

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



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

Lenka Kotingová

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program *Hygiena, preventivní lékařství*

Hradec Králové

2015

Disertační práce byla vypracována v rámci *kombinovaného* studia doktorského studijního programu Hygiena, preventivní lékařství na Ústavu hygieny a preventivního lékařství Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: MUDr. Lenka Kotingová
Ústav hygieny a preventivního lékařství, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

Školitel: prof. Ing. Zdeněk Fiala, CSc.
Ústav hygieny a preventivního lékařství, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

Školitel-konzultant: doc. MUDr. Lenka Borská, Ph.D.
Ústav patologické fyziologie, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

Oponenti: Prof. MUDr. Vladimír Bencko, DrSc., Ústav hygieny a epidemiologie, 1. Lékařská fakulta UK, Studničkova 7, 128 00 Praha 2

Prof. Ing. Alexander Čegan, CSc., Katedra biologických a biochemických věd
Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice

Obhajoba disertační práce se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Hygiena, preventivní lékařství dne 18. června 2015 od 9:30 h v seminární místnosti Ústavu hygieny a preventivního lékařství, Lékařská fakulta UK v Hradci Králové, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové.

Tato práce vznikla za podpory grantů:

Výzkumný záměr MZO 00179906

Specifický výzkum SVV-2011-262901, SVV-2012-264901 a SVV-2013-266901

Projekt Univerzity Karlovy v Praze, Lékařské fakulty v Hradci Králové PRVOUK P37/09

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

prof. Ing. Zdeněk Fiala, CSc.

Předseda komise pro obhajoby disertačních prací v doktorském studijním programu Hygiena, preventivní lékařství

Obsah

1. Souhrn	2
2. Summary	3
3. Seznam zkratek	4
4. Úvod do problematiky	5
4.1. Kůže	5
4.1.1 Epidermis	5
4.1.2 Dermis	6
4.1.3 Hypodermis	6
4.2 Transdermální absorpce	6
4.2.1 Testování transdermální absorpce in vitro	7
4.3 Polycyklické aromatické uhlovodíky	8
5. Cíle disertační práce	9
6. Metodika testování transdermální absorpce in vitro	9
7. Výsledky testování transdermální absorpce PAU	11
7.1 Transdermální absorpce kofeinu (validace metodiky)	11
7.2 Transdermální absorpce PAU	11
7.2.1 Fáze I. Transdermální absorpce pyrenu (vliv rozpouštědla a koncentrace)	12
7.2.1.1 Vliv rozpouštědla na transdermální absorpci pyrenu	12
7.2.1.2 Vliv koncentrace na transdermální absorpci pyrenu	12
7.2.2 Fáze II. Transdermální absorpce naftalenu (vliv rozpouštědla)	13
7.2.3 Fáze III. Transdermální absorpce směsí PAU (vliv formy aplikace)	14
7.2.3.1 Transdermální absorpce naftalenu, fenantrenu, pyrenu a benzo[a]pyrenu	14
7.2.3.2 Transdermální absorpce fluorenu, fluorantenu, antracenu a benz[a]antracenu	17
8. Diskuse	19
8.1 Výběr materiálu a metodiky	19
8.2 Výsledky experimentů	20
9. Závěr	26
10. Použitá literatura	27
11. Přehled publikační činnosti autora	30

1. Souhrn

Kinetika vybraných látek při dermální expozici (polycyklické aromatické uhlovodíky)

Kůže je jedním z největších orgánů lidského těla a její správná funkce je pro lidský organismus životně důležitá. 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 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 významně zpřesňuje.

Disertační práce přináší nové poznatky v oblasti základních charakteristik transdermální absorpce PAU *in vitro*. Tyto poznatky lze využít při zpřesňování 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 „standardní 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 charakter.

2. Summary

Kinetics of selected substances in dermal exposure (polycyclic aromatic hydrocarbons)

Skin is one of the largest human body organs and its proper functioning is vital for human body. Dermal exposure represents one of the most important pathways of exogenous substances into the body. Data on kinetics of transdermal absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) have been yet so far insufficient. Present estimates of health risks level connected to dermal exposure to PAHs, are loaded with great deal of uncertainty.

The aim of the dissertation thesis was employment and validation of appropriate testing method of transdermal absorption of substances *in vitro* and the use of this method to obtain new findings on the influence of concentration, dissolvent and form of application, on the measure of dermal absorption of selected PAH representatives.

For the testing of transdermal absorption of substances *in vitro*, the method using static Franz vertical diffusion cell was chosen. As an absorption membrane, full leather of rear surface of the auricle of a domestic pig was used. Content of analytes in samples of receptor fluid was analyzed by gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) and by high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC), for which a new methods was developed and validated. From the collected data, the values of the fundamental characteristics of the transdermal absorption of PAHs were calculated (flux and lag time). For the calculations, a new computer model was created that determine the characteristics of transdermal absorption significantly more accurately.

The dissertation thesis brings new findings in the field of basic characteristics of the transdermal absorption of PAHs *in vitro*. These findings can be used in specification of level estimation of health risks of dermal exposure to PAHs.

It has been proven that even relatively low donor concentrations of PAHs can fill the capacity of transport pathways in skin. From the point of view of the factors affecting the overall measure of transdermal transport of PAHs, the size of exposed skin has larger influence than the concentration of PAHs in the applied solution. PAHs with low molecular weight were absorbed faster and in larger amount than PAHs with higher molecular weight.

The measure of dermal absorption of PAHs depended significantly on the character of the dissolvent. The use of oil dissolvent resulted (compared to the use of standard acetone dissolvent) in lower value of dermal absorption measure. Real exposures to PAHs in the life and working environment are usually connected with fat (oil) bases (environment). It is probable that in cases where the "standard acetone data" are used for health risks estimate of dermal exposure to PAHs, the estimate risk has overestimated (conservative) character.

The form of the substance application was influencing significantly the measure of dermal absorption of PAHs (individual/blend application). In all experiments, the lower measure of dermal absorption was found in the application of PAH blend (compared to individual application). With regard to the fact that PAHs occur in the life and working environment almost exclusively in blends, the risk level of dermal exposure to PAH blend, estimated on the basis of the data obtained in individual application, will have overestimated character.

3. Seznam zkratek

ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BaA	benz[a]antracen
BaP	benzo[a]pyren
BSA	bovinní sérový albumin
CE	buněčná obálka (cell envelope)
CYP	cytochrom
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EFSA	European Food Safety Authority
EU – SCCNFP	European Union – Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-food products
FN	fakultní nemocnice
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (gas chromatography mass spectrometry)
GT	Goeckermanova terapie
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
IARC	International Agency for Research on Cancer
$K_{O/W}$	rozdělovací koeficient oktanol/voda
LF UK	Lékařská fakulta Univerzity Karlovy
MW	molekulární hmotnost (molecular weight)
MZ ČR	Ministerstvo zdravotnictví České republiky
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (Organisation for Economic Co-operation and Development)
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
RT	receptorová tekutina
SB	vrstva základní (stratum basale)
SC	vrstva rohová (stratum corneum)
SG	vrstva zrnitá (stratum granulosum)
SL	vrstva buněk světlých (stratum lucidum)
SS	vrstva ostnitá (stratum spinosum)
UV	ultrafialové (záření)
VSO	výběrová směrodatná odchylka
TER	elektrický odpor kůže (transcutaneous electrical resistance)
TEWL	ztráta vody kůží (transepidermal water loss)
ÚKBD	Ústav klinické biochemie a diagnostiky
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)

4. Úvod do problematiky

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) jsou součástí běžné kontaminace našeho životního i pracovního prostředí. Ústav hygieny a preventivního lékařství Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, kde je autorka disertační práce zaměstnána, se dlouhodobě zabývá hodnocením jejich negativních účinků na lidské zdraví (např. Vyskočil 1997, 2000; Fiala 1999, 2000, 2001, 2006; Borská 2006, 2009, 2010a,b).

Při studiu bližších informací o transdermální absorpci PAU bylo v publikované literatuře nalezeno poměrně málo informací týkajících se prostupu těchto látek kůží. Proto bylo rozhodnuto pokusit se tyto informace rozšířit a v rámci doktorského studia zavést na ústavu metodiku vhodnou k testování přestupu látek skrz kůži a zjistit základní absorpční charakteristiky vybraných reprezentantů PAU.

4.1 Kůže

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

Kůže (cutis, integumentum commune) je největším orgánem lidského těla. Její hmotnost dosahuje cca 16% celkové tělesné hmotnosti. 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, 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 sensorickým orgánem (Záruba 1994).

Kůže se skládá z pokožky (epidermis), škáry (dermis, corium) a podkoží (hypodermis, tela subcutanea, subcutis).

4.1.1 Epidermis

Epidermis má tloušťku cca 50 – 100 μm a nachází se v ní čtyři základní typy buněk – keratinocyty (95 % buněk), melanocyty, Langerhansovy a Merkelovy buňky. Převažující *keratinocyty* vytváří pět (dle jiných autorů čtyři) odlišné vrstvy (Bouwstra 2003): 1) *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; 2) *vrstva ostnitá (stratum spinosum, SS)* se skládá z několika vrstev (čtyř až osmi) kubických nebo polygonálních buněk, které se směrem nahoru oplošťují. Buňky jsou navzájem spojeny desmozomy, což jim dává ostnitý vzhled; 3) *vrstva zrnitá (stratum granulosum, SG)* je tvořena třemi až pěti vrstvami oploštělých polygonálních buněk, v jejichž cytoplazmě se nachází velké množství granulí; 4) *vrstva buněk světlých (stratum lucidum, SL)* je patrná v kůži tlustého typu (na dlaních a ploskách nohou), je tvořena 1-2 vrstvami plochých eozinofilních buněk. Někteří autoři tuto vrstvu nepovažují za samostatnou a uvádí ji jako součást stratum corneum; 5) *vrstva rohová (stratum corneum, SC)* je nejdůležitější součástí bariéry bránící průniku látek ze zevního prostředí do vnitřního prostředí organismu. Dělí se na dvě části – SC conjunctum (compactum; spodní, neodlupující se část) a SC disjunctum (horní část, tvořená nepřetržitě se odlupujícími buňkami). Stavba SC připomíná zeď. Jsou zde buňky – korneocyty (cihly) navzájem spojené mezibuněčnou hmotou (malta); (Michaels 1975). SC je tvořeno v průměru 15-20 vrstvami plochých bezjaderných zrohovatělých buněk. Hlavním strukturálním

proteinem v těchto buňkách je keratin. Keratinová vlákna vytváří v buňkách prostorovou síť. Dalšími významnými proteiny jsou filaggrin a loricrin (Proksch 2008). Keratinocyty v dolních vrstvách epidermis jsou obaleny normální vodopropustnou buněčnou membránou. Při zrání keratinocyty ve stratum granulosum je tato transformována na rezistentní proteinovou schránku zvanou *cell envelope* (CE, buněčná obálka); (Nishifuji 2013). Vysoké integrity SC je dosaženo pomocí korneodesmozomů, které upevňují sousedící korneocyty v samotném SC nebo k sousední vrstvě. Korneodesmozomy musí být degradovány v průběhu správné deskvamace. Prostor mezi korneocyty je vyplněn *mezibuněčnou hmotou*, která je tvořena převážně tukovou matrix, malým množstvím proteinů a vody. Hlavní lipidovou složkou extracelulární matrix jsou ceramidy (tvoří kolem 40-50 % objemu; jsou tvořeny molekulou mastné kyseliny připojenou amidovou vazbou ke sfingoidní bázi; na základě nejnovějších poznatků jsou řazeny do 12 tříd); (Ishikawa 2013), cholesterol (25 % objemu), mastné kyseliny (10-20 % objemu), malé množství (2-5 % objemu) esterů a sulfátů cholesterolu a glukosyl ceramidů (Harding 2004). Lipidy v extracelulárním prostoru SC nejsou uloženy amorfně, vytváří pravidelně organizovanou strukturu, skládající se z opakujících se lipidových lamel uložených paralelně s povrchem buněk.

4.1.2 Dermis

Dermis je tvořena různě silnou vrstvou řídkého kolagenního vaziva, od epidermis je oddělena bazální membránou. 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*. V dermis se již nachází cévy (dvě arteriální a tři venózní pleteně).

Nedílnou součástí dermis jsou i tzv. *kožní adnexa* - žlázy mazové a potní (malé a velké) a vlasové folikuly.

4.1.3 Hypodermis

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

Podkožní tuk obsahuje především neutrální tuky (triacylglyceroly). Je důležitou energetickou zásobárnou organismu, chrání proti mechanickým vlivům, účastní se termoregulace organismu (tepelný izolátor) a slouží též jako zásobárna vody v organismu (Záruba 1994).

4.2 Transdermální absorpce

Při dermální expozici mohou chemické látky pronikat do vnitřního prostředí organismu pěti různými cestami: 1) transcelulární cestou – tj. skrz těla buněk, 2) intercelulární cestou – tj. mezibuněčnými prostory (tento způsob je považován za převažující), 3) vlasovými folikuly, 4) mazovými žlázami a 5) vývody potních žláz. Průnik látek kůží je považován za proces *pasivní difúze* na základě rozdílného koncentračního gradientu látky na obou stranách penetrační membrány (WHO 2006).

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

4.2.1 Testování transdermální absorpce in vitro

Základním laboratorním zařízením pro testování transdermální absorpce chemických látek in vitro jsou difúzní komůrky. Používají se dva směry penetrace – horizontální a vertikální (používána častěji). Horní část vertikální komůrky je označována jako část „donorová“, spodní jako část „receptorová“. Absorpční membrána (kůže) se upevňuje mezi tyto dvě části, epidermis směrem nahoru. Na tuto stranu kůže se potom aplikuje známé množství testované látky. Vertikální komůrky se dělí na dva základní typy. Prvním je statická vertikální difúzní komůrka (Franz 1975), druhým typem je průtoková vertikální difúzní komůrka (Bronaugh 1985).

„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 (ta je lidské kůži nejpodobnější); (Barbero 2009). Další alternativou je použití kůže uměle vytvořené, ale ta zatím stále ještě nedosahuje vlastností a funkce kůže přirozené (Ponec 2002).

Lidskou nebo zvířecí kůži je možno použít v plné tloušťce 500-1000 μm . Lze též použít tzv. dermatomovanou kůži, která je dermatomem seříznuta na tloušťku 200-500 μm a obsahuje rohovou vrstvu, zbývající vrstvy epidermis a pouze horní část škáry. Další variantou je použití pouze epidermis nebo jen samotné rohové vrstvy. Pro testování je možné použití kůže čerstvé nebo zmrazené, ta je vzhledem k dlouhodobé použitelnosti (až 1 rok skladování) v pokusech využívána častěji (WHO 2006).

Důležitou podmínkou úspěšného provedení testu transdermální absorpce látek je neporušenost penetrační membrány, neboť i malé poškození integrity membrány významně zvyšuje percutánní absorpci (Nielsen 2007). Testování integrity kůže může být provedeno třemi způsoby: a) před zahájením testu; b) v průběhu testu; c) po ukončení testu transdermální absorpce (OECD 2004b).

Testovaná látka se aplikuje na horní (epidermální) stranu kůže (instalované v difúzní komůrce) v množství, které je dáno podmínkami experimentu. Dolní (receptorová) část komůrky je naplněna receptorovou tekutinou. Tato tekutina nesmí poškozovat kůži a musí odpovídat chemickému charakteru testované látky (WHO 2006). Vzorky receptorové tekutiny jsou pro analýzu absorbovaného množství testované látky odebírány manuálně ve stanovených časových intervalech (statická komůrka), nebo kontinuálně pomocí peristaltické pumpy (průtoková komůrka). Odebrané množství je nahrazeno novou receptorovou tekutinou. Doba trvání pokusu je dána podmínkami experimentu, nejčastěji to bývá 24 h (WHO 2006).

Při provádění testů transdermální penetrace bylo zjištěno, že výsledky vykazují poměrně značnou variabilitu (Williams 2003, Frum 2007). Vzhledem k tomu je vhodné použít v experimentu kůži od více dárců, doporučováno je minimálně šest vzorků kůže od tří různých dárců (EU-SCCNFP 2003), nebo nověji osm komůrek s kůžemi nejméně od čtyř dárců (EFSA 2012).

Po ukončení pokusu se testovaná látka může nacházet 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. 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 2004b).

Ze získaných hodnot absorpce testované látky jsou potom počítány charakteristiky absorpce – flux, lag time, permeační konstanta, případně jiné (záleží na charakteru experimentu) a ty jsou dále statisticky zpracovány.

4.3 Polycyklické aromatické uhlovodíky

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) jsou organické látky tvořené pouze uhlíkem a vodíkem. Společným rysem je přítomnost dvou a více aromatických kruhů. 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. 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 4 kruhy (MW 128-178) bývají v plynném stavu, PAU se 4 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).

PAU vznikají při nedokonalém spalování organického materiálu. Nachází se v ovzduší, vodě, půdě, potravinách a dalších materiálech denního kontaktu. 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, asfaltu (Fiala 1999). Podstatně větší množství PAU je produkováno člověkem (spalování fosilních paliv, doprava, spalování odpadů, průmysl - výroba železa, oceli, hliníku, koksu, dehtu, sazí a svítiplynu); (Guo 2011). Nezanedbatelným zdrojem je tabákový kouř a některé způsoby úpravy jídla (grilování, uzení, smažení a pečení); (Fiala 2000).

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 tukových látek (IARC 2010).

Dermální cesta je významná zejména u osob s pracovní expozicí PAU, jak ukazují i práce porovnávající inhalační a dermální expozice PAU s odpovědí organismu. Dermální cestou může vstupovat až 70 % absorbovaných PAU (Walter 2007, Marczynski 2009).

Hlavním orgánem metabolismu PAU jsou játra, ale metabolismus PAU začíná již v epitelové vrstvě vstupních orgánů (v plicní tkáni, v zažívací trubici a v kůži). Metabolismus PAU probíhá ve dvou fázích. V první fázi jsou PAU přeměňovány na reaktivnější metabolity pomocí různých enzymů (cytochrom P450, peroxidázy), ve druhé fázi jsou tyto konjugovány pomocí enzymů s glutationem, glukuronovou kyselinou a sulfáty a vzniklé konjugáty jsou pak vylučovány z organismu (IARC 2010).

Nejdůležitějšími negativními účinky PAU na zdraví jsou karcinogenita, mutagenita, teratogenita a imunotoxicita (IARC 2010).

5. Cíle disertační práce

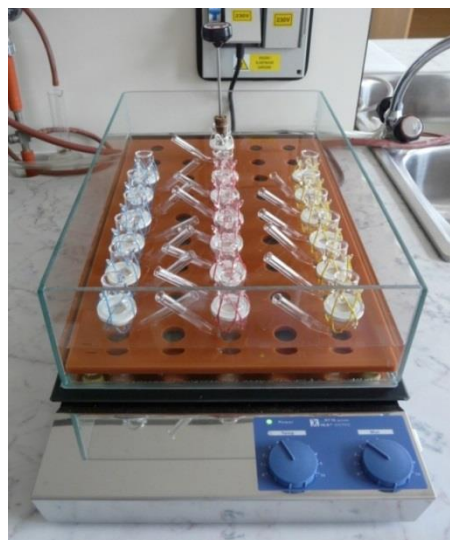
- Zavedení a validace vhodné metodiky testování transdermální absorpce látek *in vitro* s použitím statické vertikální difúzní komůrky.
- Použití této metodiky k získání nových poznatků o vlivu koncentrace, rozpouštědla a formy aplikace (individuální/směsná) na míru dermální absorpce vybraných zástupců PAU.

6. Metodika testování transdermální absorpce *in vitro*

K testování transdermální absorpce látek byla zvolena metoda používající jednoduché statické difúzní komůrky dle Franze (Franz 1975).

Rozmražené, vizuálně zkontrolované a vyhovující vzorky plné kůže zadní plochy ušního boltce prasete byly vloženy mezi donorovou a receptorovou část difúzní komůrky epidermální stranou kůže nahoru. Do receptorové části komůrky (objem 10 ml, absorpční plocha 1,77 cm²) bylo vloženo magnetické míchadlo (zajišťuje pohyb akceptorové fáze v průběhu experimentu, rychlost 300 rpm) a následně byla receptorová část naplněna receptorovou tekutinou. Ta se v experimentech testujících absorpci PAU skládala z Hanksova roztoku se 4 % bovinního sérového albuminu (BSA) a gentamycinu (koncentrace 50 mg/l). V případě validace testovací metody s použitím kofeinu v donorové fázi byl receptorovou tekutinou fyziologický roztok.

Komůrky byly umístěny do testovací aparatury (Obr. 1) tvořené skleněným boxem (naplněným destilovanou vodou) a temperovací magnetickou deskou (IKA-Werke GmbH&Co KG, Staufen), která zajišťuje teplotu horního povrchu kůže po celou dobu trvání experimentu v rozmezí 32±1°C (na povrchu kůže měřeno kontaktním teploměrem Oberflächen-Thermostick DOT 150 (VOLTcraft, Conrad Electronic



Obr. 1. Statické difúzní komůrky umístěné v temperované vodní lázni. V nejvzdálenější komůrce je umístěn dotykový teploměr, jehož čidlo je v kontaktu s horním povrchem kůže.

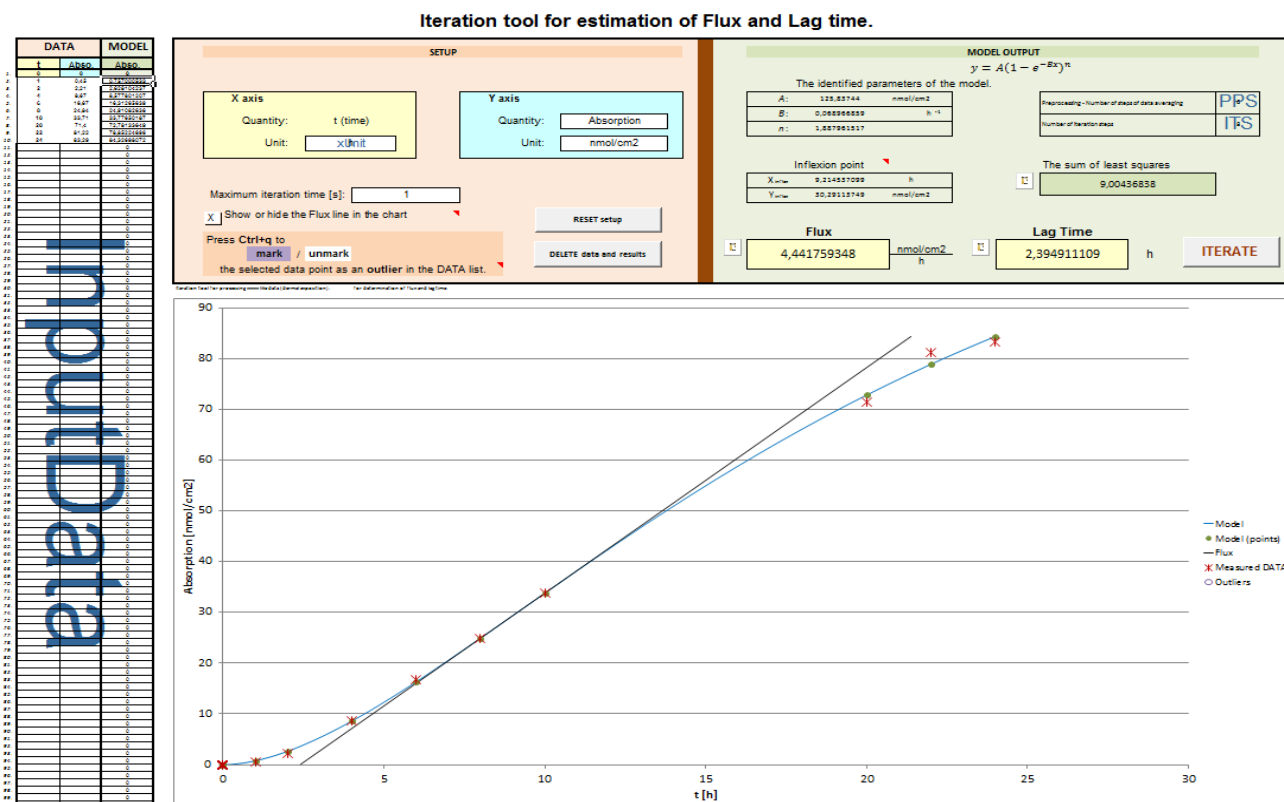
GmbH), (WHO 2006, OECD 2004b). Integrita kůže byla hodnocena vizuálně a pomocí TEWL (MPA-5; Courage+Khazaka, Köln) a TER (TECPEL-LCR-612; Tecpel Co). Po ověření integrity kůže bylo na epidermální stranu aplikováno požadované množství testované látky (vodný roztok kofeinu o koncentraci 20 g/l při validaci metodiky a vybraní zástupci PAU v testech jejich dermální absorpce). Koncentrace PAU odpovídala jejich koncentracím v 5% dehtové pastě používané při Goeckermanově metodě léčby lupénky: antracen 0,7 mg/g rozpouštědla, BaA 0,45 mg/g, BaP 0,45 mg/g, fenantren 2,8 mg/g, fluoranten 1,4 mg/g, fluoren 0,95 mg/g, naftalen 5,4 mg/g, pyren 0,95 mg/g. Při hodnocení vlivu koncentrace testované látky na absorpci byly ještě v případě pyrenu použity koncentrace 10x a 100x vyšší (9,5 a 95 mg/g; rozpouštědlem byl aceton nebo slunečnicový olej). Difúzní komůrky v testech absorpce PAU byly po dobu experimentu ponechány bez okluze, pouze v případě absorpce kofeinu byla použita okluze Parafilmem. Experimenty probíhaly za běžných laboratorních podmínek.

V průběhu testu byl v předem určených časových intervalech tenkou plastovou Pasteurovou pipetou odebrán 1 ml receptorové tekutiny, která byla umístěna do polypropylenových mikrozkušavek a hned zamrazena při -20°C . Odebrané množství receptorové tekutiny bylo vždy hned nahrazeno novou receptorovou tekutinou.

K měření koncentrace pyrenu v receptorové tekutině byla v první fázi experimentů použita metoda plynové kapilární chromatografie ve spojení s hmotovým spektrometrem GC-MS na principu iontové pasti s vnější ionizací a možností skenu MS^n (Focus-ITQ 1100, Thermo Fischer Scientific). Pro zbývající analýzy byla použita metoda HPLC (HPLC systém Prominence fy Shimadzu). Systém 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. K ovládání LC systému, sběru a zpracování dat byl užit software LC Solution (Shimadzu). Vzhledem k tomu, že v publikované literatuře nebyly nalezeny odpovídající informace o hodnocení PAU v RT pomocí HPLC, bylo třeba tuto metodiku nově vyvinout.

Analýzou získané koncentrace testované látky (kofeinu nebo PAU) v receptorové tekutině (nmol/ml) byly přepočteny na absorbované množství testované látky (kofeinu nebo PAU) v daném čase a adjustovány na jednotku plochy (nmol/cm²/čas); (Nielsen 2010). Ze získaných hodnot byly sestaveny tabulky a grafy absorpce v jednotlivých difúzních komůrkách. Z takto získaných dat transdermální absorpce byly potom spočítány parametry absorpce (flux a lag time). K výpočtu byl použit námi nově vytvořený počítačový model nazvaný „Iteration tool“ využívající aproximaci pomocí exponenciálních funkcí (podobný model nebyl dosud publikován; Obr. 2).

Obr. 2. Uživatelský panel modelu k hodnocení absorpce látky (Iteration tool)



Legenda: červené hvězdičky označují naměřené hodnoty absorpce, modrá křivka znázorňuje modelem vypočtený průběh absorpce s jí odpovídajícími vypočtenými zelenými body. Černá přímka prochází inflexním bodem a znázorňuje flux, její průnik s osou x udává lag time.

K matematickému přepočítávání získaných dat a tvorbě grafů byl použit stolní počítač DELL s operačním programem Windows 2007 a program Excel 2010. Ke statistické analýze výsledků byl použit program NCSS 2007.

7. Výsledky testování transdermální absorpce

7.1 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). Na donorovou část epidermis (n=8) bylo aplikováno 44 µl čerstvě připraveného vodného roztoku kofeinu (koncentrace 20 g/l), receptorová část komůrek byla naplněna fyziologickým roztokem. Na všechny komůrky byla použita okluze (Parafilm). Odběry 1 ml receptorové tekutiny byly provedeny v intervalech 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 22 a 24h. Jejich analýzou (HPLC) byly získány časové závislosti koncentrace kofeinu v testovacích komůrkách.

Aritmetický průměr (\pm VSO) veličiny flux měl hodnotu $6,85 \pm 2,99 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, aritmetický průměr veličiny lag time (\pm VSO) hodnotu $2,03 \pm 1,27 \text{ h}$ (Tab. 1).

Tab. 1. Kinetika a parametry transdermální absorpce kofeinu

Vzorek č.	Kumulativní absorpce ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) v jednotlivých časových intervalech (h)									Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	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

7.2 Transdermální absorpce PAU

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).

7.2.1 Fáze I. Transdermální absorpce pyrenu (vliv rozpouštědla a koncentrace)

V této fázi proběhl pilotní experiment zaměřený na hodnocení vlivu rozpouštědla a koncentrace pyrenu na parametry jeho absorpce.

7.2.1.3 Vliv rozpouštědla na transdermální absorpci pyrenu

Byly použity koncentrace donorového roztoku 0,95 mg/g rozpouštědla (odpovídá koncentraci pyrenu v 5% dehtové pastě používané při GT lupénky) a 10x vyšší (tj. 9,5 mg/g). Rozpouštědlem byl aceton (vzhledem k možnosti srovnání s publikovanou literaturou) nebo slunečnicový olej (součást Unguentum leniens v dehtové pastě pro GT).

Receptorová tekutina (Hanksův roztok se 4 % BSA a gentamycinem v koncentraci 50 mg/l) byla odebírána v intervalech 12, 24, 48 a 72 hodin. Odebrané množství bylo vždy nahrazeno čistou receptorovou tekutinou. Odebraná receptorová tekutina byla ihned zamrazena při -20°C a všechny vzorky byly následně analyzovány pomocí GC-MS. Získané koncentrace pyrenu v RT byly přepočteny na hodnoty absorpce v daných časových intervalech a byly vypočteny hodnoty fluxu a lag time. V případě použití acetonového roztoku pyrenu byla u nižší koncentrace (0,95 mg/g) průměrná hodnota fluxu $0,0192 \pm 0,0181$ nmol/cm²/h a průměrný lag time $15,38 \pm 10,04$ h. U vyšší koncentrace (9,5 mg/g) byla průměrná flux $0,0150 \pm 0,0139$ nmol/cm²/h a průměrná hodnota lag time $13,16 \pm 6,37$ h.

V případě použití pyrenu rozpuštěného ve slunečnicovém oleji byla u nižší koncentrace (0,95 mg/g) průměrná hodnota fluxu $0,0088 \pm 0,0089$ nmol/cm²/h a průměrná hodnota lag time $17,36 \pm 13,43$ h. U vyšší koncentrace (9,5 mg/g) byla průměrná hodnota fluxu $0,0119 \pm 0,0063$ nmol/cm²/h a průměrná hodnota lag time $18,09 \pm 10,54$ h.

Tab. 2. Absorpce pyrenu v závislosti na délce expozice, flux a lag time

Koncentrace pyrenu v acetonu	Absorpce pyrenu (nmol/cm ² /čas)				Flux (nmol/cm ² /h)	Lag time (h)	
		12 h	24 h	48 h			72 h
0,95 mg/g (vzorek č. 1) (n = 6)	průměr	0,010	0,028	0,062	0,223	0,0034	14,42
	VSO	0,013	0,015	0,033	0,103	0,0016	3,66
	medián	0,005	0,035	0,055	0,220	0,0034	14,03
9,5 mg/g (vzorek č. 2) (n = 6)	průměr	0,022	0,075	0,138	0,452	0,0068	11,89
	VSO	0,016	0,055	0,084	0,408	0,0060	6,36
	medián	0,015	0,070	0,140	0,345	0,0053	14,10
95 mg/g (vzorek č. 3) (n = 6)	průměr	0,017	0,043	0,078	0,160	0,0023	5,33
	VSO	0,010	0,018	0,038	0,087	0,0013	5,35
	medián	0,020	0,045	0,085	0,150	0,0021	2,92
hladina významnosti p		0,359	0,252	0,163	0,072	0,070	0,047*

Legenda: v tabulce jsou uvedeny aritmetické průměrné hodnoty, výběrové směrodatné odchylky (VSO) a mediány daných skupin výsledků. Do statistického hodnocení byly zavzaty všechny výsledky měření a hladiny významnosti udávají míru odlišnosti mezi jednotlivými skupinami. Úroveň statistické významnosti dosáhl pouze lag time ($p=0,047$; $\alpha=0,05$).

7.2.1.4 Vliv koncentrace na transdermální absorpci pyrenu

Při hodnocení vlivu koncentrace na transdermální absorpci pyrenu byly použity donorové roztoky pyrenu v acetonu (100 μl) ve třech různých koncentracích. Nejnižší koncentrace (0,95 mg/g) odpovídala koncentraci pyrenu při GT, zbývající byly 10x a 100x vyšší (tj. 9,5 a 95 mg/g).

Receptorová tekutina (Hanksův roztok s 4 % BSA a gentamycin v koncentraci 50 mg/l) byla odebírána v intervalech 12, 24, 48 a 72 h. Odebrané množství bylo vždy nahrazeno čistou receptorovou tekutinou. Odebraná receptorová tekutina byla ihned zamrazena při -20°C a všechny vzorky byly následně analyzovány pomocí GC-MS. Získané koncentrace pyrenu v RT byly přepočteny na hodnoty absorpce v daných časových intervalech a byly vypočteny hodnoty fluxu a lag time. Výsledky jsou prezentovány v tabulce 2.

7.2.2 Fáze II. Transdermální absorpce naftalenu (vliv rozpouštědla)

Na donorovou část epidermis bylo aplikováno 50 µl roztoku naftalenu v acetonu (5,4 mg/g, n=6) a 50 µl roztoku naftalenu ve slunečnicovém oleji (5,4 mg/g, n=8). Komůrky byly ponechány bez okluze.

Tab. 3. 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: Legenda: AP - aritmetický průměr; VSO - výběrová směrodatná odchylka; MED - medián; MIN - nejnižší hodnota; MAX – nejvyšší hodnota

Tab. 4. 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

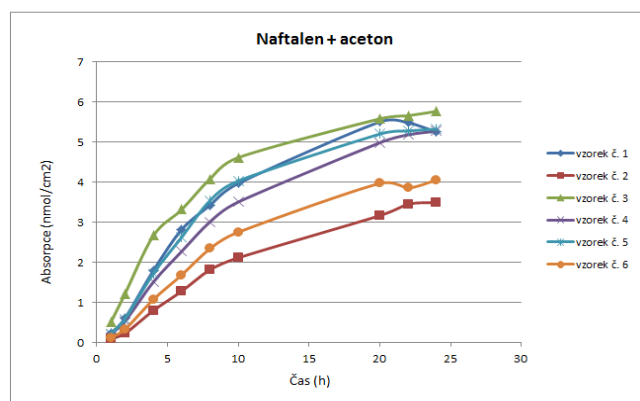
Legenda: Legenda: AP - aritmetický průměr; VSO - výběrová směrodatná odchylka; MED - medián; MIN - nejnižší hodnota; MAX – nejvyšší hodnota

Receptorová tekutina (Hanksův roztok s 4 % BSA a gentamycinem v koncentraci 50 mg/l) byla odebírána v intervalech 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 22 a 24 h. Odebraná RT byla ihned zamrazena při -20°C a všechny vzorky byly následně analyzovány pomocí HPLC s fluorescenční detekcí. Hodnoty fluxu a lag

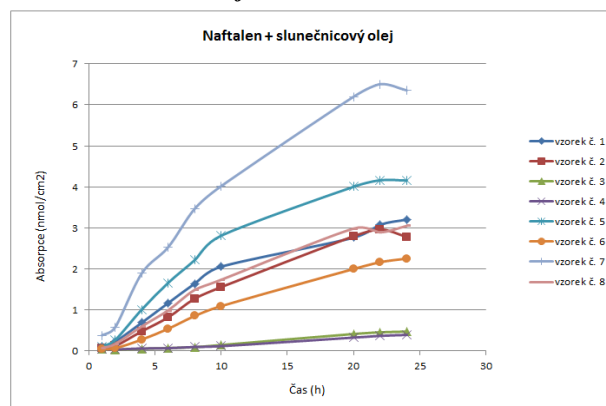
time byly stanoveny pomocí matematického modelu. Parametry transdermální absorpce naftalenu shrnují tabulky 3 a 4, průběh kinetiky absorpce je zobrazen grafy 1 a 2.

Průměrná hodnota veličiny flux při absorpci naftalenu z acetonového roztoku byla $0,468 \pm 0,152$ nmol/cm²/h (aritmetický průměr±VSO), při absorpci naftalenu z olejového roztoku $0,212 \pm 0,155$ nmol/cm²/h. Průměrná hodnota veličiny lag time při absorpci naftalenu z acetonového roztoku byla $0,75 \pm 0,33$ h (aritmetický průměr±VSO), při absorpci naftalenu z olejového roztoku $2,07 \pm 1,50$ h. Statisticky významný rozdíl byl nalezen pouze u veličiny flux ($p = 0,010$). V případě veličiny lag time byla hladina statistické významnosti $p = 0,059$.

Graf 1. Kinetika transdermální absorpce naftalenu v acetonu



Graf 2. Kinetika transdermální absorpce naftalenu ve slunečnicovém oleji



Legenda: jednotlivé křivky zachycují průběh transdermální penetrace na individuálních vzorcích kůže

7.2.3 Fáze III. Transdermální absorpce směsí PAU (vliv formy aplikace)

S ohledem na kapacitu zařízení mohly být v jednom experimentu testovány maximálně čtyři zástupci PAU. Polyaromáty byly aplikovány ve stejných koncentracích individuálně i ve směsi. Testovány byly směsi ve složení (1) naftalen, fenantren, pyren, benzo[a]pyren a (2) fluoren, fluoranten, antracen a benz[a]antracen. Látky byly vybírány podle jejich toxikologické významnosti a podle míry jejich zastoupení v reálných směsích PAU.

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

Na donorovou část epidermis bylo separátně aplikováno 100 μ l acetonového roztoku fenantrenu (2,8 mg/g; n=6), naftalenu (5,4 mg/g; n=6), pyrenu (0,95 mg/g; n=6) a benzo[a]pyrenu (0,45 mg/g; n=6). Obdobně byla aplikována i směs PAU (n=6), která obsahovala výše uvedené PAU ve stejných koncentracích, jako při jejich individuálním (separátním) podání. Všechny komůrky byly ponechány bez okluze. Receptorová tekutina byla u naftalenu odebírána v intervalech ½, 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 směsí PAU byly odběry v intervalech ½, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 20, 24, 28, 44, 52, 68, 72, 76 h. Odebrané vzorky byly ihned zamrazeny při -20°C a následně analyzovány pomocí HPLC s fluorescenční detekcí. Hodnoty flux a lag time byly stanoveny pomocí matematického modelu Iteration Tool. Výsledky shrnuje tabulka 5.

Tab. Porovnání fluxu a lag time při individuální a směsné aplikaci jednotlivých testovaných zástupců PAU

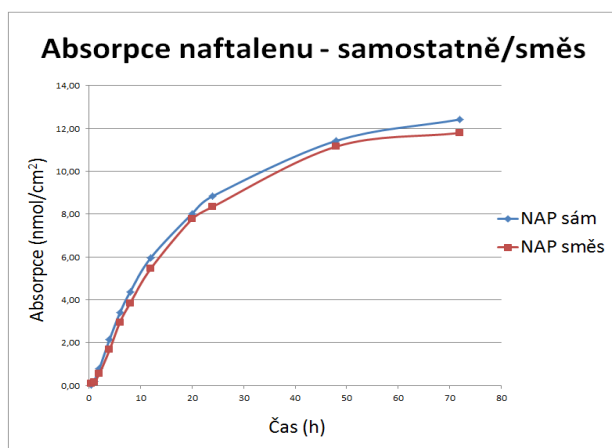
PAU	Molekulární hmotnost	Flux (nmol/cm ² /h)			Statistická významnost (p)	Lag time (h)			Statistická významnost (p)
		Individuální aplikace (IA)	Aplikace směsí (AS)	AS/IA		Individuální aplikace (IA)	Aplikace směsí (AS)	AS/IA	
Naftalen	128,17	0,639±0,583 (n=6)	0,530±0,315 (n=6)	0,83	0,86±0,65 (n=6)	0,98±1,06 (n=6)	1,14	0,824	
Fluoren	166,20	0,042±0,032 (n=6)	0,041±0,026 (n=5)	0,98	8,14±8,10 (n=6)	7,00±1,77 (n=5)	0,86	0,768	
Fenantren	178,23	0,298±0,209 (n=6)	0,149±0,104 (n=6)	0,50	14,87±5,49 (n=6)	16,88±6,06 (n=6)	1,14	0,560	
Antracen	178,24	0,035±0,017 (n=6)	0,014±0,007 (n=5)	0,40	16,97±2,55 (n=6)	34,12±6,59 (n=5)	2,01	0,0002**	
Fluoranten	202,26	0,117±0,123 (n=6)	0,054±0,031 (n=5)	0,46	28,77±9,97 (n=6)	37,93±4,22 (n=5)	1,32	0,089	
Pyren	202,26	0,137±0,091 (n=6)	0,034±0,027 (n=6)	0,25	30,78±7,15 (n=6)	33,11±4,05 (n=6)	1,08	0,506	
Benz[<i>a</i>]antracen	228,29	0,0058±0,0082 (n=6)	0,0005±0,0003 (n=5)	0,09	37,95±25,02 (n=6)	38,73±4,42 (n=5)	1,02	0,947	
Benzo[<i>a</i>]pyren	252,32	0,0017±0,0012 (n=6)	-	-	50,98±13,28 (n=6)	-	-	-	

Legenda: Jednotlivé polyaromáty jsou řazeny podle zvyšující se molekulové hmotnosti. Hodnoty fluxu a lag time jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem±výběrová směrodatná odchylka. V případě směsné aplikace BaP byla výsledná absorpce pod mezi stanovitelnosti, z toho důvodu flux a lag time nebylo možno stanovit (-). Počet testovaných vzorků (n). Statisticky významné rozdíly označeny * (p<0,05) a ** (p<0,01).

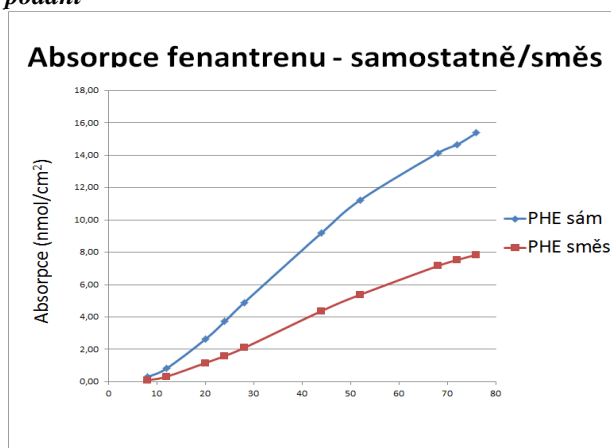
Kinetika transdermální absorpce naftalenu. V případě separátní aplikace naftalenu byla průměrná hodnota veličiny flux $0,639 \pm 0,583$ nmol/cm²/h (aritmetický průměr±VSO), při aplikaci naftalenu ve směsi PAU byla hodnota $0,530 \pm 0,315$ nmol/cm²/h. Rozdíl v hodnotách veličiny flux nebyl statisticky 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 naftalenu ve směsi PAU byla průměrná hodnota veličiny lag time $0,98 \pm 1,06$ h. Rozdíl v hodnotách lag time nebyl statisticky významný ($p = 0,824$). Ovlivnění míry absorpce naftalenu formou aplikace zachycuje Graf 3.

Kinetika transdermální absorpce fenantrenu. V případě separátní aplikace fenantrenu byla průměrná hodnota veličiny flux $0,298 \pm 0,209$ nmol/cm²/h (aritmetický průměr±VSO), při aplikaci fenantrenu ve směsi PAU byla průměrná hodnota veličiny flux $0,149 \pm 0,104$ nmol/cm²/h. Rozdíl v hodnotách veličiny flux nebyl statisticky významný ($p = 0,147$). V případě samostatné aplikace fenantrenu byla průměrná hodnota veličiny lag time $14,87 \pm 5,49$ h (aritmetický průměr±VSO), při aplikaci fenantrenu ve směsi PAU byla průměrná hodnota lag time $16,88 \pm 6,06$ h. Rozdíl v hodnotách lag time nebyl statisticky významný ($p = 0,560$). Ovlivnění míry absorpce fenantrenu formou aplikace zachycuje Graf 4.

Graf 3. Absorpce naftalenu v závislosti na způsobu podání



Graf 4. Absorpce fenantrenu v závislosti na způsobu podání



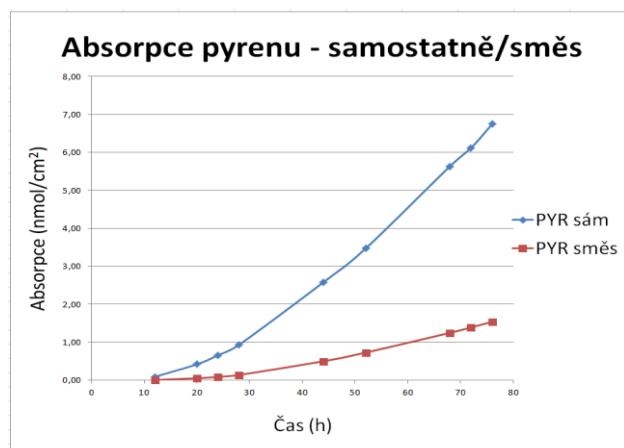
Legenda: jednotlivé křivky zachycují průběh transdermální penetrace na individuálních vzorcích kůže

Kinetika transdermální absorpce pyrenu. V případě separátní aplikace pyrenu byla průměrná hodnota veličiny flux $0,137 \pm 0,091$ nmol/cm²/h (aritmetický průměr±VSO), při aplikaci pyrenu ve směsi PAU byla průměrná hodnota veličiny flux $0,034 \pm 0,027$ nmol/cm²/h. Rozdíl v hodnotách veličiny flux byl statisticky významný ($p = 0,038$). V případě samostatné aplikace pyrenu byla průměrná hodnota veličiny lag time $30,78 \pm 7,15$ h (aritmetický průměr±VSO), při aplikaci pyrenu ve směsi PAU byla průměrná hodnota lag time $33,11 \pm 4,05$ h. Rozdíl v hodnotách lag time nebyl statisticky významný ($p = 0,506$). Ovlivnění míry absorpce pyrenu formou aplikace zachycuje Graf 5.

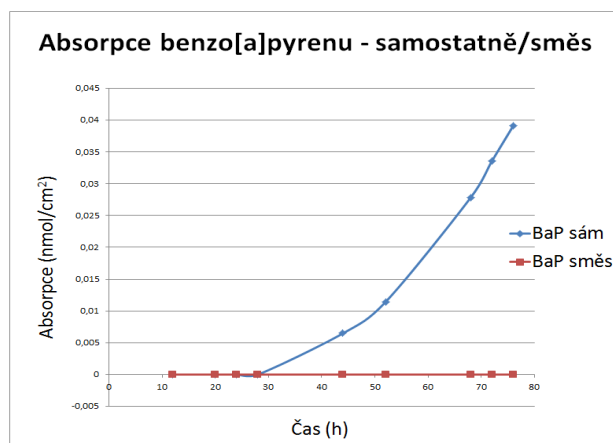
Kinetika transdermální absorpce benzo[a]pyrenu. Absorpce benzo[a]pyrenu probíhala nejpomaleji a dosahovala nejnižších hodnot. V případě aplikace benzo[a]pyrenu ve směsi PAU byla jeho absorpce zanedbatelná a stanovitelné hodnoty koncentrací byly nalezeny (pouze u dvou vzorků) až po 76 hodinách. Z tohoto důvodu nebylo možné stanovit průměrné hodnoty veličin flux a lag time. V případě samostatné aplikace benzo[a]pyrenu byla průměrná hodnota veličiny flux $0,0017 \pm 0,0012$ nmol/cm²/h

(aritmetický průměr±VSO) a průměrná hodnota veličiny lag time $50,98\pm 13,28$ h. Kinetiku absorpce BaP zachycuje graf 6.

Graf 5. Absorpce pyrenu v závislosti na způsobu podání



Graf 6. Absorpce BaP v závislosti na způsobu podání



Legenda: jednotlivé křivky zachycují průběh transdermální penetrace na individuálních vzorcích kůže

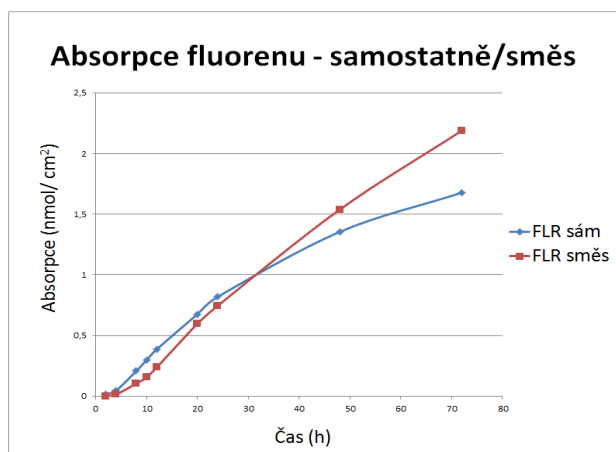
7.2.3.2 Transdermální absorpce fluorenu, fluorantenu, antracenu a benz[a]antracenu

Na donorovou část epidermis bylo separátně aplikováno 100 μ l acetonového roztoku fluorenu (0,95 mg/g; n=6), fluorantenu (1,4 mg/g; n=6), antracenu (0,7 mg/g; n=6) a benz[a]antracenu (0,45 mg/g; n=6). Obdobně byla aplikována i směs PAU (n=6), která obsahovala výše uvedené PAU ve stejných koncentracích, jako při jejich individuálním (separátním) podání. Všechny komůrky byly ponechány bez okluze. Receptorová tekutina (Hanksův roztok se 4 % BSA a gentamycinem v koncentraci 50 mg/l) byla odebírána v intervalech 2, 4, 8, 10, 12, 20, 24, 48 a 72 h. Odebrané vzorky receptorové tekutiny byly ihned zamrazeny při -20°C a následně analyzovány pomocí HPLC s fluorescenční detekcí. Hodnoty flux a lag time byly stanoveny pomocí matematického modelu Iteration Tool. Výsledky shrnuje tabulka 5.

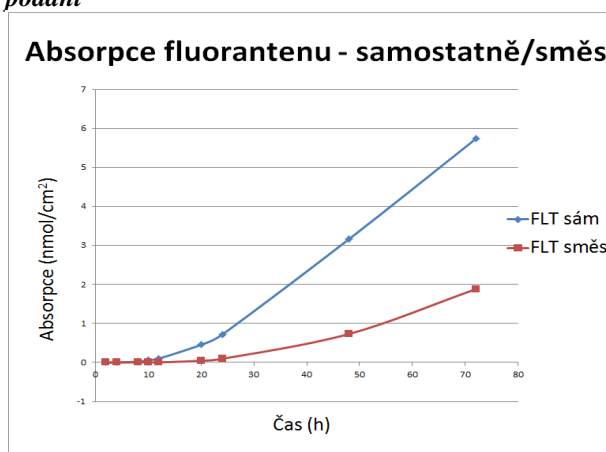
Kinetika transdermální absorpce fluorenu. V případě samostatné aplikace fluorenu byla průměrná hodnota veličiny flux $0,042\pm 0,032$ nmol/cm²/h (aritmetický průměr±VSO), při aplikaci fluorenu ve směsi PAU byla průměrná hodnota veličiny flux $0,041\pm 0,026$ nmol/cm²/h. Rozdíl v hodnotách flux nebyl statisticky významný ($p = 0,935$). V případě samostatné aplikace fluorenu byla průměrná hodnota veličiny lag time $8,14\pm 8,10$ h (aritmetický průměr±VSO), při aplikaci fluorenu ve směsi PAU byla průměrná hodnota veličiny lag time $7,00\pm 1,77$ h. Rozdíl v hodnotách lag time nebyl statisticky významný ($p = 0,768$). Ovlivnění míry absorpce fluorenu formou aplikace zachycuje Graf 7.

Kinetika transdermální absorpce fluorantenu. V případě samostatné aplikace fluorantenu byla průměrná hodnota veličiny flux $0,117\pm 0,123$ nmol/cm²/h (aritmetický průměr±VSO), při aplikaci fluorantenu ve směsi PAU byla průměrná hodnota veličiny flux $0,054\pm 0,031$ 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±VSO), při aplikaci fluorantenu ve směsi PAU byla průměrná hodnota veličiny lag time $37,93\pm 4,22$ h. Rozdíl v hodnotách lag time nebyl statisticky významný ($p = 0,089$). Ovlivnění míry absorpce fluorantenu formou aplikace zachycuje Graf 8.

Graf 7. Absorpce fluorenu v závislosti na způsobu podání



Graf 8. Absorpce fluorantenu v závislosti na způsobu podání

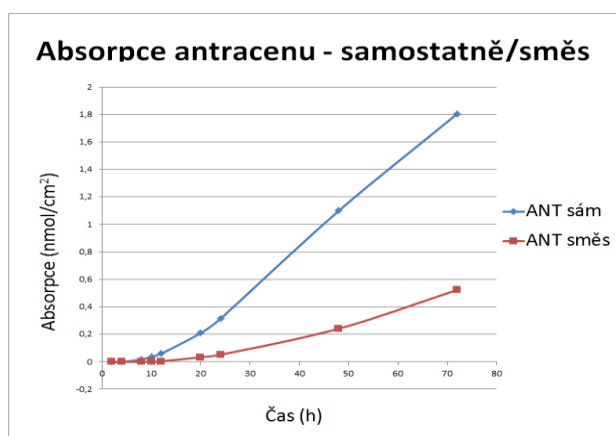


Legenda: jednotlivé křivky zachycují průběh transdermální penetrace na individuálních vzorcích kůže

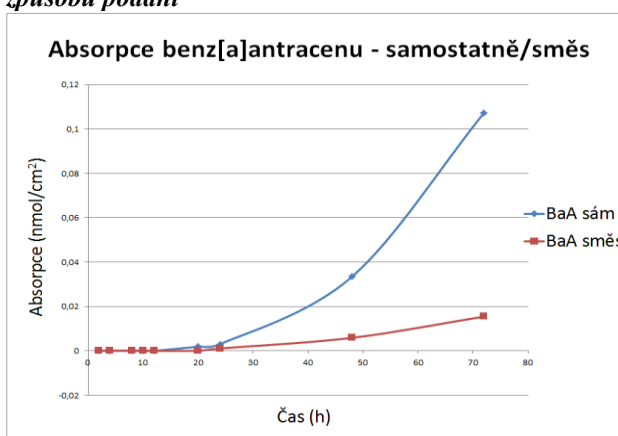
Kinetika transdermální absorpce antracenu. V případě samostatné aplikace antracenu byla průměrná hodnota veličiny flux $0,035 \pm 0,017$ nmol/cm²/h (aritmetický průměr±VSO), při aplikaci antracenu ve směsi PAU byla průměrná hodnota veličiny flux $0,014 \pm 0,007$ nmol/cm²/h. Rozdíl v hodnotách flux byl 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 antracenu ve směsi PAU byla průměrná hodnota veličiny lag time $34,12 \pm 6,59$ h. Rozdíl v hodnotách lag time byl statisticky významný ($p = 0,0002$). Ovlivnění míry absorpce antracenu formou aplikace zachycuje Graf 9.

Kinetika transdermální absorpce benz[a]antracenu. V případě samostatné aplikace benz[a]antracenu byla průměrná hodnota veličiny flux $0,0058 \pm 0,0082$ nmol/cm²/h (aritmetický průměr±VSO), při aplikaci benz[a]antracenu ve směsi PAU byla průměrná hodnota veličiny flux $0,0005 \pm 0,0003$ 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 benz[a]antracenu ve směsi PAU byla průměrná hodnota veličiny lag time $38,73 \pm 4,42$ h. Rozdíl v hodnotách lag time nebyl statisticky významný ($p = 0,947$). Ovlivnění míry absorpce benz[a]antracenu formou aplikace zachycuje Graf 10.

Graf 9. Absorpce antracenu v závislosti na způsobu podání



Graf 10. Absorpce benz[a]antracenu v závislosti na způsobu podání



Legenda: jednotlivé křivky zachycují průběh transdermální penetrace na individuálních vzorcích kůže

8. Diskuse

8.1 Výběr materiálu a metodiky

Vzhledem k důvodu experimentů by bylo ideální použití lidské kůže. To však naráží na etické (informovaný souhlas dárce, schvalování experimentů etickou komisí) i technické problémy (kůže jedinců různého věku a zdravotního stavu, dezinfekce povrchu kůže před odběrem/operací). Z těchto důvodů je výhodné použít zvířecí model. Jako nejvhodnější se jeví použití kůže prasečí (Sekkat 2002), konkrétně kůže zadní plochy ušního boltce prasete domácího, která je nejpodobnější lidské kůži (Jacobi 2007).

Pro testování transdermální penetrace látek jsou na výběr v podstatě dva směry penetrace (vertikální a horizontální) a dva základní typy difúzních komůrek (statická a průtoková). V publikované literatuře převládá vertikální směr penetrace a statické komůrky. Vnitřní průměr naší nádoby (1,5 cm) byl vybrán tak, aby splňoval doporučení Směrnice Evropské komise, která požaduje minimální velikost absorpční plochy $0,64 \text{ cm}^2$ (EU SCCP 2006). Absorpční plocha naší komůrky tak má $1,77 \text{ cm}^2$. Objem akceptorové části byl vybrán 10 ml. Doporučení OECD udává objem receptorové části v rozmezí 2 – 20 ml (OECD 2004a).

Výběr testované látky byl ovlivněn dlouhodobou zainteresovaností Ústavu hygieny a preventivního lékařství LF UK v Hradci Králové na problematiku expozice polycyklickým aromatickým uhlovodíkům. Skupina PAU zahrnuje stovky látek, proto byly vybrány (podle zastoupení dané látky v dehtu a její potenciální zdravotní nebezpečnosti) jen některé (dle rozboru dehtu provedeném v laboratoři Úseku forenzní a klinické toxikologie ÚKBD, FN v Hradci Králové). Námi testovaných osm zástupců PAU (antracen, benz[a]antracen, benzo[a]pyren, fenantren, fluoranten, fluoren, naftalen, pyren) patřilo mezi nejvíce zastoupené PAU v analyzovaném vzorku. Všechny tyto látky se též nachází mezi látkami hodnocenými při monitorování prostředí (ATSDR 1995).

Rozpouštědlem používaným v publikovaných literárních zdrojích zabývajících se transdermální absorpcí PAU in vitro bývá obvykle aceton (Yang 1986, Ng 1992, Moody 1995, Sartorelli 1998, 1999, 2001) nebo etanol (Payan 2008). Tato rozpouštědla však vzhledem k lipofilicitě PAU nejsou jejich obvyklým médiem v reálném životě (např. PAU v ropě, minerálních olejích a vazelině v průmyslu; masťový základ Unguentum leniens při Goeckermanově terapii lupénky). Vzhledem k možnosti srovnání námi získaných výsledků s publikovanou literaturou, rozhodli jsme se v našich experimentech též používat jako rozpouštědlo aceton. Ke zjištění předpokládané odlišnosti absorpce při jeho použití ve srovnání s reálnou situací při léčbě lupénky dehtovou pastou (vzniklou rozmícháním terapeutického kamenouhelného dehtu v Unguentum leniens) jsme se rozhodli provést souběžné testy absorpce vybraných PAU při použití acetonu nebo slunečnicového oleje jako rozpouštědla (slunečnicový olej tvoří 50 % Unguentum leniens); (MZ ČR 2009).

Výběr receptorové tekutiny byl ovlivněn typem testované látky. Pro test validace metodiky s použitím kofeinu byl v souladu s literaturou jako receptorová tekutina použit fyziologický roztok (Duracher 2009). Složení vhodné receptorové tekutiny pro testy absorpce PAU bylo vybráno podle práce Ng a kol. (Ng 1992). Základem této tekutiny je Hanksův roztok. Vzhledem k tomu, že PAU jsou látky lipofilní ($\log K_{o/w} > 3$), bylo třeba přidat další nefyziologický roztok umožňující jejich rozpustnost v RT. Podle vzoru dostupné literatury jsme se rozhodli použít 4 % BSA. Protože doba experimentů přesahovala

24 h, bylo též třeba přidat do RT antimikrobiální složku. Stejně jako v práci Ng a kol. (Ng 1992), rozhodli jsme se pro použití gentamycinu v koncentraci 50 mg/l.

Výběr nepoškozeného kožního vzorku k provedení testu dermální absorpce je základním předpokladem pro správné provedení testu. Z možností hodnocení integrity kůže jsme v souladu s literaturou jako nejdůležitější používali vizuální hodnocení vzorků a vyřazení neodpovídajících výsledků, doplněné přístrojovým měřením TEWL (transepidermální ztráty vody) a TER (elektrické rezistence) kožních vzorků. V literatuře jsou popisovány různé hodnoty TEWL kritéria pro použití kožního vzorku v experimentu, většinou se pohybují v rozmezí 2 – 30 g/m²/h. V našich experimentech jsme se rozhodli jako kritérium pro vyřazení kožních vzorků užívat hodnotu TEWL nad 15 g/m²/h, neboť tuto hodnotu (nebo jí podobnou) u stejného typu kůže použili i jiní autoři (např. Duracher 2009, Vallet 2008). Další metodou bylo měření elektrické rezistence kůže (TER). Ani zde neexistuje jedna jasná standardní hodnota udávající použitelnost kožního vzorku (přehled např. Fasano 2002, White 2011). Proto jsme se rozhodli jako vylučující kritérium brát hodnotu 1,57 kΩ/cm², kterou na stejném typu membrány použili Davies a kol. (Davies 2004).

Doba trvání testu transdermální absorpce může být různá, v ideálním případě imituje podmínky reálné situace. Dolní hranice není v podstatě ničím omezena, horní hranice této doby je ale limitována enzymatickou a chemickou degradací kožní bariéry, kterou po 72 h již nelze považovat za intaktní, i když existují i delší studie (Ge 2010). Dalším doporučením je trvání experimentu alespoň po dobu dosažení 2,7 násobku lag time, neboť před touto dobou nedojde k ustavení vyrovnaných (steady state) podmínek (Williams 2003, Selzer 2013). Při testování absorpce polyaromátů byl po vzoru jiných autorů testujících transdermální absorpci PAU (Sartorelli 1998, 1999, Payan 2008) jako doba trvání experimentu zvolen interval 72 hod.

K hodnocení absorpce jsme se rozhodli kůži považovat za jednolitou membránu (Selzer 2013), kdy k výpočtům základních parametrů absorpce (flux a lag time) se používá pouze analýza receptorové tekutiny. Pro snadnější a přesnější výpočty fluxu a lag time jsme sestrojili automatický počítačový model Iteration tool, který eliminuje možné chyby vznikající při hodnocení fluxu a lag time pouze odečtem z grafu absorpční křivky (Niedorf 2008).

8.2 Výsledky experimentů

Validace metodiky – test transdermální absorpce kofeinu

Ověření správné funkce našeho modelu pro testování transdermální absorpce látek bylo provedeno pomocí dermální absorpce 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 2004b).

Základem pro validaci našeho modelu byla práce Duracher a kol. (Duracher 2009), v níž jsou uvedeny hodnoty fluxu (4,90±2,10 µg/cm²/h) a lag time (1.1±0.5 h) kofeinu pro námi užívanou plnou kůži prasečího ušního boltce. Hodnoty sledovaných parametrů odhadnuté z našeho validačního experimentu činí 6,85±2,99 µg/cm²/h (flux), resp. 2,03±1,27 h (lag time) a lze je tedy považovat za srovnatelné s daty výše uvedenými a námi zavedená metodika tedy je schopna generovat spolehlivá data.

Námi získaná data jsou i v souladu s rozsáhlou studií provedenou van de Sandtem a kol. (van de Sandt 2004). V diskutované práci se průměrné hodnoty fluxu kofeinu (aplikovaná koncentrace 4 mg/ml,

objem $25 \mu\text{l}/\text{cm}^2$) pro plnou lidskou kůži pohybují v rozmezí $0,46\text{--}2,83 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Námi vypočtená hodnota nalezená pro 5x vyšší aplikovanou koncentraci kofeinu v donorové tekutině (týž objem donorové tekutiny na cm^2 kůže) činí $6,85 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, náš odhad fluxu je tedy cca 5x vyšší. Odhady lag time se v diskutované práci pro plnou lidskou kůži pohybují v rozmezí hodnot 1,7–5,2 h. Námi nalezená hodnota (2,03 h) potom leží v uvedeném rozmezí. Ani srovnání s prací van de Sandta tedy nezpochybnilo spolehlivost námi dosažených výsledků v rámci validace metodiky.

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 laboratořích Úseku forenzní a klinické toxikologie ÚKBD FN Hradec Králové metodou GC-MS. Vzhledem k nákladům spojeným s využíváním tohoto analytického systému a s ohledem na jeho vytížení v podmínkách fakultní nemocnice, jsme odběry receptorové tekutiny omezili na intervaly 12, 24, 48 a 72 hod. Odhad parametrů absorpce (flux a lag time) byl prováděn standardním postupem (proložení experimentálních dat přímkou).

Hodnota lag time pyrenu (při použití acetonu jako rozpouštědla) se pohybovala na hladině 15,4 h (v testech vlivu rozpouštědla), resp. 14,4 h (v testech vlivu koncentrace aplikované dávky). 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. 5). V úvodních studiích byly k odhadům hodnot parametrů fluxu a lag time k dispozici pouze čtyři experimentální body z odběrů v rozmezí 12–72 hod. 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 hodin. 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 však 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 je defektní povrch kůže ošetřován dehtovou pastou. Běžně je používána 3–5% dehtová pasta (5% dehtová pasta obsahuje $0,95 \text{mg}$ pyrenu/g pasty); (Borská 2006). Masťový 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 expozičních) nenalezli žádné informace. Jak bylo výše uvedeno, jako rozpouštědlo se obvykle užívá aceton. Ten ale může při dlouhodobém působení poškozovat bariérové funkce SC (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/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 (rozpuštědlo aceton). Vzorky receptorové tekutiny byly odebírány v intervalech 12, 24, 48, a 72 h a analyzovány pomocí GC-MS. Byly získány hodnoty fluxu a lag time pro tři koncentrační úrovně pyrenu. Bylo poněkud překvapivé, že rozdíly v hodnotách fluxu nebyly významné. Rozdíl mezi nejvyšší (pro střední koncentraci) a nejnižší (pro nejvyšší koncentraci) hodnotou 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 (což je okem hůře zachytitelný jev). Velikost dávky potom určuje tloušťka této vrstvy a patrně i velikost částic penetrantu „vypadlého“ z roztoku. Pokud je povrch kůže (po odpaření rozpouštědla) 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).

V prvé studii 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 $\text{nmol}/\text{cm}^2/\text{h}$ (pro koncentraci pyrenu 0,95 mg/g) a 0,0150 $\text{nmol}/\text{cm}^2/\text{h}$ (pro koncentraci 9,5 mg/g). V případě slunečnicového oleje se pohybovaly na úrovních 0,0088 $\text{nmol}/\text{cm}^2/\text{h}$ (pro koncentraci 0,95 mg/g) a 0,0119 $\text{nmol}/\text{cm}^2/\text{h}$ (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.

Experiment srovnávající absorpci PAU v závislosti na rozpouštědle (aceton vs. minerální olej) publikovali Sartorelli a kol. (Sartorelli 1999). V jejich experimentu použití acetonu vedlo k významně vyšší absorpci pyrenu, oproti olejovému rozpouštědлу byla zhruba desetkrát vyšší. V souladu s výsledky studie Sartorelli a kol. byly i v našich experimentech ve všech případech nalezeny vyšší hladiny absorpce

pyrenu u acetonového media (pohybovala se 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, který obsahuje 14-40 % kyseliny olejové (MZ ČR 2009), jež je známa jako akcelerátor transdermální penetrace (např. Singh 2010).

V druhé 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). 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. Uplatňovat se však může rezervoárový efekt kůže. Hlavním proteinem epidermis je 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). 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). Lze předpokládat, že vyšší koncentrace aplikované látky vede k rychlejšímu nasycení rezervoárové kapacity kůže.

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 kůží proniká nejsnáze.

Na kůži bylo aplikováno vždy 50 μ l donorového roztoku (koncentrace 5,4 mg/g rozpouštědla; jako rozpouštědlo použit aceton a slunečnicový olej), což představuje dávku naftalenu 0,95 μ mol/cm² (roztok v acetonu), resp. 1,07 μ mol/cm² (roztok ve slunečnicovém oleji). V případě acetonového rozpouštědla byla průměrná hodnota flux 0,468 \pm 0,152 nmol/cm²/h, při použití olejového roztoku byla 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, byla úroveň absorpce testované látky výrazně menší a pomalejší při použití slunečnicového oleje 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 1999). V případě naftalenu byla Sartorellim a kol. na kůži (z opičího břicha) aplikována dávka 160 nmol/cm² v acetonu nebo v minerálním oleji. Pro aceton byla nalezena hodnota flux 1,011 nmol/cm²/h a lag time 1,18 h a pro syntetický olej hodnota flux 0,274 nmol/cm²/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 Frasche a kol. (Frasch 2007). Autoři studovali dermální absorpci naftalenu z tuhé substance. K experimentům užívali dermatomovanou

kůži (ze zad prasete) 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 nmol/cm²/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 (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 difúzním koeficientem polyaromátu v daném prostředí, ale i jeho vazbou na proteiny kůže (difundovat může pouze volná frakce polyaromátu).

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 molekulární hmotností testovaného polyaromátu. U polyaromátů s nejmenší molekulární 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 ze 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 31%) 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 kůže projde za jednotku času). Tento efekt byl obecně tím výraznější, čím větší byla molekulární hmotnost polyaromátu. 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 neomezené dávce), 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, stávající databáze informací (Flynn 1990, Kirchner 1997) PAU neobsahují. 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.

9. Závěr

Pro testování transdermální absorpce látek *in vitro* byla zvolena metodika používající vertikální statickou difúzní komůrku dle Franze. Jako absorpční membrána v testovací soupravě byla užitá 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).

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 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 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.

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.

Experimenty s dermálními expozicemi PAU budou na Ústavu hygieny a preventivního lékařství Lékařské fakulty UK v Hradci Králové pokračovat hodnocením celkového profilu testovaných látek (tzv. total recovery) a následnými odhady maximálních absorpcí vybraných zástupců PAU. Údaje přispějí k dalšímu zpřesňování základních charakteristik transdermální absorpce PAU pro účely hodnocení (odhadů) zdravotních rizik. Stávající databáze informací o dermálních absorpcích látek informace o dermální kinetice (absorpci) PAU neobsahují (Flynn 1990, Kirchner 1997).

10. Použitá literatura

- ATSDR. *Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons* [online]. c1995 [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.pdf>>.
- 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.
- 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 regimen. *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.
- BOUWSTRA, J. A. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog Lipid Res*, 2003, vol. 42, no. 1, s. 1-36.
- 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.
- 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.
- 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>>.
- 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>.
- 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.
- 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.
- 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
- 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.
- FRUM, Y. Towards a correlation between drug properties and in vitro transdermal flux variability. *Int J Pharm*, 2007, vol. 336, no. 1, s. 140-147.
- GE, L. The viability change of pigskin in vitro. *Burns*, 2010, vol. 36, no.4, s. 533-538.
- GUO, Y. Sources, distribution, and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Environ Health*, 2011, vol. 73, no. 9, s. 22-25.
- HANSEN, S. An extended database of keratin binding. *J Pharm Sci*, 2011, vol. 100, no. 5, s. 1712-1726.
- HARDING, C. R. The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatologic Therapy*, 2004, vol. 17, s. 6-15.
- 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>>.
- 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.
- JACOBI, U. Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Skin Res Technol*, 2007, vol. 13, no. 1, s. 19-24.
- 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.
- KIRCHNER, L. A. The prediction of skin permeability by using physico-chemical data. *ATLA*, 1997, vol. 25, s. 359–370.
- 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.
- 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.
- 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.
- MZ ČR. *Český lékopis 2009*. Praha: Grada, 2009. 3968 s., CD-ROM. ISBN 978-80-247-2994-7.
- 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.
- 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.
- NISHIFUJI, K. The stratum corneum: the rampart of the mammalian body. *Vet Dermatol*, 2013, vol. 24, no. 1, s. 60-72.
- 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/>>
- OECD. *OECD Guideline for Testing of Chemicals - Guideline 428 : Skin Absorption: In Vitro Method* [online]. c2004b [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-428-skin-absorption-in-vitro-method_9789264071087-en>.
- 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.
- PONEC, M. Lack of desquamation - the Achilles heel of the reconstructed epidermis. *Int J Cosmet Sci*, 2002a, vol. 24, no. 5, s. 263-272.
- PROKSCH, E. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*, 2008, vol. 17, no. 2, s. 1063-1072.
- ROMONCHUK, W. J. Permeation of 4-cyanophenol and methyl paraben from powder and saturated aqueous solution through silicone rubber membrane and human skin. *J Pharm Sci*, 2006, vol. 95, no. 11, s. 2526-2533.
- 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.
- 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.
- SELZER, D. Finite and infinite dosing: difficulties in measurements, evaluations and predictions. *Adv Drug Deliv Rev* 2013, vol. 65, no. 2, s. 278-294.
- SINGH, I. Percutaneous penetration enhancement in transdermal drug delivery. *Asian J Pharm*, 2010, vol. 4, s. 92-101.
- 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.
- 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.

- 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.
- WALTER, D. Standardized investigation of percutaneous absorption of bitumen emission in humans. *J Occup Environ Hyg*, 2007, vol. 4, no. S1, s. 144-153.
- 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>>.
- WILLIAMS, A. C. *Transdermal and topical drug delivery*. 1. vydání, 2003. London: Pharmaceutical Press. 256 s. ISBN 0 85369 489 3.
- 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.
- ZÁRUBA, F. *Dermatovenerologie*. 1. vydání, 1994. Praha: Scientia medica s.r.o, 248+32 s. ISBN 80-85526-31-X.

11. Přehled publikační činnosti autora:

1. Původní vědecké publikace v časopisech s impact factorem

L. Borská, C. Andrýs, J. Krejsek, K. Hamáková, J. Kremláček, D. Ranná, **L. Kotingová**, Z. Fiala: Plasma levels of p53 protein and chromosomal aberrations in patients with psoriasis treated with the Goeckerman regimen. *Clin Exp Dermatol* 34 (8), e881-3 (2009) (**IF = 1,522**)

2. Ostatní publikace v časopisech s impact factorem

L. Kotingová, L. Borská, Z. Fiala: Testování transdermální absorpce chemických látek in vitro. *Chem Listy* 103 (7), 533-539 (2009) (**IF = 0,717**); přehledová práce

3. Původní vědecké práce v časopisech bez IF

L. Kotingová, V. Voříšek, E. Čermáková, L. Borská, Z. Fiala: Vliv koncentrace na transdermální absorpci pyrenu in vitro. *Pracov Lek* 64 (1), 18-22 (2012)

L. Kotingová, V. Voříšek, L. Borská, E. Čermáková, Z. Fiala: Vliv rozpouštědla na dermální absorpci pyrenu in vitro. *Hygiena* 57 (2), 50-55 (2012)

D. Ranná, L. Borská, J. Šmejkalová, **L. Kotingová**, J. Kremláček, H. Tamchynová: Příspěvek k hodnocení zdravotního rizika profesionální expozice polycyklickým aromatickým uhlovodíkům (PAU). *Hygiena* 57 (3), 84-88 (2012)

J. Karbanová, J. Mokřý, **L. Kotingová**: Neural stem cells transplanted into brains as neurospheres form solid grafts composed of neurons, astrocytes and oligodendrocyte precursors. *Biomed Papers* 148 (2), 217-220 (2004)

4. Monografie

5. Ostatní publikace v časopisech bez IF

6. Přednášky, plakátová sdělení na odborných setkáních:

Přednášky:

L. Kotingová, A. Bezrouk, Z. Fiala: Hodnocení rizikových faktorů vybraných civilizačních onemocnění. XIX. vědecká konference LF UK HK a FN HK, Hradec Králové, 21. ledna 2015

-(Abstrakt ve Sborníku XIX. vědecké konference LF UK HK a FN HK; dostupné na:

<https://www.lfhk.cuni.cz/Veda,-zahranici/Vedecka-setkani/Konference-LF-a-FN/Archiv-vedeckych-konferenci/>)

L. Kotingová: Transdermal absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons. 10th Postgraduate Medical Student Conference, Hradec Králové, 20. 10. 2014

L. Kotingová, A. Bezrouk, L. Šišpera, Z. Fiala – Transdermální absorpce polycyklických aromatických uhlovodíků in vitro. 29. *Teisingerův den průmyslové toxikologie*, Praha, 10. 6. 2014, **vyžádaná přednáška**

L. Kotingová, L. Borská, V. Voříšek, E. Čermáková, Z. Fiala: Vliv rozpouštědla na transdermální absorpci pyrenu in vitro. *Životne podmienky a zdravie*, Nový Smokovec, Slovenská republika, 19. - 21. září 2011

L. Kotingová, L. Borská, V. Voříšek, E. Čermáková, Z. Fiala: Transdermální absorpce pyrenu in vitro. *Životné podmienky a zdravie*, Štrbské Pleso, Slovenská republika, 20. – 22. 9. 2010

L. Borská, K. Hamáková, C. Andrýs, J. Krejsek, D. Ranná, **L. Kotingová**, J. Kotlandová, M. Heidová, J. Kremláček, Z. Fiala: Genotoxický a mutagenní efekt Goeckermanovy metody léčby psoriázy u dětí. *X. hradecké pediatrické dny*, Hradec Králové, 21. – 22. 11. 2008. Abstrakt ve sborníku: X. pediatrické pediatrické dny – Program a sborník abstrakt. Nucleus HK, Hradec Králové, 2008, ISBN: 978-80-87009-57-4

Plakátová sdělení:

L. Kotingová, L. Šišpera, A. Bezrouk, L. Borská, Z. Fiala: Transdermal absorption of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. *14-th PPP Conference*, La Grande Motte, Francie, 22.-25. 4. 2014. Vyšlo ve sborníku *Abstracts of presentations at the Fourteenth Interantional Perspectives in Percutaneous Penetration Conference held in La Grande Motte April 2014*, ISBN 978 0948917 48 6. Abstrakt: *Perspectives in Percutaneous Penetration*, Vol. 14, 2014, p. 104, ISBN 978 0948917 48 6

L. Kotingová, V. Voříšek, E. Čermáková, L. Borská, Z. Fiala: Možnosti ovlivnění mechanismu transdermální penetrace látek. *Hygiena a preventivní medicína v teorii a praxi*. Plzeň, 15. září 2011

L. Borská, Z. Fiala, K. Hamáková, C. Andrýs, J. Krejsek, D. Ranná, **L. Kotingová**, J. Kremláček: Sérové hladiny p53 proteinu a SFASL po Goeckermanovy terapii psoriázy. *XXV. sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů*, Praha, 29.10. – 1. 11. 2008
Abstrakt v časopise *Alergie* 10 (Suppl. 2) 148 (2008)