickness, and ultrasound echogenicity. *Skin Res Technol*, 2005, vol. 11, no. 4, s. 221-235.
- WALLER, J. M. Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water, and lipid content and structure. *Skin Res Technol*, 2006, vol. 12, no. 3, s. 145-154.
- WALTER, D. Standardized investigation of percutaneous absorption of bitumen emission in humans. *J Occup Environ Hyg*, 2007, vol. 4, no. S1, s. 144-153.
- WANG, S. Light-induced cytotoxicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons on the US EPA priority pollutant list in human skin HaCaT keratinocytes: Relationship between phototoxicity and excited state properties. *Environ Toxicol*, 2007, vol. 22, no. 3, s. 318-327.
- WANG, Y. Combined subcarcinogenic benzo[a]pyrene and UVA synergistically caused high tumor incidence and mutations in H-ras gene, but not p53, in SKH-1 hairless mouse skin. *Int J Cancer*, 2005, vol. 116, no. 2, s. 193-199.
- WARNER, R. R. Hydration disrupts human stratum corneum ultrastructure. *J Invest Dermatol*, 2003, vol. 120, no. 2, s. 275-284.
- WEISERBS, K. F. A cross-sectional study of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and polymorphism of glutathione S-transferases among heavy smokers by race/ethnicity. *Biomarkers*, 2003, vol. 8, no. 2, s. 142-155.
- WELSS, T. In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol In Vitro*, 2004, vol. 18, no. 3, s. 231-243.
- WESTER, P. W. Carcinogenic activity of benzo[a]pyrene in a 2 year oral study in Wistar rats. *Food Chem Toxicol*, 2012, vol. 50, no. 3-4, s. 927-935.
- WESTER, R. C. Human cadaver skin viability for in vitro percutaneous absorption: storage and detrimental effects of heat-separation and freezing. *Pharm Res*, 1998, vol. 15, no. 1, s. 82-84.
- WHITE, E. A. On the correlation between single-frequency impedance measurements and human skin permeability to water. *Toxicol In Vitro*, 2011, vol. 25, no. 8, s. 2095-2104.
- WHO. *Environmental Health Criteria 235 - Dermal Absorption* [online]. c2006 [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc235.pdf>>.
- WICKETT, R. R. Structure and function of the epidermal barrier. *Am J Infect Control*, 2006, vol. 34, Suppl 10, s. S98-S110.
- WILKINSON, S. C. Interactions of skin thickness and physicochemical properties of test compounds in percutaneous penetration studies. *Int Arch Occup Environ Health*, 2006, vol. 79, no. 5, s. 405-413.
- WILLIAMS, A. C. The 'Iceman': molecular structure of 5200-year-old skin characterised by Raman spectroscopy and electron microscopy. *Biochim Biophys Acta*, 1995, vol. 1246, no. 1, s. 98-105.
- WILLIAMS, A. C. *Transdermal and topical drug delivery*. 1. vydání, 2003. London: Pharmaceutical Press. 256 s. ISBN 0 85369 489 3.

- WORMLEY, D. D. Inhaled benzo[a]pyrene impairs long-term potentiation in the F1 generation rat dentate gyrus. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2004, vol. 50, no. 6, s. 715-721.
- WU, K. S. Graded delamination behavior of human stratum corneum. *Biomaterials*, 2006, vol. 27, no. 34, s. 5861-5870.
- XIA, Y. Urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to idiopathic male infertility. *Hum Reprod*, 2009, vol. 24, no. 5, s. 1067-1074.
- YA-XIAN, Z. Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin – relation to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters. *Arch Dermatol Res*, 1999, vol. 291, no. 10, s. 555-559.
- YAMAGIWA, K. Experimental study of the pathogenesis of carcinoma. *J Cancer Res*, 1918, vol. 3, s. 1-29.
- YANG, J. J. Percutaneous absorption of anthracene in the rat: comparison of in vivo and in vitro results. *Toxicol Ind Health*, 1986, vol. 2, no. 4, s. 79-84.
- YUSUF, N. Acquired and innate immunity to polyaromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, vol. 224, no. 3, s. 308-312.
- ZÁRUBA, F. *Dermatovenerologie*. 1. vydání, 1994. Praha: Scientia medica s.r.o, 248+32 s. ISBN 80-85526-31-X.
- ZHAI, H. Occlusion vs. skin barrier function. *Skin Res Technol*, 2002, vol. 8, no. 1, s. 1-6.
- ZORIN, S. In vitro test of nicotine's permeability through human skin. Risk evaluation and safety aspects. *Ann Occup Hyg*, 1999, vol. 43, no. 6, s. 405-413.
- ZOUBOULIS, C. C. Sexual hormones in human skin. *Horm Metab Res*, 2007, vol. 39, no. 2, s. 85-95.

10. Přílohy

Příloha 1 – Matematický model k hodnocení absorpce látky Iteration tool

Příloha 2 – Vliv rozpouštědla na dermální absorpci pyrenu in vitro

Příloha 3 – Vliv koncentrace na transdermální absorpci pyrenu in vitro

Příloha 4 – Porovnání fluxu a lag time při individuální a směsné aplikaci jednotlivých testovaných zástupců PAU