

TRANSEPIDERMÁLNÍ ABSORPCE POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ

TRANS-EPIDERMAL ABSORPTION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS

ANDREA MÁLKOVÁ¹, LENKA KOTINGOVÁ¹, ROMAN KANDĎÁR², MARTINA ŠPRYNCOVÁ²,
LENKA ANDRLOVÁ², ALEŠ BEZROUK³, LENKA BORSKÁ⁴, RENATA KOHLEROVÁ⁵,
ZDENĚK FIALA¹

¹Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Ústav hygieny a preventivního lékařství, Hradec Králové

²Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra biologických a biochemických věd, Pardubice

³Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Ústav lékařské biofyziky, Hradec Králové

⁴Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Ústav patologické fyziologie, Hradec Králové

⁵Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Ústav lékařské biochemie, Hradec Králové

SOUHRN

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) představují skupinu významných kontaminantů pracovního i životního prostředí. Při expozici PAU v pracovním prostředí se vedle inhalační expoziční cesty může významně uplatňovat i expozice dermální. Stávající experimentální údaje o intenzitě a rychlosti penetrace látek do systémové cirkulace jsou zatím omezené. Předkládaný článek se zabývá metodickou a interpretační problematikou transepidermální absorpce PAU *in vitro*.

Byla sledována intenzita (Flux) a rychlost (Lag time) penetrace naftalenu, fenantrenu, pyrenu a benzo[a]pyrenu přes epidermální membránu z prasečího boltce. Experiment byl prováděn ve vertikálních statických difúzních komůrkách dle Franze ($n = 32$) a jako rozpouštědlo byl použit isopropyl-myristát. Parametr Flux ($\text{nmol}/\text{cm}^2/\text{hod}$) dosáhl hodnot $95,7 \pm 45,5$ u naftalenu, $19,5 \pm 8,7$ u fenantrenu, $4,38 \pm 1,98$ u pyrenu a $0,21 \pm 0,08$ u benzo[a]pyrenu. Parametr Lag time (hod) hodnot $0,26 \pm 0,17$ u naftalenu, $2,12 \pm 0,41$ u fenantrenu, $3,25 \pm 0,50$ u pyrenu a $11,2 \pm 4,08$ u benzo[a]pyrenu. Hodnota parametru Flux klesala s molární hmotností PAU, zatímco hodnota parametru Lag time s molární hmotností PAU stoupala. Množství PAU, které za daný časový úsek penetrovalo přes epidermální membránu, se pohybovalo mezi 0,24 % (benzo[a]pyren) až 0,84 % (fenantren) aplikované dávky. Penetrace PAU přes epidermální membránu vykazovala, v porovnání s experimenty na plné kůži, nižší stupeň variability dat.

Z výsledků vyplývá, že použití epidermální membrány by mohlo zpřesňovat jak odhad vnitřní dávky PAU po dermální expozici, tak i odhad souvisejícího zdravotního rizika v rámci konzervativního expozičního scénáře. Experimenty s epidermální membránou jsou však časově i experimentálně náročné, bez možnosti objektivní kontroly integrity epidermální membrány, což může vést k finanční náročnosti testování, ztrátám vzorků a v neposlední řadě i k nárůstu rozdílu hodnot dat, získaných v různých laboratořích.

Klíčová slova: polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) – dermální absorpce, epidermální membrána, experimenty

SUMMARY

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a group of significant contaminants in the occupational and living environment. In addition to the inhalation route of exposure in the occupational environment, there is also significant the dermal route of exposure. Existing experimental data on the intensity and rate of penetration of these substances into systemic circulation are still limited. The presented paper is focused on methodological and interpretative issues of trans-epidermal absorption of PAHs *in vitro*.

In this study, we assessed the intensity (Flux) and rate (Lag time) of penetration of naphthalene, phenanthrene, pyrene and benzo[a]pyrene through the epidermal membrane derived from a pig ear. The experiment was performed using static vertical Franz diffusion cells ($n = 32$) and isopropyl myristate was used as a solvent. Flux ($\text{nmol}/\text{cm}^2/\text{hour}$) reached 95.7 ± 45.5 in the case of naphthalene, 19.5 ± 8.7 of phenanthrene, 4.38 ± 1.98 of pyrene and 0.21 ± 0.08 of benzo[a]pyrene. Lag time (hour) was 0.26 ± 0.17 in the case of naphthalene, 2.12 ± 0.41 of phenanthrene, 3.25 ± 0.50 of pyrene and 11.2 ± 4.08 of benzo[a]pyrene. The Flux value decreased with the molecular weight of PAHs, while the Lag time increased with the molecular weight of PAHs. The amount of PAHs that penetrated through the epidermal membrane in a given time period ranged between 0.24% (benzo[a]pyrene) and 0.84% (phenanthrene) of the applied dose. The penetration of PAHs through the epidermal membrane showed a lower degree of data variability compared to full thickness skin experiments.

The results suggest that the use of the epidermal membrane could define more accurately both the estimation of the internal dose of PAHs after dermal exposure and the estimation of the associated health risk within a conservative exposure scenario. However, experiments with using the epidermal membrane are time consuming and experimentally demanding, with no option of an objective control of the integrity of the epidermal membrane, which can lead to costly testing, loss of samples and, finally, an increase in the differences in data values obtained in different laboratories.

Key words: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) – dermal absorption, epidermal membrane, experiments

<https://doi.org/10.21101/hygiena.a1700>

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) představují skupinu všudypřítomných škodlivin s prokázanou orgánovou toxicitou, imunosupresivitou, genotoxicitou a karcinogenitou (1, 2). Téměř vždy se vyskytují ve směsích a jejich hlavním zdrojem bývá spalování organické matrice, spojené s přírodními a antropogenními činnostmi (2, 3).

Inhalace je pravděpodobně majoritní expoziční cestou pro vstup PAU do organismu, nicméně významné mohou být i absorpce perorální a dermální. V životním prostředí převažují expozice inhalační (kontaminované ovzduší) a perorální (kontaminované potraviny a kontaminovaná pitná voda), v pracovním prostředí pak kombinace expozice inhalační a dermální (4).

Některé epidemiologické studie z pracovního prostředí připisují dermální expozici stejný nebo dokonce i vyšší expoziční potenciál, v porovnání s expozicí inhalační. Dnes již klasické práce z prostředí koksárenských pracovníků uvádějí, že až 75 % z celkově absorbované dávky pyrenu může být v tomto prostředí přijato transdermálně (5). Podobné závěry vyplynuly i z inhalačně-dermálního experimentu na dobrovolnících, exponovaných živčným výparům a aerosolu. Přibližně 50–60 % z celkově absorbovaného pyrenu, chrysenu a antracenu bylo během tohoto experimentu absorbováno transdermálně (6).

Z toxikologického hlediska představuje kůže významnou bránu vstupu škodlivin do organismu, jejíž celková plocha u dospělého člověka se pohybuje mezi 1,5 až 2,3 m². Jejími základními vrstvami jsou epidermis, dermis a hypodermis (7). Epidermální membrána je tvořena všemi vrstvami epidermis, tedy čtyřmi až pěti vrstvami: stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum, (stratum lucidum) a stratum corneum (7). Svrchní vrstva epidermis (stratum corneum) je bohatá na lipidy a její hmotu tvoří především ceramidy (45–50 %) a látky s cholesterolovou strukturou (přibližně 25 %). Dalšími složkami jsou volné mastné kyseliny (10–15 %) a ostatní lipidy, z nichž významnou roli zaujímá zejména cholesterol-sulfát (8).

Ostatní vrstvy epidermis jsou tvořeny vodným prostředím s enzymatickou aktivitou (9). S ohledem na lipofilní charakter PAU lze předpokládat, že v epidermis budou tyto látky intenzivněji prostupovat ve vrstvě strata cornea. Ve vodném prostředí ostatních vrstev epidermis lze (v důsledku lipofility PAU) očekávat prostup pomalejší. Důležitým faktem je skutečnost, že ve vodném prostředí epidermis dochází k biotransformaci PAU, při které vznikají reaktivní intermediáty a volné radikály (bioaktivace), které mohou dále reagovat s makromolekulárními složkami tkání organismu (proteiny, DNA a RNA).

Na hranici mezi epidermis a dermis se nachází subpapilární arteriální a venózní pletěň. V situaci kdy je tato pletěň dilatovaná, pronikají molekuly PAU a jejich metabolitů přes cévní stěny do systémové cirkulace a dále do tělních tkání (10). Zde pokračuje jejich biotransformace, včetně pochodů bioaktivačních (11). V případech kdy je subpapilární pletěň ve vazokonstrikci, procházejí PAU a jejich metabolity přes dermis až do oblasti podkožní cévní pletěně a teprve zde vstupují do systémové cirkulace.

OECD guideline (Organisation for Economic Co-Operation and Development) doporučuje pro testování dermální penetrace látek *in vitro* dva modely, plnou kůži a epidermální membránu (12). Pro odhad množství PAU, které transdermálně proniklo do systémové cirkulace (a následně do tkání), je významným údajem odhad množství (PAU), které prostoupilo epidermis a dosáhlo hranice mezi epidermis a dermis (primární kontakt se subpapilární arteriální a venózní pletení). Většina experimentů popisovaných v odborné literatuře je však založena na testování míry penetrace látek přes plnou kůži, prezentovanou komplexem epidermis, dermis a hypodermis (dosažení systémové cirkulace až v oblasti podkožní cévní pletěně). Je zřejmé, že testovací model s plnou kůží představuje, v porovnání s modelem samotné epidermis, výrazně silnější bariéru, která zpomaluje rychlost a intenzitu prostupu PAU do systémové cirkulace (2, 13).

Tloušťka lidské plné kůže se pohybuje v závislosti na lokalizaci mezi 0,4 až 4 mm, zatímco tloušťka lidské epidermis se pohybuje mezi 75 až 150 µm. Tloušťka epidermis prasečího boltce se pohybuje mezi 60 a 85 µm (průměr 72 µm) (14). Na tloušťku plné kůže má vliv i přesnost její preparace od pod ní ležících struktur. V případě použití epidermální membrány je vliv preparace poměrně dobře potlačen.

V experimentech *in vitro* je míra a rychlost penetrace látek přes kožní bariéru vyjadřována veličinami Flux a Lag time. Flux představuje množství látky, které projde přes jednotkovou plochu kožní bariéry za jednotku času (nmol/cm²/hod), Lag time je doba za kterou se testovaná látka objeví v receptorové tekutině (látka prošla přes kožní bariéru a dosáhla oblastí cirkulace) (15).

Předkládaný článek se zabývá metodickou a interpretační problematikou transepidermální absorpce PAU *in vitro*. Rámcově je článek zaměřen na silné a slabé stránky experimentálního modelu epidermální membrány a na diskusi, týkající se vhodnosti uvedeného postupu pro zpřesňování odhadu rychlosti a intenzity prostupu PAU do systémové cirkulace (pro účely odhadu vnitřní dávky PAU).

Metodika

Epidermální membrána

V experimentech byla použita epidermální membrána z dorzální strany ušního boltce prasete domácího, která je považována za vhodnou náhradu lidské epidermální membrány (2, 16). Nespárené ušní boltce byly získány v místních jatkách a zpracovány během 24 hodin od usmrcení zvířete (do laboratoře byly transportovány na ledu). Boltce byly omyty vlažnou (tekoucí) vodou a ostříháním zbaveny viditelných chlupů. Skalpelem a pinzetou byla na dorzální straně boltce odpreparována kůže od chrupavky. Z částí kůže bez viditelného poškození (exkoriace, erytém) byly nastříhány vzorky 4 × 4 cm, které byly ihned na dvě minuty ponořeny do destilované vody o teplotě 61 °C (17). Po vyjmutí z lázně byly ze vzorků odpreparovány epidermální membrány o tloušťce okolo 70 µm, zabaleny do tenké hliníkové folie a do doby zpracování (do 24 hodin) uskladněny při 4 °C.

Dosud nebyly stanoveny hodnoty objektivních parametrů integrity epidermální membrány, analogické

k parametrům integrity plné nebo dermatomované kůže, jako je například transepidermální ztráta vody (transepidermal water loss; TEWL) nebo změny kožního odporu (transdermal electrical resistance; TER), a proto bylo posouzení zachování integrity epidermální membrány pouze vizuální.

Testované PAU

V experimentu byly testovány naftalen, fenantren, pyren a benzo[a]pyren (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo). Na povrch vzorků epidermální membrány byly aplikovány ve formě přesycených roztoků (maximální dávky), připravovaných postupným rozpouštěním příslušného uhlovodíku ve dvou mililitrech isopropyl-myristátu (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo). Rozpouštění probíhalo za laboratorní teploty s použitím laboratorní třepačky (1 500 rpm, 2 min; třepačka Benchmark, Edison, USA). Takto připravené donorové roztoky byly uchovávány do doby aplikace (do 24 hod) v temnu při laboratorní teplotě. Bezprostředně před aplikací (analýzou) byly donorové roztoky odstředěny ve skleněných kónických zkumavkách (650 × g, 10 min; Hettich, Rotina 380, Německo) a supernatant byl zfiltrován přes teflonový filtr o porozitě 0,2 μm.

Expoziční zařízení a odběry vzorků receptorové tekutiny

V experimentu byly použity 10 ml vertikální statické difuzní komůrky dle Franze (obr. 1), vybavené magnetickým míchadlem (18). Vzorky epidermální membrány byly vkládány do horní části komůrky, zatímco spodní část komůrky byla naplněna receptorovou tekutinou (4% albumin v PBS s přidavkem 1 % penicilinu a streptomycinu). V experimentu byl použit bovinní sérový albumin (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo), penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo) a PBS pufr (Merck, Darmstadt, Německo). Absorpční plocha vzorku epidermální membrány byla omezena výřezem v horní části komůrky a činila 1,77 cm².

V souladu s požadavky European Food and Safety Authority (EFSA) (19) a European Commission – Scientific Committee on Consumer Safety (SCCP) (20) byly v jednotlivých pokusech použity epidermální membrány od čtyř dárců. Každý PAU byl testován ve vícenásobném opakování (2–3) na čtyřech různých vzorcích epidermálních membrán (celkem 10 komůrek pro každý PAU). Před aplikací donorového roztoku byly komůrky s membránami temperovány 60 min ve vodní lázni z důvodu zajištění jejich hydratace a teploty 32 ± 1 °C.

Na povrch membrán bylo aplikováno 100 μl příslušného donorového roztoku (experiment byl prováděn bez okluze). Receptorová tekutina byla v pravidelných intervalech odebírána injekční stříkačkou (jehla 0,8 × 120 mm; objem stříkačky 2 ml) přes boční raménko ve spodní části komůrky. Pro každou komůrku byla použita nová jehla i stříkačka. Při každém odběru bylo odebráno 0,6 ml receptorové tekutiny, která byla ihned zamrzána na –20 °C v tmavých skleněných „vialkách“. Odebraný objem tekutiny byl nahrazen stejným objemem čisté receptorové tekutiny. V komůrkách testujících absorpci naftalenu, fenantrenu a pyrenu byly odběry prováděny v časech 10 min, 30 min, 1 hod, 4 hod a 24 hod od aplikace donorového roztoku. V komůrkách testujících benzo[a]pyren byly odběry prováděny

v časech 1 hod, 4 hod, 22 hod, 26 hod a 48 hod od aplikace donorového roztoku.

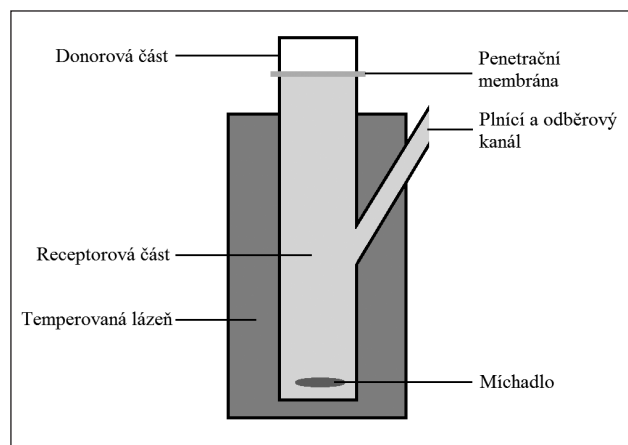
Analýza vzorků receptorové tekutiny

Koncentrace testovaných PAU ve vzorcích receptorové tekutiny byly stanoveny vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s fluorescenční detekcí. Chromatografické analýzy byly provedeny na kapalinovém chromatografu Shimadzu (Kjóto, Japonsko), složeného z čerpadla LC-20AD, opatřeného čtyřcestným nízkotlakým ventilem a vakuovým odplyňovačem DGU-20A5, autosampleru SIL-20AC, termostatu kolon CTO-20AC, fluorescenčního detektoru RF-20AXL a řídicího systému CBM-20A. Pro řízení, záznam a vyhodnocení dat byl použit software LC-solution.

Pro přípravu vzorků bylo použito odmaštěné skleněné laboratorní nádobí (pro odmaštění byl použit 5% roztok hydroxidu sodného v methanolu) a 1,5 ml polypropylenové zkumavky Eppendorf PP-3810X (Eppendorf AG, Hamburk, Německo).

Zásobní roztoky naftalenu (10 mg/25 ml), fenantrenu (13 mg/25 ml), pyrenu (15 mg/50 ml) a benzo[a]pyrenu (9 mg/25 ml) byly připraveny rozpuštěním jednotlivých PAU v acetonitrilu pro HPLC (Merck, Darmstadt, Německo). Stabilita roztoků umožňovala jejich použitelnost po dobu jednoho týdne (skladování při 4 °C). Pracovní roztoky byly připraveny ředěním zásobních roztoků 50% roztokem acetonitrilu v destilované vodě. Standardy pro sestavení kalibračních křivek byly připraveny ředěním pracovních roztoků receptorovou tekutinou. Vzorky standardů a kontrolní vzorky byly zpracovány a analyzovány obdobně jako dále popsané vzorky receptorové tekutiny.

Odebrané vzorky receptorové tekutiny byly skladovány při teplotě –20 °C. Před zpracováním byly temperovány na laboratorní teplotu (30 min) a následně po dobu dvou minut třepány intenzitou 1 500 rpm (třepačka Benchmark, Edison, USA). Do polypropylenových zkumavek (1,5 ml) bylo pipetováno 20 μl vzorku receptorové tekutiny a 1 000 μl acetonitrilu. Obsah zkumavky byl promíchán na laboratorní třepačce (Heidolph, REAX Control, Německo; 30 s) a inkubován 30 minut při laboratorní teplotě. Poté byl obsah zkumavky odstředěn (Hettich, Rotina 380, Německo; 11 290 × g, 20 min, 22 °C) a 300 μl supernatantu bylo přeneseno do insertu šroubovací „vialky“ s teflonovým septem.



Obr. 1: Schéma vertikální statické difuzní komůrky dle Franze.

Sledované PAU byly separovány na koloně Nucleodur 100-3 C18 ec, 125 × 3 mm, 3 μm (Macherey-Nagel, Düren, Německo) při 25 °C za použití gradientové eluce. Mobilní fáze A byla směs acetonitrilu a vody (25:75, v/v), mobilní fáze B byl 100% acetonitril s pří-

pravkem koncentrované kyseliny octové (100:0,2, v/v). Objem dávkovaného vzorku byl 10 μl, průtok mobilní fáze byl 0,6 ml/min. PAU byly monitorovány fluorescenčním detektorem, koncentrace byly určeny z kalibrační křivky (tab. 1).

Zpracování dat

Základní statistické výpočty byly provedeny v programu MS Excel 2013. K výpočtu charakteristik absorpce (Flux a Lag time) z experimentálních dat byl použit námi vytvořený počítačový program SAMPa (21).

Výsledky

Experiment byl prováděn ve 40 komůrkách (10 komůrek pro každý testovaný PAU). Pro výpočet míry a rychlosti penetrace látek přes kožní bariéru bylo možné využít údaje celkem z 32 komůrek (naftalen 7, fenanthren 8, pyren 10, benzo[a]pyren 7). Ostatní data musela být vyřazena, neboť extrémní výše jejich hodnot svědčila o skrytém poškození epidermální membrány, které nebylo možno před experimentem zjistit vizuálně.

Jak vyplývá z tabulky 2, koncentrace přesycených roztoků testovaných PAU v isopropyl-myristátu se vlivem rozdílné rozpustnosti snižovaly s molekulovou hmotností uhlovodíků od 1 099 mmol/l (naftalen) do 55,9 mmol/l (benzo[a]pyren). Množství PAU v objemu 100 μl takto připravených roztoků (aplikovaných na povrch membrány) se pohybovalo od 109 900 nmol naftalenu do 5 590 nmol benzo[a]pyrenu.

Tab. 1: Parametry HPLC analýzy

Naftalen		Fenanthren	
λ (excitace)	275 nm	λ (excitace)	248 nm
λ (emise)	330 nm	λ (emise)	370 nm
0,01 min	48 % B	0,01 min	48 % B
5,00 min	48 % B	5,00 min	48 % B
10,00 min	92 % B	25,00 min	92 % B
15,00 min	92 % B	28,00 min	92 % B
15,01 min	48 % B	28,50 min	48 % B
20,00 min	STOP	38,00 min	STOP
Pyren		Benzo[a]pyren	
λ (excitace)	270 nm	λ (excitace)	248 nm
λ (emise)	390 nm	λ (emise)	410 nm
0,01 min	48 % B	0,01 min	48 % B
5,00 min	48 % B	5,00 min	48 % B
17,00 min	92 % B	25,00 min	92 % B
22,00 min	92 % B	28,00 min	92 % B
22,01 min	48 % B	28,50 min	48 % B
26,00 min	STOP	38,00 min	STOP

Tab. 2: Parametry transepidermální absorpce PAU

		Naftalen	Fenanthren	Pyren	Benzo[a]pyren
Donorový roztok	PAU (mmol/l)	1 099	635	246	55,9
	PAU v aplikované dávce 100 μl (nmol)	109 900	63 500	24 600	5 590
	PAU v aplikované dávce 100 μl (nmol/cm ²)	62 090	35 876	13 898	3 158
Receptorová tekutina	Počet vzorků (doba odběru)	n = 7 (24 h)	n = 8 (24 h)	n = 10 (24 h)	n = 7 (48 h)
	PAU-penet (nmol)	AP	861,3	533,1	128,2
		VSO	521,2	216,9	60,4
		MED	709,0	496,1	136,3
		Min	196,0	222,1	34,9
		Max	1 647,1	801,8	249,9
		% AD	0,78	0,84	0,52
Flux (nmol/cm ² /hod)	AP	95,7	19,5	4,38	0,21
	VSO	45,5	8,7	1,98	0,08
	MED	94,0	15,8	4,38	0,18
	Min	30,7	10,2	1,34	0,13
	Max	157,8	33,5	8,28	0,34
Lag time (hod)	AP	0,26	2,12	3,25	11,20
	VSO	0,17	0,41	0,50	4,08
	MED	0,32	2,13	3,26	9,53
	Min	0	1,38	2,46	7,32
	Max	0,44	2,84	4,21	17,20

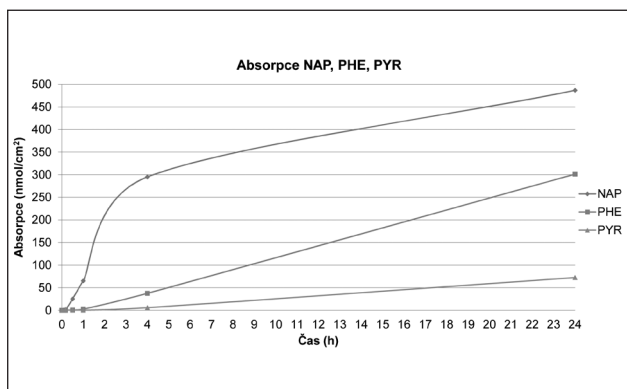
PAU-penet – množství PAU, které penetrovalo přes membránu za daný časový úsek; AP – aritmetický průměr; VSO – výběrová směrodatná odchylka; MED – medián; Min – minimum; Max – maximum; % AD – množství aplikované dávky (%), které za daný časový úsek penetrovalo přes membránu

Množství PAU nalezené v receptorové tekutině (PAU-penet) charakterizovalo celkové množství PAU, které penetrovalo přes membránu za zvolené časové úseky (naftalen, fenantren a pyren 24 hod, benzo[a]pyren 48 hod). Toto množství (aritmetický průměr/medián) se snižovalo s rostoucí molekulovou hmotností od 861,3/709,0 nmol naftalenu do 13,5/12,4 nmol benzo[a]pyrenu. Průběh transepidermální absorpce sledovaných látek je zachycen na obrázcích 2 a 3. Uvedená množství PAU, nalezená v receptorové tekutině (PAU-penet), představovala 0,24 % (benzo[a]pyren) až 0,84 % (fenantren) aplikované dávky (100 μ l roztoku).

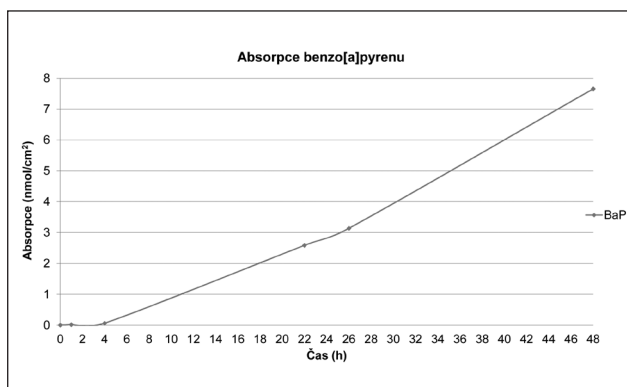
Množství látky, které prošlo přes jednotkovou plochu kožní bariéry za jednotku času (flux; aritmetický průměr/medián), se snižovalo s rostoucí molekulovou hmotností od 95,7/94,0 nmol/cm²/hod (naftalen) do 0,21/0,18 nmol/cm²/hod (benzo[a]pyren). Doba, za kterou PAU procházely přes kožní bariéru a dosahovaly oblastí cirkulace (lag time; aritmetický průměr/medián), se naopak s jejich rostoucí molekulovou hmotností prodlužovala od 0,26/0,32 hod (naftalen) do 11,2/9,53 hod (benzo[a]pyren).

Diskuse

Popsaný experiment byl prováděn na epidermální membráně, kterou jsme odebrali z dorzální strany ušního boltce prasete. Kůže ušního boltce prasete je svou strukturou blízká kůži lidské a je považována za její vhodnou experimentální náhradu (14). Lze ji poměrně snadno získat a její použití je z etického hlediska méně komplikované než použití kůže lidské.



Obr. 2: Průběh transepidermální absorpce naftalenu (NAP; $n=7$), fenantrenu (PHE; $n=8$) a pyrenu (PYR; $n=10$).



Obr. 3: Průběh transepidermální absorpce benzo[a]pyrenu ($n=7$).

Jako vhodné rozpouštědlo pro přípravu donorového roztoku ve vodě špatně rozpustných látek (např. PAU) bývá v literatuře uváděn aceton (2, 22, 23) nebo ethanol (24). Implementace takto získaných výsledků do oblasti reálných dermálních expozic (převážně v pracovním prostředí) je však poněkud diskutabilní, protože aceton ani ethanol nepatří k běžným matricím s vyšším obsahem PAU. Běžnými matricemi bývají minerální oleje, maziva, ropné meziproducty a odpady a dehtové výrobky. Kamenouhelný (farmaceutický) dehet v masťovém základu „unguentum leniens“ je používám i v dermatologii (2). Z uvedených důvodů jsme pro přípravu donorového roztoku použili v našem experimentu metodu US-Environmental Protection Agency (US-EPA), která k dermálnímu testování látek špatně rozpustných ve vodě (kam patří i PAU) doporučuje jako rozpouštědlo isopropyl-myristát (25).

Experiment popisuje dermální penetraci nekonečné (maximální) dávky několika vybraných PAU. Nutnou podmínkou pro aplikaci nekonečné dávky je stav, kdy přes membránu penetruje méně než 10 % z nabídnuté dávky (26). Vzhledem k tomu, že v našem experimentu penetrovalo přes membránu maximálně 0,84 % nabídnuté dávky, lze podmínku scénáře nekonečné dávky považovat za splněnou.

Je známo, že vyhodnocení dat z dermálních experimentů může být zatíženo chybami ve výpočtech hodnot Flux a Lag-time v důsledku nerespektování dosažení pseudo-ustáleného stavu (pseudo-steady-state). Pro redukci/eliminaci tohoto rizika bývá doporučována doba trvání experimentu delší než 2,7 násobek průměrné hodnoty Lag time (27). Z uvedeného důvodu jsme pro naftalen, fenantren a pyren zvolili délku experimentu 24 hod a pro benzo[a]pyren délku 48 hod. Průměrné hodnoty Lag time se u naftalenu, fenantrenu a pyrenu pohybovaly mezi 0,26 až 3,25 hod. Po jejich vynásobení výše uvedeným násobkem 2,7 dostáváme hodnoty 0,7 až 8,8 hod. Průměrná hodnota Lag time benzo[a]pyrenu byla 11,2 hod, po vynásobení násobkem 2,7 dostáváme hodnotu 30,2 hod. Je zřejmé, že v obou případech (24 hod, resp. 48 hod) byla splněna podmínka dosažení pseudo-ustáleného stavu.

Při zhodnocení variability množství jednotlivých PAU v isopropyl-myristátu, které penetrovalo přes epidermální membránu za daný časový úsek (PAU-penet), jsme zjistili, že variační koeficient (VK; podíl výběrové směrodatné odchylky VSO a průměru hodnot; %) PAU-penet dosahoval hodnot 61 % u naftalenu, 41 % u fenantrenu, 47 % u pyrenu a 33 % u benzo[a]pyrenu. Míra rozptylu parametrů Flux a Lag time dosahovala hodnot 48 % a 65 % u naftalenu, 45 % a 19 % u fenantrenu, 45 % a 15 % u pyrenu a 38 % a 36 % u benzo[a]pyrenu. V našich předchozích dermálních experimentech, které byly zaměřeny na penetraci jednotlivých PAU a směsí PAU v acetonu přes plnou kůži (28), dosáhl variační koeficient PAU-penet hodnot 36 % u naftalenu, 82 % u fenantrenu, 107 % u pyrenu a 51 % u benzo[a]pyrenu. V případě testování směsi čtyř PAU (naftalen, fenantren, pyren a benzo[a]pyren) dosahoval VK PAU-penet hodnot 63 % u naftalenu, 84 % u fenantrenu a 94 % u pyrenu (koncentrace benzo[a]pyrenu ve směsi PAU se nacházela pod mezí detekce). Z uvedeného vyplývá, že experimenty prováděné na membráně vykazují (s výjimkou naftalenu) nižší variabilitu PAU-penet.

Průměrné hodnoty parametru Flux ($\text{nmol}/\text{cm}^2/\text{hod}$) v prezentované studii, prováděné na epidermální membráně z prasečího ucha, dosahovaly úrovně $95,7 \pm 45,5$ u naftalenu, $19,5 \pm 8,7$ u fenanthrenu, $4,38 \pm 1,98$ u pyrenu a $0,21 \pm 0,08$ u benzo[a]pyrenu. Průměrné hodnoty parametru Lag time (hod) dosahovaly úrovně $0,26 \pm 0,17$ u naftalenu, $2,12 \pm 0,41$ u fenanthrenu, $3,25 \pm 0,50$ u pyrenu a $11,2 \pm 4,08$ u benzo[a]pyrenu. Hodnota parametru Flux klesala s molární hmotností PAU, zatímco hodnota parametru Lag time s molární hmotností PAU rostla. Jinými slovy, rychlost a intenzita dermální penetrace sledovaných PAU klesala s rostoucí relativní molekulovou hmotností. Podobné trendy popisují i ostatní autoři (22, 28, 29). Z uvedeného je zřejmé, že v prostředí s difuzní kinetikou pronikající molekuly a s omezenou přítomností aktivních transportních mechanismů hraje relativní molekulová hmotnost látky významnou úlohu. Tento fenomén platí zejména u homologických řad organických sloučenin se stejným obecným vzorcem, což byla v našem případě homologická řada PAU. V obecném pojetí se však na rychlosti a intenzitě penetrace podílí řada dalších faktorů, jako je například struktura molekuly, charakter substituentů nebo povrchový náboj.

V odborné literatuře jsme našli jen velmi omezené množství informací o experimentálních penetracích PAU přes epidermální membránu, se kterými bychom mohli porovnávat naše výsledky. Sartorelli a kol. sledovali dermální penetraci osmi PAU, mezi nimi i naftalenu, fenanthrenu a pyrenu, přes plnou kůži kočkodana obecného (29). Jako rozpouštědlo byl použit aceton. Experiment byl prováděn bez okluze a bylo při něm aplikováno $147,5 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ naftalenu, $11,5 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ fenanthrenu a $8,8 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ pyrenu, tedy dávky mnohonásobně nižší, než které byly použity v našem experimentu s prasečí epidermální membránou ($62\,090$, $35\,876$ a $13\,898 \text{ nmol}/\text{cm}^2$). Autoři našli hodnoty parametru Lag time naftalenu $2,17 \pm 3,80$ hod (VK 175 %), fenanthrenu $12,39 \pm 5,05$ hod (VK 41 %) a pyrenu $17,41 \pm 8,25$ hod (VK 47 %). Porovnáme-li tyto hodnoty s našimi výsledky uvedenými v předchozím odstavci, zjistíme, že doba průchodu plnou kůží byla zhruba osmkrát delší u naftalenu, šestkrát delší u fenanthrenu a pětkrát delší u pyrenu. Rozptyl hodnot Lag time byl přitom zhruba dvakrát až třikrát vyšší v případě experimentu na plné kůži. Při těchto úvahách si však musíme být vědomi značných rozdílů v druhu experimentálního zvířete, tloušťce kůže, rozpouštědla a výši aplikované dávky.

V další práci hodnotili Sartorelli a kol. dermální penetraci směsi třinácti PAU, mezi nimi i naftalenu, fenanthrenu, pyrenu a benzo[a]pyrenu přes plnou kůži kočkodana obecného (22). Jako rozpouštědlo PAU byl použit aceton a komerčně dodávaný syntetický motorový mazací olej. Vedle roztoků PAU byl na povrch kůže aplikován též umělý pot pro napodobení podmínek reálných situací v pracovním prostředí. Při experimentu bylo jako součást směsi aplikováno i $160,0 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ naftalenu, $12,1 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ fenanthrenu, $8,3 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ pyrenu a $3,1 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ benzo[a]pyrenu. Opět se tedy jednalo o dávky mnohonásobně nižší, než které byly použity v našem experimentu s prasečí epidermální membránou ($62\,090$, $35\,876$, $13\,898$ a $3\,158 \text{ nmol}/\text{cm}^2$).

Parametr Flux PAU (v acetonu) dosahoval ve výše uvedené práci Sartorelli a kol. (22) hodnot $1,01 \pm 0,40 \text{ nmol}/\text{cm}^2/\text{hod}$ pro naftalen (VK 39 %), $0,03 \pm 0,01$

$\text{nmol}/\text{cm}^2/\text{hod}$ pro fenanthren (VK 28 %), $0,04 \pm 0,041 \text{ nmol}/\text{cm}^2/\text{hod}$ pro pyren (VK 107 %) a $0,0014 \pm 0,0012 \text{ nmol}/\text{cm}^2/\text{hod}$ pro benzo[a]pyren (VK 86 %). Při porovnání těchto dat s našimi výsledky uvedenými v tabulce 2 je zřejmé, že hodnoty parametru Flux v experimentu Sartorelliho a kol. byly o jeden a více řádů nižší. Rozptyl hodnot Flux byl při srovnání s našim experimentem na membráně zhruba dvojnásobný.

Parametr Lag time PAU (v acetonu) dosahoval ve výše uvedené práci Sartorelliho a kol. (22) hodnot $1,18 \pm 0,01$ hod pro naftalen (VK 1 %), $10,95 \pm 7,62$ hod pro fenanthren (VK 70 %), $24,46 \pm 2,68$ hod pro pyren (VK 11 %) a $31,21 \pm 10,81$ hod pro benzo[a]pyren (VK 35 %). Tyto hodnoty sice byly několikanásobně vyšší než naše výsledky, nicméně rozdíly nedosáhly řádových hodnot, tak jak tomu bylo u rozdílů v hodnotách parametru Flux. Rozptyl hodnot Lag time byl při srovnání s našim experimentem na membráně zhruba dvojnásobný.

Parametr Flux PAU dosahoval ve výše uvedené práci Sartorelliho a kol. (22), při použití roztoků PAU v motorovém mazacím oleji, hodnot $0,27 \pm 0,22 \text{ nmol}/\text{cm}^2/\text{h}$ pro naftalen (VK 80 %), $0,006 \pm 0,0035 \text{ nmol}/\text{cm}^2/\text{h}$ pro fenanthren (VK 58 %) a $0,0015 \pm 0,0003 \text{ nmol}/\text{cm}^2/\text{h}$ pro pyren (VK 20 %). Obdobně jako u acetonových roztoků PAU, hodnoty parametru Flux v oleji byly o jeden a více řádů nižší (s obdobným rozptylem jako u acetonových roztoků) než hodnoty v naší prezentované studii na membráně.

Parametr Lag time PAU dosahoval ve výše uvedené práci Sartorelliho a kol. (22), při použití roztoků PAU v motorovém mazacím oleji, hodnot $4,86 \pm 7,99$ hod pro naftalen (VK 164 %), $15,15 \pm 3,10$ hod pro fenanthren (VK 20 %) a $13,38 \pm 8,91$ hod pro pyren (VK 67 %). Absorpce benzo[a]pyrenu byla při použití motorového mazacího oleje pod hranici detekce (22). Je evidentní, že hodnoty byly opět několikanásobně vyšší než naše výsledky, nicméně, obdobně jako u acetonových roztoků, rozdíly nedosahovaly řádových hodnot. Ke všem výše uvedeným porovnáním s prací Sartorelliho a kol. (22) je nutno upozornit na značné rozdíly v podmínkách experimentů, konkrétně na rozdíly v druhu experimentálního zvířete, tloušťce kůže, rozpouštědla a ve výši a formě (individuálně, ve směsi) aplikované dávky PAU.

Kotingová a kol. porovnávali vliv koncentrace donorového roztoku a vliv rozpouštědla (acetonu a slunečnicového oleje) na dermální absorpci pyrenu přes plnou kůži dorzální strany boltce prasečího ucha (2). Pyren v acetonu byl aplikován v koncentracích $209 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ a $2095 \text{ nmol}/\text{cm}^2$, pyren v oleji v koncentracích $235 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ a $2347 \text{ nmol}/\text{cm}^2$. V našem experimentu jsme aplikovali dávku výrazně vyšší $13\,898 \text{ nmol}/\text{cm}^2$.

V experimentu Kotingové a kol. byla po aplikaci acetonového roztoku pyrenu ($209 \text{ nmol}/\text{cm}^2$) nalezena hodnota parametru Flux $0,0192 \pm 0,0181 \text{ nmol}/\text{cm}^2/\text{hod}$ (VK 95 %) a parametru Lag time $15,38 \pm 10,04$ hod (VK 65 %). Po aplikaci pyrenu v oleji ($209 \text{ nmol}/\text{cm}^2$) byla nalezena hodnota parametru Flux $0,0088 \pm 0,0089 \text{ nmol}/\text{cm}^2/\text{hod}$ (VK 101 %) a parametru Lag time $17,36 \pm 13,43$ hod (VK 77 %) (2).

Po aplikaci pyrenu v acetonu ($2095 \text{ nmol}/\text{cm}^2$) byla nalezena hodnota parametru Flux $0,0150 \pm 0,0139 \text{ nmol}/\text{cm}^2/\text{hod}$ (VK 93 %) a parametru Lag time $13,16 \pm 6,37$ hod (VK 48 %). Po aplikaci pyrenu v oleji ($2095 \text{ nmol}/\text{cm}^2$) byla nalezena hodnota parametru Flux

$0,0119 \pm 0,0063 \text{ nmol/cm}^2/\text{hod}$ (VK 50 %) a parametru Lag time $18,09 \pm 10,54 \text{ hod}$ (VK 58 %) (2).

Při porovnání dat experimentu Kotingové a kol. (2), prováděné na plné prasečí kůži, s daty námi prezentovaného experimentu na membráně z prasečí kůže, je zřejmý výrazný pokles hodnoty parametru Flux (o dva až tři řády) a tři až pětinašobný nárůst parametru Lag time u experimentů s plnou kůží. Opět však upozorňujeme na rozdílné podmínky experimentu Kotingové a kol. (2) a prezentovaného experimentu (v tloušťce kůže, rozpouštědle a ve výši aplikované dávky). Rozptyl hodnot parametru Flux pyrenu na plné kůži byl (v porovnání s experimentem na membráně) zhruba dvojnásobný, rozptyl hodnot parametru Lag time byl trojnásobný až pětinašobný. Tato skutečnost naznačuje, že použití membrány (namísto plné kůže) by snad mohlo částečně redukovat rozptyl dat, který s sebou přináší použití kůže z různých oblastí těla od různých jedinců. Oprávněnost této domněnky však bude muset být potvrzena dalšími studiemi.

Experimenty s PAU na epidermální membráně dosud popsány nebyly. Z ostatních látek sledovali Van de Sandt a kol. (30) penetraci insekticidu propoxuru (2-isopropoxyfenyl N-methylkarbamát) přes epidermální membránu získanou z lidské kůže břicha a potkaní kůže zad (Sprague-Dawley rat). Propoxur byl aplikován v 60% vodném ethanolu. Hodnota parametru Flux při použití lidské epidermální membrány byla $4,9 \pm 1,5 \mu\text{g/cm}^2/\text{hod}$ a hodnota parametru Lag time 1,1 hod. Při použití potkaní epidermální membrány byla hodnota parametru Flux $7,2 \pm 1,0 \mu\text{g/cm}^2/\text{hod}$ a parametru Lag time 1,2 hod. Autoři rovněž hodnotili penetraci propoxuru přes plnou lidskou a plnou potkaní kůži. V obou případech byly hodnoty parametru Flux nižší a Lag time vyšší u plné kůže. Hodnota parametru Flux přes plnou lidskou kůži byla $1,7 \pm 0,4 \mu\text{g/cm}^2/\text{hod}$ a parametru Lag time 2,3 hod. V případě potkaní plné kůže byla hodnota parametru Flux $1,0 \pm 0,3 \mu\text{g/cm}^2/\text{hod}$ a parametru Lag time 2,3 hod.

Kanikkannan a kol. (31) hodnotili perkutánní penetraci tryskového paliva (JP-8), které obsahuje i naftalen, přes dermatomovanou kůži prasečího ucha a dermatomovanou lidskou kadaverózní kůži (tloušťka v obou případech 500 μm). Hodnoty parametru Flux naftalenu na obou typech kůže byly srovnatelné, konkrétně $0,3761 \pm 0,0174 \mu\text{g/cm}^2/\text{hod}$ u prasečí kůže a $0,4514 \pm 0,0223 \mu\text{g/cm}^2/\text{hod}$ u kůže lidské. Chilcott a kol. (32) popsali penetraci yperitu přes epidermální membránu z kůže prasečího ucha a lidského břicha. Byla použita maximální/nekonečná dávka (100 mg/cm^2). Parametr Flux dosáhl při použití epidermální membrány z prasečího ucha hodnoty $411 \pm 175 \cdot 10^{-6} \text{ g/cm}^2/\text{hod}$, parametr Lag time hodnoty $5,7 \pm 3,2 \text{ hod}$. V případě epidermální membrány z kůže lidského břicha byla hodnota parametru Flux $157 \pm 66 \cdot 10^{-6} \text{ g/cm}^2/\text{hod}$ a parametru Lag time $5,1 \pm 2,3 \text{ hod}$.

Množství PAU, které dosahuje systémové cirkulace (vnitřní dávka), je při dermální expozici ovlivňováno vazodilatací či vazokonstrikcí subpapilární arteriální a venózní pleteně, která se nachází na hranici mezi epidermis a dermis V situaci kdy je tato pletě dilatovaná, mohou molekuly PAU pronikat do systémové cirkulace. K dilataci v reálném pracovním prostředí dochází vlivem okolní teploty či vlivem fyzické námahy, což mohou být časté pracovní scénáře. Za této situace PAU do-

sahují systémové cirkulace již při primárním kontaktu se subpapilární arteriální a venózní pleteně (tomu odpovídá experimentální model s epidermální membránou) a ne až v oblasti podkožní cévní pleteně (tomu odpovídá experimentální model s plnou kůží).

Závěr

Dermální expozice mohou být významnou branou vstupu látek do organismu. Stávající experimentální údaje o intenzitě a rychlosti penetrace látek do systémové cirkulace jsou však poměrně omezené. Z pohledu standardního odhadu zdravotních rizik dermální expozice PAU, založeného na odhadu množství PAU, které transdermálně pronikne do systémové cirkulace (vnitřní dávky), mohou data zjištěná na modelu plné kůže úroveň rizika do jisté míry podhodnocovat. Pro konzervativní odhady zdravotního rizika, pracujícího s nejvyšší možným, ale ještě reálným expozičním scénářem, by mohl mít vyšší výpovědní hodnotu údaj o množství PAU, které dosáhne primární hranice systémové cirkulace na rozhraní mezi epidermis a dermis (subpapilární arteriální a venózní pletě). Použití kombinace transepidermálních a transdermálních dat by mohlo vést ke snižování nejistot v odhadech souvisejících zdravotních rizik. Pokusy s epidermální membránou jsou však časově i metodicky náročné.

Poděkování

Podpořeno programem UK Progres Q40-09, programem UK SVV-260397/2017 a projektem Vnitřní soutěže Lékařské fakulty UK v Hradci Králové (Zavedení a validace in vitro metody testování transepidermální penetrace polycyklických aromatických uhlovodíků).

LITERATURA

1. IARC. IARC Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risks to Human. Agents Classified by the IARC Monographs. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014.
2. Kotingová L, Voříšek V, Borská L, Čermáková E, Fiala Z. Vliv rozpouštědla na dermální absorpci pyrenu in vitro. Hygiene. 2012;57(2):50-5.
3. Abdel-Shafy HI, Mansour MS. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. Egypt J Pet. 2016 Mar;25(1):107-23.
4. Qu C, Li B, Wu H, Wang S, Giesy JP. Multi-pathway assessment of human health risk posed by polycyclic aromatic hydrocarbons. Environ Geochem Health. 2015 Jun;37(3):587-601.
5. VanRooij JG, Bodelier-Bade MM, Jongeneelen FJ. Estimation of individual dermal and respiratory uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons in 12 coke oven workers. Br J Ind Med. 1993 Jul;50(7):623-32.
6. Walter D, Knecht U. Standardized investigation of percutaneous absorption of bitumen emission in humans. J Occup Environ Hyg. 2007;4 Suppl 1:144-53.
7. Horký D, Čech S. Mikroskopická anatomie. 2. vyd. Brno: Masarykova univerzita; 2011.
8. Madison KC. Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. J Invest Dermatol. 2003 Aug;121(2):231-41.
9. Oesch F, Fabian E, Guth K, Landsiedel R. Xenobiotic-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea

- pig, man, and in human skin models. *Arch Toxicol*. 2014 Dec;88(12):2135-90.
10. Cross SE, Roberts MS. Use of in vitro human skin membranes to model and predict the effect of changing blood flow on the flux and retention of topically applied solutes. *J Pharm Sci*. 2008 Aug;97(8):3442-50.
 11. Nishifuji K, Yoon JS. The stratum corneum: the rampart of the mammalian body. *Vet Dermatol*. 2013 Feb;24(1):60-72. e15-6.
 12. OECD. Guidance notes for the estimation of dermal absorption values. Paris: OECD Publishing; 2008.
 13. Frasch HF, Barbero AM, Alachkar H, McDougal JN. Skin penetration and lag times of neat and aqueous diethyl phthalate, 1,2-dichloroethane and naphthalene. *Cutan Ocul Toxicol*. 2007;26(2):147-60.
 14. Jacobi U, Kaiser M, Toll R, Mangelsdorf S, Audring H, Otberg N, et al. Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Skin Res Technol*. 2007 Feb;13(1):19-24.
 15. Förster M, Bolzinger MA, Fessi H, Briançon S. Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery. *Eur J Dermatol*. 2009 Jul-Aug;19(4):309-23.
 16. Szura D, Ozimek Ł, Przybyło M, Karłowicz-Bodalska K, Jaźwińska-Tarnawska E, Wiela-Hojeńska A, et al. The impact of liposomes on transdermal permeation of naproxen-in vitro studies. *Acta Pol Pharm*. 2014 Jan-Feb;71(1):145-51.
 17. Esposito E, Ravani L, Mariani P, Huang N, Boldrini P, Drechsler M, et al. Effect of nanostructured lipid vehicles on percutaneous absorption of curcumin. *Eur J Pharm Biopharm*. 2014 Feb;86(2):121-32.
 18. Franz TJ. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol*. 1975 Mar;64(3):190-5.
 19. EFSA. Scientific opinion - Guidance on dermal absorption. EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR). EFSA J. 2012;10(4):2665.
 20. Scientific Committee on Consumer Safety. Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients [Internet]. Brussels: European Union; 2010 [cited 2018 Jun 29]. Available from: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_002.pdf.
 21. Bezrouk A, Fiala Z, Kotingová L, Krulichová IS, Kopečná M, Vávrová K. SAMPA: a free software tool for skin and membrane permeation data analysis. *Toxicol in Vitro*. 2017 Oct;44:361-71.
 22. Sartorelli P, Cenni A, Matteucci G, Montomoli L, Novelli MT, Palmi S. Dermal exposure assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons: in vitro percutaneous penetration from lubricating oil. *Int Arch Occup Environ Health*. 1999 Nov;72(8):528-32.
 23. Sartorelli P, Montomoli L, Sisinni AG, Bussani R, Cavallo D, Foà V. Dermal exposure assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons: in vitro percutaneous penetration from coal dust. *Toxicol Ind Health*. 2001 Feb;17(1):17-21.
 24. Payan JP, Lafontaine M, Simon P, Marquet F, Champmartin-Gendre C, Beydon D, et al. In vivo and in vitro percutaneous absorption of [14C]pyrene in Sprague Dawley male rats: skin reservoir effect and consequence on urinary 1-OH pyrene excretion. *Arch Toxicol*. 2008 Oct;82(10):739-47.
 25. EPA. In vitro dermal absorption rate testing of certain chemicals of interest to the occupational safety and health administration. *Federal Register*. 2004 Apr;69(80):22402-41.
 26. Chilcott RP, Price S, editors. Principles and practice of skin toxicology. John Wiley & Sons; 2008.
 27. Williams AC. Transdermal and topical drug delivery: from theory to clinical practice. London: Pharmaceutical Press; 2003.
 28. Kotingová L. Kinetika vybraných látek při dermální expozici (Polycyklické aromatické uhlovodíky) [disertační práce]. Hradec Králové: Univerzita Karlova; 2015.
 29. Sartorelli P, Aprea C, Cenni A, Novelli MT, Orsi D, Palmi S, et al. Prediction of percutaneous absorption from physicochemical data: a model based on data of in vitro experiments. *Ann Occup Hyg*. 1998 May;42(4):267-76.
 30. van de Sandt JJ, Meuling WJ, Elliott GR, Cnubben NH, Hakker BC. Comparative in vitro-in vivo percutaneous absorption of the pesticide propoxur. *Toxicol Sci*. 2000 Nov;58(1):15-22.
 31. Kanikkannan N, Patel R, Jackson T, Shaik MS, Singh M. Percutaneous absorption and skin irritation of JP-8 (jet fuel). *Toxicology*. 2001 Mar 21;161(1-2):1-11.
 32. Chilcott RP, Jenner J, Hotchkiss SA, Rice P. In vitro skin absorption and decontamination of sulphur mustard: comparison of human and pig-ear skin. *J Appl Toxicol*. 2001 Jul-Aug;21(4):279-83.

Došlo do redakce: 25. 6. 2018

Přijato k tisku: 24. 7. 2018

*MUDr. Andrea Málková
Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové
Ústav hygieny a preventivního lékařství
Šimkova 870
500 03 Hradec Králové
Česká republika
E-mail: malka8ar@lfbk.cuni.cz*