



KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE  
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA  
VŠEOBECNÁ FAKULTNÍ NEMOCNICE V PRAZE  
ÚSTAV HYGIENY A EPIDEMIOLOGIE  
128 00 Praha 2, Studničkova 7

Vážený pan  
Prof. MUDr. RNDr. Miroslav Červinka, CSc.  
Děkan  
LF UK v Hradci Králové  
Šimkova 870, poštovní přihrádka 38  
500 38 Hradec Králové 1

**Věc: Oponentský posudek disertační práce MUDr. Lenky Kotingové**

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

Oponovaná disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia v doktorském studijním programu Hygiena, preventivní lékařství na Ústavu hygieny a preventivního lékařství Lékařské fakulty UK v Hradci Králové MUDr. Lenkou Kotingovou pod vedením školitele prof. Ing. Zdeněk Fiala, CSc. Dizertační práce vznikla za podpory výzkumného záměru MZO 00179906, grantů specifického výzkum SVV-2011-262901, SVV2012-264901 a SVV-2013-266901 a Projektu Univerzity Karlovy v Praze, Lékařské fakulty v Hradci Králové PRVOUK P37/09.

Habilitační spis obvyklého členění má včetně příloh 168 stránek, dosažené výsledky jsou prezentovány v 29 tabulkách a ilustrovány 41 obrázcích a grafech. Citovaná abundanční literatura zabírá 14 a ½ stránek dizertace. Podobně zbytečně abundanční je i první kapitola teoretické části Stavba kůže.

Dermální expozice představuje jednu z významných cest vstupu exogenních látek do organismu. Údaje o kinetice transdermální absorpce polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) jsou zatím nedostačující. Stávající odhady úrovně zdravotních rizik, souvisejících s dermální expozicí PAU jsou proto zatíženy velkou mírou nejistot.

Cílem disertační práce bylo zavedení a validace vhodné metodiky testování transdermální absorpce látek *in vitro* a použití této metodiky k získání nových poznatků o vlivu koncentrace, rozpouštědla a formy aplikace na míru dermální absorpce vybraných zástupců PAU.

Pro testování transdermální absorpce látek *in vitro* byla zvolena metodika používající vertikální statickou difúzní komůrku dle Franze. Jako absorpční membrána byla vybrána plná kůže zadní plochy ušního boltce prasete domácího. Obsah stanovovaných látek ve vzorcích receptorové tekutiny byl analyzován pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) a pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC). Pro GC-MS a HPLC analýzy byly vyvinuty a validovány nové metodiky. 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 zpřesňuje.

Autorka prokázala, 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 hodnoty 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, jak uvádí autorka disertace „standardní acetonové údaje“, dochází k nadhodnocení míry odhadovaného rizika.

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 až na výjimečné situace téměř výhradně ve směsích, bude vypočtená úroveň rizika dermální expozice směsi PAU, odhadovaná na základě dat získaných při individuální aplikaci, nadhodnocena.

Problematika expozice člověka PAU patří dlouhodobě k závažným problémům hygienické toxikologie v pracovním i životním prostředí. Nachází se v ovzduší, vodě, půdě i potravinách. Zdroje PAU lze rozdělit na přírodní a antropogenní. Přírodními zdroji jsou vulkanická činnost a přírodní požáry; přirozeně se také vyskytují v ropě, kamenouhelném dehtu, kreosotovém oleji a asfaltu. Podstatně větší podíl PAU je produkován člověkem (spalování fosilních paliv, doprava, spalování odpadů, průmysl - výroba železa, oceli, hliníku, koksu, dehtu, sazí a svítiplynu. Nezanedbatelným zdrojem je tabákový kouř a některé způsoby úpravy jídla (grilování, uzení, smažení a pečení) díky pyrolýze organických látek při teplotách nad 170°C.

PAU vstupují do organismu cestou inhalační, orální a dermální. Po vstupu do organismu mohou být PAU distribuovány do všech orgánů, ovšem s preferencí distribuce a retence ve tkáních obsahujících větší množství tuku, jako všechny lipofilní xenobiotika. Dermální cesta je významná zejména u osob s pracovní expozicí PAU, jako např. asfaltéři a dělníci klasických plynáren a koksoven. Nejdůležitějšími nepříznivými účinky PAU na zdraví

člověka je u části jejich spektra prokázána karcinogenita, mutagenita, teratogenita a imunotoxicita.

Po podrobném seznámení s disertační prací lze konstatovat, že zadané cíle-zavedení a validace vhodné metodiky testování transdermální absorpce látek in vitro s použitím statické vertikální difúzní komůrky, stejně jako použití této metodiky k získání nových poznatků o vlivu koncentrace, rozpouštědla a formy aplikace (individuální/směsná) na míru dermální absorpce vybraných zástupců PAU byly splněny. K testování transdermální absorpce látek byla zvolena metoda používající jednoduché statické difúzní komůrky dle Franze. Testování transdermální absorpce PAU bylo rozděleno do tří částí. V první (úvodní) fázi byl pilotně testován pyren, jako standardní reprezentant skupiny PAU. Byly stanoveny orientační 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 (antracen, benz[a]antracen, benzo[a]pyren, fenantren, fluoren, fluoranten, naftalen, pyren) hodnoceno ovlivnění absorpčních parametrů způsobem aplikace látky (samostatně nebo ve směsi). Podnětem k hodnocení vlivu rozpouštědla na dermální absorpci pyrenu byla skutečnost, že ve většině dosud publikovaných článků zabývajících se dermální absorpcí PAU, byl jako rozpouštědlo (nosné medium) běžně používán aceton nebo etanol. 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, která je v uvedeném kontextu uváděna jako příklad expozice PAU z terapeutických důvodů je defektní povrch kůže ošetřován dehtovou pastou. Běžně je používána 3-5% dehtová pasta (5% dehtová pasta, která obsahuje 0,95mg pyrenu/g pasty).

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

Pro testování transdermální absorpce látek in vitro byla zvolena metodika používající vertikální statickou difúzní komůrku dle Franze. Jako absorpční membrána v testovací soupravě byla užita plná kůže zadní plochy ušního boltce prasete domácího. Obsah stanovovaných látek ve vzorcích receptorové tekutiny byl analyzován pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) a pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC), pro které 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).

Autorka prokázala, že i relativně nízké donorové koncentrace PAU mohou naplňovat kapacitu transportních cest v kůži. Z pohledu faktorů ovlivňujících celkovou míru transdermálního transportu PAU má velikost exponované plochy kůže větší vliv než

koncentrace PAU v aplikovaném roztoku. PAU s malou molekulární hmotností byly absorbovány rychleji a ve větším množství než PAU s vyšší molekulární hmotností. Míra dermální absorpce PAU významně závisela na charakteru rozpouštědla. Použití olejového rozpouštědla mělo za následek (v porovnání s použitím standardního rozpouštědla - acetonu) nižší hodnoty 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.

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.

### **Dotazy a připomínky k oponované disertační práci**

V metodické části práce autorka konstatuje, že „zlatým standardem“ pro testování transdermální absorpce chemických látek přes absorpční membránu *in vitro* je lidská kůže. Alternativou k lidské kůži je použití kůže zvířecí, nejčastěji myši, potkaní nebo prasečí, která je lidské kůži nejpodobnější. Další alternativou je použití kůže umělé vytvořené, která zatím nedosahuje vlastností a funkce kůže přirozené (použitelné např. při léčbě popálenin). Při provádění testů transdermální penetrace citovaných autorkou disertace již dříve bylo opakovaně zjištěno, že výsledky vykazují poměrně značnou variabilitu. Vzhledem k tomu se doporučuje použít v tomto druhu testů kůži od více dárců. Doporučuje se použít minimálně šest vzorků kůže od tří různých dárců (EU – SCCNFP 2003), nebo nověji osm komůrek s kůžemi nejméně od čtyř dárců (EFSA 2012). Ze získaných hodnot absorpce testované látky jsou pak počítány charakteristiky absorpce – flux, lag time, permeační konstanta a případně i jiné parametry, které jsou dále statisticky zpracovány. Byly autorkou uváděné potenciální etické problémy spojené s použitím lidské kůže jediným důvodem volby kůže prasečí?

Jako oponent v principu oceňuji, že 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, jak autorka uvádí, připravovány do tisku. V tom vidím naopak potíže, protože oponent je v situaci účastníka procesu “black box” a nezbývá mu než věřit něčemu, co neprošlo oponenturou. Nicméně, oponent není expertem v biostatice a díky dobré pověsti pracoviště řešitele věřím, že použitý postup je *lege artis*. Proto můj druhý dotaz směřuje na základní principy konstrukce použitého počítačového modelu.

Dizertační práce představuje velký objem technicky náročné, vysoce kvalifikované laboratorní práce i zpracování získaných výsledků. Je deklarována podpora výzkumným závěrem MZO, třemi granty specifického výzkumu a PRVOUKem P37/09. Je technicky možné odhadnout podíl jednotlivých grantů na objemu vykonané práce? Na které části laboratorní či výpočetní práce se autorka podílela osobně? Technický dotaz. V seznamu použitých zkratk jsem nenašel vysvětlení zkratky MZO.

### **ZÁVĚR:**

Experimenty s dermálními expozicemi PAU byly již řadu let prováděny na Ústavu hygieny a preventivního lékařství Lékařské fakulty UK v Hradci Králové. Lze očekávat, že jejich žádoucí pokračování hodnocením celkového profilu testovaných látek s následnými odhady maximálních absorpcí vybraných zástupců PAU přispějí k dalšímu zpřesňování základních charakteristik absorpce PAU pro účely odhadu míry zdravotních rizik v oblasti pracovního lékařství a při edukaci v oblasti zdravotní gramotnosti např. v rámci tepelné úpravy potravin, nebo při prevenci tabakismu.

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

Oponovaná disertační práce splnila sledovaný cíl, a proto doporučuji, aby po její úspěšné obhajobě byl MUDr. Lence Kotingové udělen titul Ph.D. v oboru Hygiena, preventivní lékařství.

V Praze dne 11. května 2015

prof. MUDr. Vladimír Bencko, DrSc.