

VLIV ROZPOUŠTĚDLA NA DERMÁLNÍ ABSORPCI PYRENU IN VITRO

INFLUENCE OF SOLVENT ON SKIN ABSORPTION OF PYRENE IN VITRO

LENKA KOTINGOVÁ¹, VIKTOR VOŘÍŠEK², LENKA BORSKÁ³, EVA ČERMÁKOVÁ⁴, ZDENĚK FIALA¹

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

²Fakultní nemocnice Hradec Králové, Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Hradec Králové

³Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Ústav patologické fyziologie, Hradec Králové

⁴Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Oddělení výpočetní techniky, Hradec Králové

SOUHRN

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) reprezentují významnou skupinu pracovních i mimopracovních kontaminantů, při expozicích se vedle inhalačního příjmu významně uplatňuje i příjem transdermální. Jedním z typických představitelů skupiny PAU je námi testovaný pyren. Prezentovaná in vitro studie byla zaměřena na vliv nosného média/rozpouštědla (acetonu nebo slunečnicového oleje) na základní charakteristiky transdermálního přestupu pyrenu přes plnou kůži ušního boltce prasete. Experiment byl prováděn ve vertikální statické difuzní komůrce dle Franze. Koncentrace pyrenu v donorové fázi byla 0,00095 g pyrenu/g rozpouštědla a 0,0095 g pyrenu/g rozpouštědla. Koncentrace pyrenu ve vzorcích receptorové tekutiny byla stanovována plynově-chromatografickou analýzou s hmotnostní detekcí. Při použití slunečnicového oleje jako rozpouštědla byla absorpce pyrenu v případě nižší koncentrace donorové fáze $0,04 \pm 0,06$ nmol/cm²/24 h; $0,15 \pm 0,14$ nmol/cm²/48 h a $0,50 \pm 0,58$ nmol/cm²/72 h, hodnota flux $0,0088 \pm 0,0089$ nmol/cm²/h a hodnota lag time $17,36 \pm 13,43$ h. Při použití donorové fáze s vyšší koncentrací byla absorpce pyrenu $0,07 \pm 0,06$ nmol/cm²/24 h; $0,34 \pm 0,25$ nmol/cm²/48 h a $0,63 \pm 0,35$ nmol/cm²/72 h, hodnota flux $0,0119 \pm 0,0063$ nmol/cm²/h a hodnota lag time $18,09 \pm 10,54$ h. Při použití acetonu jako rozpouštědla byla absorpce pyrenu v případě nižší koncentrace donorové fáze $0,02 \pm 0,05$ nmol/cm²/12 h; $0,19 \pm 0,22$ nmol/cm²/24 h; $0,55 \pm 0,59$ nmol/cm²/48 h a $1,17 \pm 1,13$ nmol/cm²/72 h, hodnota flux $0,0192 \pm 0,0181$ nmol/cm²/h a hodnota lag time $15,38 \pm 10,04$ h. Při aplikaci donorové fáze s vyšší koncentrací byla absorpce pyrenu $0,02 \pm 0,02$ nmol/cm²/12 h; $0,09 \pm 0,05$ nmol/cm²/24 h; $0,39 \pm 0,36$ nmol/cm²/48 h a $0,91 \pm 0,81$ nmol/cm²/72 h, hodnota flux $0,0150 \pm 0,0139$ nmol/cm²/h a hodnota lag time $13,16 \pm 6,37$ h. Absorpce pyrenu byla v obou koncentracích donorové fáze vyšší v případě použití acetonového rozpouštědla, statisticky významný byl tento rozdíl pouze u hodnot nalezených po 12 a 24 hodinách u nižší expoziční dávky a po 12 hodinách u expoziční dávky vyšší.

Klíčová slova: expozice polycyklickým aromatickým uhlovodíkům (PAU), polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) - dermální absorpce, pyren

SUMMARY

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) represent an important group of work and nonoccupational contaminants. Pyrene is one of the typical representatives of PAHs. In occupational exposure the inhaled amount of pyrene may be accompanied by a considerable transdermal intake. The presented in vitro experiment was focused on the influence of carrier medium/solvent (acetone or sunflower oil) on the basic characteristics of pyrene transfer through full pig ear skin, using diffusion Franz cells. Pyrene concentration in the donor phase was 0.00095 g pyrene/g solvent and 0.0095 g pyrene/g solvent. Pyrene concentration in the receptor fluid samples was determined by GC-MS. When using sunflower oil as a solvent, the absorptions of pyrene in the case of lower donor phase concentration were 0.04 ± 0.06 nmol/cm²/24 h; 0.15 ± 0.14 nmol/cm²/48 h and 0.50 ± 0.58 nmol/cm²/72 h, flux 0.0088 ± 0.0089 nmol/cm²/h and lag time 17.36 ± 13.43 h. When using a donor phase with higher concentration of pyrene, the absorptions were 0.07 ± 0.06 nmol/cm²/24 h; 0.34 ± 0.25 nmol/cm²/48 h and 0.63 ± 0.35 nmol/cm²/72 h, flux 0.0119 ± 0.0063 nmol/cm²/h and lag time 18.09 ± 10.54 h. When using acetone as the solvent, the absorptions of pyrene in the case of lower donor phase concentration were 0.02 ± 0.05 nmol/cm²/12 h; 0.19 ± 0.22 nmol/cm²/24 h; 0.55 ± 0.59 nmol/cm²/48 h and 1.17 ± 1.13 nmol/cm²/72 h, flux 0.0192 ± 0.0181 nmol/cm²/h and lag time 15.38 ± 10.04 h. When using higher donor phase concentration, the absorptions of pyrene were 0.02 ± 0.02 nmol/cm²/12 h; 0.09 ± 0.05 nmol/cm²/24 h; 0.39 ± 0.36 nmol/cm²/48 h and 0.91 ± 0.81 nmol/cm²/72 h, flux 0.0150 ± 0.0139 nmol/cm²/h and lag time 13.16 ± 6.37 h. The absorption of pyrene was in both donor phase concentrations higher in the case of using acetone solvent, but a statistically significant difference was only found after 12 and 24 hours of exposure at lower doses and after 12 hours of exposure at higher doses.

Key words: exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) - dermal absorption, pyrene

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) představují skupinu všudypřítomných toxických látek. Vyskytují se v životním prostředí (například v ovzduší, vodě, půdě, potravinách a v cigaretovém kouři), v pracovním prostředí (například při zpracování ropy a uhlí, při výrobě železa, oceli, hliníku, koksu, dehtu a sazí) a jsou i součástí některých léčebných terapií (například užití farmaceutického dehtu při Goeckermanově léčbě psoriázy) (1). Některé PAU vykazují karcinogenní a mutagenní potenciál (skupiny 1 a 2A dle IARC) (2) a ovlivňují funkci buněčné i humorální imunity (3–5). Přispívají též k tvorbě aterosklerotických plátů (6) a podporují vznik nádorových (7) i nenádorových plicních onemocnění (8). Indukují a zřejmě i potencují vznik nádorů zažívacího ústrojí (9, 10), močového měchýře (4, 11) a prsu (11, 12). Poškozuji spermiogenezi (13) a negativně ovlivňují těhotenství a vývoj plodu (14, 15). Byly též popsány účinky PAU na nervový systém (16, 17) a naznačena souvislost se vznikem šedého zákalu (18). PAU se v životním nebo pracovním prostředí nevyskytují jednotlivě, ale téměř vždy ve směsích. Standardní součástí těchto směsí je i námi testovaný uhlovodík pyren, který je používán jako ukazatel úrovně expozice PAU (19).

Aplikace nástrojů ochrany veřejného zdraví v oblasti pracovního prostředí výrazně snížila úroveň inhalačních pracovních expozic. To je jeden z hlavních důvodů, proč lze v posledních zhruba dvaceti letech pozorovat zvýšený zájem o studium transdermální cesty vstupu škodlivin do organismu. Epidemiologické i experimentální studie potvrdily, že vedle inhalační cesty vstupu může v řadě expozičních scénářů hrát významnou roli i expozice dermální. Například van Rooij a kol. (20) odhadli, že u některých inhalačně a dermálně exponovaných pracovníků koksáren se podíl dermálně přijaté dávky PAU pohyboval až okolo 75 % dávky celkové. Podobných výsledků dosáhli ve svém inhalačně-dermálním experimentu v laboratorních podmínkách i Walter a Knecht (21), kteří uvedli 50–60% podíl dermální expozice na celkově přijatém množství PAU.

Předkládaná experimentální studie je součástí širšího výzkumu zaměřeného na hodnocení absorpce a účinků dermálně aplikovaných terapeutických přípravků na bázi farmaceutického kamenouhelného dehtu. Farmaceutický kamenouhelný dehet obsahuje významné množství polycyklických aromatických uhlovodíků, jejichž typickým představitelem je i námi vybraný testovaný zástupce – pyren. Cílem naší experimentální studie bylo zjistit vliv nosného média na základní charakteristiky dermální absorpce pyrenu *in vitro*. Jako nosné médium byl vybrán slunečnicový olej (součást mastového základu Unguentum leniens používaného ve farmacii k výrobě dehtové pasty na léčbu psoriázy, jeho vliv na dermální penetraci dosud publikován nebyl). Jako srovnávací nosné médium byl vybrán aceton (jeho „standardní“ použití umožňuje porovnání s publikovanými výsledky jiných autorů) (22–25).

Použité chemické látky

Pyren (CAS číslo 129-00-0, Sigma-Aldrich kat. č. 82648), aceton (CAS číslo 67-64-1, Sigma-Aldrich, kat. č. 34 850), Hanksův roztok (Hanks' Balanced Salt solution, Sigma-Aldrich, kat. č. H8264), bovinní sérový albumin (CAS číslo 9048-46-8, Sigma-Aldrich, kat. č. A9418), gentamicin (CAS číslo 1405-41-0, Sigma-Aldrich, kat. č. G1264), slunečnicový olej (Helianthi oleum raffinatum, standardní lékárenský produkt). Všechny použité chemikálie byly v čistotě vhodné pro fluorescenci, HPLC nebo tkáňové kultury.

Vzorky kůže

Při experimentech byla použita kůže z ušního boltce prasete. Ušní boltce, zakoupené na místních jatkách, byly zpracovány do 24 hodin od usmrcení zvířete. Boltce byly omyty vlažnou tekoucí vodou a ostrháním zbaveny viditelných chlupů. Pomocí chirurgického skalpelu byla odpreparována kůže na zadní straně boltce. Tato kůže byla zabalena do tenké hliníkové fólie a uskladněna při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Takto získané vzorky kůže byly použity v experimentech realizovaných v časovém intervalu maximálně 12 měsíců od data zmrazení.

Struktura experimentu

Vzorky zmrazené kůže byly jeden den před experimentem umístěny do chladničky (cca $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) k šetrnému rozmrazení. V den experimentu byla provedena vizuální kontrola jejich stavu a viditelně poškozené vzorky kůže byly vyřazeny. Vyhovující vzorky byly instalovány do vertikálních statických difuzních komůrek dle Franze (26), epidermální stranou nahoru. Následně byly receptorové části komůrek, vybavené magnetickými míchadly, naplněny receptorovou tekutinou (Hanks' Balanced Salt solution + 4 % bovinního sérového albuminu + gentamicin v koncentraci 50 mg/l). Absorpční plocha kůže v komůrkách byla $1,77\text{ cm}^2$, objem receptorové části komůrky byl 10 ml. V souladu s požadavky OECD (27) a EU (28) byla v jednotlivých prováděných pokusech používána kůže od 3 dárců. Pro testování absorpce pyrenu (za použití různého rozpouštědla a koncentrace) bylo vždy použito nejméně 6 komůrek (minimálně po 2 komůrkách od každého dárce) a celkem 6 negativních kontrol (aplikován pouze aceton nebo olej na kůži každého zvířete). Před vlastní aplikací pyrenu byly komůrky se vzorky kůže umístěny (v nadbytečném počtu) do temperované vodní lázně zajišťující stálou teplotu kožního povrchu v rozmezí $31\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zde byly kožní vzorky hydratovány po dobu 1 hodiny. Po hydrataci byla testována neporušenost vnitřní struktury vzorků. Při testování bylo využito měření elektrického odporu kůže (TER^1 ; přístrojem TECPEL LCR612, Tecpel Co, Taiwan) a měření transepidermální ztráty vody (TEWL^2 ; přístrojem MPA-5, Courage-Khazaka, Německo). Porušené vzorky byly vyřazeny.

Do donorové části komůrky (na zevní plochu epidermis) bylo následně aplikováno 100 μl roztoku pyrenu (donorového vzorku). V experimentu byly použity dvě

¹TER – Transcutaneous Electrical Resistance – kožní elektrický odpor

²TEWL – Transepidermal Water Lost – transepidermální ztráta vody

koncentrace pyrenu. Prvá koncentrace (0,00095 g pyrenu v 1 g rozpouštědla) odpovídala množství pyrenu v 5% dehtové pastě, používané při Goeckermanově terapii. Druhá koncentrace byla 10krát vyšší (0,0095 g pyrenu v 1 g rozpouštědla). Množství pyrenu ve farmaceutickém dehtu bylo stanoveno pomocí GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) (4). Analyzován byl směsný vzorek tvořený pěti náhodně odebranými vzorky farmaceutického kamenouhelného dehtu (lékárna Fakultní nemocnice v Hradci Králové). Směsný vzorek obsahoval 1,9 % pyrenu (1,9 g pyrenu/100 g dehtu).

Testovaná látka byla ponechána bez okluze po celou dobu trvání pokusu. Po 12, 24, 48 a 72 hodinách byly z každé komůrky odebrány 2 ml receptorové tekutiny a ihned zamrazeny na -20°C . Objem komůrky byl následně doplněn novou receptorovou tekutinou. Před posledním odběrem receptorové tekutiny byla opět ověřena neporušenost kůže změřením TER a TEWL. Po 72 hodinách byl pokus ukončen. Práce probíhaly při teplotě $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ a relativní vlhkosti vzduchu 50–60 %.

V odebraných vzorcích receptorové tekutiny byla stanovena koncentrace pyrenu pomocí plynové kapilární chromatografie ve spojení s hmotovým spektrometrem na principu iontové pasti s vnější ionizací a možností skenu MSn (Focus - ITQ 1100, Thermo Fischer Scientific). Před nástřikem byl pyren ze vzorku extrahován dvoustupňově (2 x 5 ml) etylacetátem (PESTANAL, Fluka), centrifugován při 4000 ot/min po dobu 5 min. Supernatant byl dán k vysušení ve vakuové odparce, odparek rekonstituován v n-hexanu (iso-hexanes, PESTANAL, FLUKA) v poměru 190 μl hexanu + 100 μl derivační směsi BSTFA+TMCSi (Sigma-Aldrich). Následovala inkubace při 70°C po dobu 30 min a nástřik 1 μl derivatizované směsi na systém GC-MS. Pro kvantifikaci byla použita metoda izotopového zředění značeným (I.S.-d7) vnitřním standardem (1-naphthol-2,3,4,5,6,7,8-d7, ISOTEC) o výsledné koncentraci 20 ng/ml (1350 μl vzorku + 150 μl I.S.-d7).

Ke statistickému zhodnocení byl použit program NCSS 2007. Vzhledem k malému souboru dat s ne-normálním rozložením byly pro hodnocení užity neparametrické Mann-Whitney test a Kolmogorov-Smirnov test.

Výsledky

Koncentrace pyrenu v receptorové tekutině (ng/ml) byly stanoveny pomocí GC-MS. Po provedení této analýzy byly získány použitelné výsledky z 58 komůrek (u donorového roztoku oleje a pyrenu v nižší a vyšší koncentraci to bylo 13 a 14 komůrek, u donorového roztoku acetonu a pyrenu v nižší a vyšší koncentraci to bylo 15 a 16 komůrek). Použité vzorky pocházely celkem od 14 dárců. Zbývající vzorky nebyly po analýze dále hodnoceny, neboť jejich výsledky dosahovaly hodnot svědčících o skrytém poškození kůže. Z takto získaných dat koncentrace pyrenu byly následně vypočítány hodnoty absorpce pyrenu přes jednotku absorpční plochy (nmol/cm^2), v časových intervalech 12, 24, 48 a 72 hod, průměrná rychlost absorpce (flux; $\text{nmol}/\text{cm}^2/\text{h}$) a průměrná doba potřebná k penetraci pyrenu do receptorové tekutiny (lag time, h).

Nosné médium slunečnicový olej

Po aplikaci donorového vzorku o koncentraci 0,00095 g pyrenu/g slunečnicového oleje (100 μl roztoku, pyren byl v koncentraci 235 nmol/cm^2 , 13 vzorků) nebyl v době prvního odběru (po 12 hodinách) pyren v receptorové tekutině detekován. Při dalších odběrech byly zjištěny hodnoty absorpce $0,04\pm 0,06$ $\text{nmol}/\text{cm}^2/24$ h; $0,15\pm 0,14$ $\text{nmol}/\text{cm}^2/48$ h a $0,50\pm 0,58$ $\text{nmol}/\text{cm}^2/72$ h (tab. 1). Průměrná rychlost absorpce (flux) byla $0,0088\pm 0,0089$ $\text{nmol}/\text{cm}^2/\text{h}$, průměrná doba potřebná k penetraci pyrenu do receptorové tekutiny (lag time) byla $17,36\pm 13,43$ h.

V době prvního odběru (po 12 hodinách) nebyl pyren v receptorové tekutině detekován ani při aplikaci vzorku o vyšší koncentraci 0,0095 g pyrenu/g slunečnicového oleje (100 μl roztoku, pyren byl v koncentraci 2 347 nmol/cm^2 , 14 vzorků). Při dalších odběrech byly zjištěny hodnoty absorpce $0,07\pm 0,06$ $\text{nmol}/\text{cm}^2/24$ h; $0,34\pm 0,25$ $\text{nmol}/\text{cm}^2/48$ h a $0,63\pm 0,35$ $\text{nmol}/\text{cm}^2/72$ h (tab. 1). Průměrná rychlost absorpce (flux) byla $0,0119\pm 0,0063$ $\text{nmol}/\text{cm}^2/\text{h}$, průměrná doba potřebná k penetraci absorbované látky do receptorové tekutiny (lag time) byla $18,09\pm 10,54$ h.

Nosné médium aceton

Po aplikaci donorového vzorku o koncentraci 0,00095 g pyrenu/g acetonu (100 μl roztoku, pyren byl v koncentraci 209 nmol/cm^2 , 15 vzorků) byly zjištěny hodnoty absorpce $0,02\pm 0,05$ $\text{nmol}/\text{cm}^2/12$ h; $0,19\pm 0,22$ $\text{nmol}/\text{cm}^2/24$ h; $0,55\pm 0,59$ $\text{nmol}/\text{cm}^2/48$ h a $1,17\pm 1,13$ $\text{nmol}/\text{cm}^2/72$ h. Průměrná rychlost absorpce (flux) byla $0,0192\pm 0,0181$ $\text{nmol}/\text{cm}^2/\text{h}$ a průměrná doba potřebná k penetraci absorbované látky do receptorové tekutiny (lag time) byla $15,38\pm 10,04$ h (tab. 1).

Při aplikaci vzorku o koncentraci 0,0095 g pyrenu/g acetonu (100 μl roztoku, pyren byl v koncentraci 2 095 nmol/cm^2 , 16 vzorků) byla zjištěna průměrná absorpce $0,02\pm 0,02$ $\text{nmol}/\text{cm}^2/12$ h; $0,09\pm 0,05$ $\text{nmol}/\text{cm}^2/24$ h; $0,39\pm 0,36$ $\text{nmol}/\text{cm}^2/48$ h a $0,91\pm 0,81$ $\text{nmol}/\text{cm}^2/72$ h (tab. 1). Průměrná rychlost absorpce (flux) byla $0,0150\pm 0,0139$ $\text{nmol}/\text{cm}^2/\text{h}$, průměrná doba potřebná k penetraci pyrenu do receptorové tekutiny (lag time) byla $13,16\pm 6,37$ h (tab. 2).

Diskuse

Charakteristiky absorpce pyrenu byly studovány v podmínkách in vitro při penetraci přes kůži ušního boltce prasete. Prasečí kůže je považována za téměř rovnocennou náhradu kůže lidské, jejíž získávání a použití je z etického hlediska komplikované (29). Prakticky ve všech publikovaných experimentech, které popisovaly transdermální absorpci pyrenu in vitro (22–24, 30), byly použity kůže jiných laboratorních zvířat (morče, opice, potkan), které se svými vlastnostmi od kůže lidské (prasečí) značně liší. Výjimku představovala jedna z prací Sartorelli a kol. (25), kdy byla použita kůže lidská v experimentu testujícím penetraci pevných PAU z uhelného prachu.

Ve srovnávaných experimentech nalezených v odborné literatuře byly jako rozpouštědlo (nosné médium) běžně používány aceton (22–25) nebo etanol (30). Obě tato rozpouštědla však nejsou častá v reálném živo-

Tab. 1: Dermální absorpce pyrenu – koncentrace pyrenu 0,00095 g/g média

	Nosné médium		Významnost rozdílů (výsledky olej vs. aceton)
	olej	aceton	p
absorpce po 12 h (nmol/cm ² /12 h)	průměr: 0 medián: 0	průměr: 0,02±0,05 medián: 0	KS = 0,3212 MW = 0,0273*
absorpce po 24 h (nmol/cm ² /24 h)	průměr: 0,04±0,06 medián: 0,04	průměr: 0,19±0,22 medián: 0,09	KS = 0,0189* MW = 0,0203*
absorpce po 48 h (nmol/cm ² /48 h)	průměr: 0,15±0,14 medián: 0,14	průměr: 0,55±0,59 medián: 0,26	KS = 0,0646 MW = 0,1588
absorpce po 72 h (nmol/cm ² /72 h)	průměr: 0,50±0,58 medián: 0,31	průměr: 1,17±1,13 medián: 0,39	KS = 0,3212 MW = 0,1282

Tab. 2: Dermální absorpce pyrenu – koncentrace pyrenu 0,0095 g/g média

	Nosné médium		Významnost rozdílů (výsledky olej vs. aceton)
	olej	aceton	p
absorpce po 12 h (nmol/cm ² /12h)	průměr: 0 medián: 0	průměr: 0,02±0,02 medián: 0,01	KS = 0,0090** MW = 0,0013**
absorpce po 24 h (nmol/cm ² /24 h)	průměr: 0,07±0,06 medián: 0,07	průměr: 0,09±0,05 medián: 0,10	KS = 0,4559 MW = 0,2166
absorpce po 48 h (nmol/cm ² /48 h)	průměr: 0,34±0,25 medián: 0,33	průměr: 0,39±0,36 medián: 0,21	KS = 0,8368 MW = 0,8191
absorpce po 72 h (nmol/cm ² /72 h)	průměr: 0,63±0,35 medián: 0,60	průměr: 0,91±0,81 medián: 0,46	KS = 0,4113 MW = 0,8516

Legenda k tab. 1 a 2:

průměr = aritmetický průměr ± výběrová směrodatná odchylka

KS = použit Kolmogorov-Smirnov test

MW = použit Mann-Whitney test

p = statisticky významné výsledky na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ označeny *, na hladině významnosti $\alpha = 0,01$ označeny **

tě, kdy dochází k dermální expozici osob PAU (např. v průmyslu různé oleje a maziva, benzín, dehet, saze atd., nebo v námi prováděném výzkumu – vlivu terapeutické aplikace – přípravky na bázi farmaceutického dehtu). V naší studii jsme proto použili „tradičně“ aceton (pro možnost srovnání našich výsledků s výsledky ostatních autorů) a nově slunečnicový olej. Mast'ový základ „Unguentum leniens“, který je používán pro výrobu dehtové masti aplikované při Goeckermanově terapii psoriázy, obsahuje 50 % slunečnicového oleje (31). Použitím slunečnicového oleje jako nosného média jsme přiblížili podmínky experimentu reálnému expozičnímu scénáři.

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

Rovněž v našem experimentu byly po aplikaci expoziční dávky (aceton: 209 nmol/cm² a 2 095 nmol/cm²; olej: 235 nmol/cm² a 2 347 nmol/cm²) ve všech případech nalezeny vyšší hladiny absorpce pyrenu u acetonového média. Hladiny statisticky významného rozdílu mezi acetonem a olejem však dosáhly, na rozdíl od Sartorelliho práce (23), pouze hodnoty nalezené po 12 a 24 hodinách u nižší expoziční dávky ($p < 0,05$) a po 12 hodinách u expoziční dávky vyšší ($p < 0,01$; viz tab. 1, 2). Ačkoliv v práci Sartorelliho byla použita významně nižší koncentrace donorové fáze, jsou výsledky absorpce v jeho i v našem experimentu řádově srovnatelné. Domníváme se, že je to způsobeno odlišnou penetrační membránou. Sartorelli používal kůži z břicha kočkodana zeleného. Tato kůže obsahuje velké množství vlasových folikulů, které mohou penetraci látky výrazně zvyšovat.

Zatímco ve studii Sartorelliho byla nalezena zhruba desetinasobně vyšší úroveň absorpce pyrenu při použití acetonu jako rozpouštědla (v porovnání s olejem), v naší studii se vyšší absorpce pyrenu z acetonu pohybovala na úrovni dvou až pětinasobků (u nižší koncentrace pyrenu), resp. na úrovni srovnatelné s olejovým rozpouštědlem (u vyšší koncentrace pyrenu). Jednou z příčin rozdílných úrovní absorpcí může být složení použitých olejů. Zatímco Sartorelli a kol. ve svém ex-

perimentu použili syntetický olej (commercial synthetic lubricator for engines), v našem experimentu byl z výše uvedených důvodů použit olej slunečnicový. Důležitou součástí slunečnicového oleje je kyselina olejová, která tvoří 14–40 % oleje (31). Tato mono-nenasycená vyšší mastná kyselina je známa jako akcelerátor transdermální penetrace (32). Domníváme se, že vyšší hladiny absorpce, nalezené v našem experimentu, je tedy možné dílem připisovat právě obsahu kyseliny olejové ve slunečnicovém oleji.

V některých pracích lze nalézt informaci, že aceton poškozuje epidermální stratum corneum, a tím urychluje transdermální penetraci látek (33, 34). Na druhou stranu však Sartorelli a kol. uvádějí, že v případě ponechání donorového vzorku na kůži bez okluze dochází brzy k odpaření acetonu, aniž by došlo k poškození rohové vrstvy (24). Uvedený expoziční scénář (bez okluze) byl použit i v našem experimentu.

Data získaná Sartorellim (24) a námi mohou být vodítkem pro hodnocení rizik expozice PAU. Uvědomujeme si, že hodnocení pouze jednoho zástupce skupiny PAU nás neopravňuje k jednoznačnému tvrzení o chování celé skupiny PAU, avšak lze snad říci, že na rozdíl od použití minerálních olejů (kdy dochází k cca 10 násobnému snížení absorpce) je použití slunečnicového oleje (a pravděpodobně i dalších přírodních olejů s podobným složením a obsahem kyseliny olejové) méně odlišné od standardně používaného rozpouštědla acetonu.

Závěr

Byly stanoveny základní charakteristiky transdermální penetrace pyrenu přes kůži prasečího boltce. Pro pyren rozpuštěný v acetonu nebo ve slunečnicovém oleji byla stanovena průměrná rychlost jeho absorpce a doba potřebná k jeho penetraci do receptorové tekutiny (organismu). Nalezené hodnoty charakteristik jsou srovnatelné s hodnotami nalezenými v odborné literatuře. Použití acetonového rozpouštědla vedlo k vyšším hladinám dermální absorpce pyrenu, statisticky významného rozdílu mezi acetonem a olejem dosáhly pouze hodnoty nalezené po 12 a 24 hodinách u nižší expoziční dávky ($p < 0,05$) a po 12 hodinách u expoziční dávky vyšší ($p < 0,01$).

Poděkování

Experimentální práce byly prováděny s podporou Univerzity Karlovy v Praze, Lékařské fakulty v Hradci Králové, projekt PRVŮUK.

LITERATURA

1. Kortuem KR, Davis MD, Witman PM, McEvoy MT, Farmer SA. Results of Goeckerman treatment for psoriasis in children: a 21-year retrospective review. *Pediatr Dermatol.* 2010 Sep-Oct;27(5):518-24.
2. International Agency for Research on Cancer (IARC). Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. IARC monographs on the evaluation of

- carcinogenic risks to humans, vol. 92 [Internet]. Lyon: IARC; 2010 [cited 2010 Apr 16]. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/mono92.pdf>.
3. Borská L, Fiala Z, Krejssek J, Hamáková K, Andrýs C, Šmejkalová J, et al. Cytogenetic and immunological changes after dermal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and UV radiation. *Physiol Res.* 2006;55(3):317-23.
4. Fiala Z, Borská L, Pastorková A, Kremláček J, Černá M, Šmejkalová J, et al. Genotoxic effect of Goeckerman regimen of psoriasis. *Arch Dermatol Res.* 2006 Oct;298(5):243-51.
5. Monteiro P, Gilot D, Le Ferrec E, Lecureur V, N'Diaye M, Le Vee M, et al. AhR- and c-maf-dependent induction of beta7-integrin expression in human macrophages in response to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Jun 29;358(2):442-8.
6. Ramos KS, Moorthy B. Bioactivation of polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens within the vascular wall: implications for human atherogenesis. *Drug Metab Rev.* 2005;37(4):595-610.
7. Armstrong B, Hutchinson E, Unwin J, Fletcher T. Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. *Environ Health Perspect.* 2004 Jun;112(9):970-8.
8. Burstyn I, Boffetta P, Heederik D, Partanen T, Kromhout H, Svane O, et al. Mortality from obstructive lung diseases and exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons among asphalt workers. *Am J Epidemiol.* 2003 Sep 1;158(5):468-78.
9. Anderson KE, Kadlubar FF, Kulldorff M, Harnack L, Gross M, Lang NP, et al. Dietary intake of heterocyclic amines and benzo(a)pyrene: associations with pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Sep;14(9):2261-5.
10. Sinha R, Kulldorff M, Gunter MJ, Strickland P, Rothman N. Dietary benzo(a)pyrene intake and risk of colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Aug;14(8):2030-4.
11. Roos PH, Bolt HM. Cytochrome P450 interactions in human cancers: new aspects considering CYP1B1. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2005 Aug;1(2):187-202.
12. Vondráček J, Kozubík A, Machala M. Modulation of estrogen receptor-dependent reporter construct activation and G0/G1-S-phase transition by polycyclic aromatic hydrocarbons in human breast carcinoma MCF-7 cells. *Toxicol Sci.* 2002 Dec;70(2):193-201.
13. Gaspari L, Chang SS, Santella RM, Garte S, Pedotti P, Taioli E. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human sperm as a marker of DNA damage and infertility. *Mutat Res.* 2003 Mar 3;535(2):155-60.
14. Hatch MC, Warburton D, Santella RM. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in spontaneously aborted fetal tissue. *Carcinogenesis.* 1990 Sep;11(9):1673-5.
15. Manchester DK, Bowman ED, Parker NB, Caporaso NE, Weston A. Determinants of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human placenta. *Cancer Res.* 1992 Mar 15;52(6):1499-503. Erratum in: *Cancer Res.* 1992 Jul;52(13):3828.
16. Koschier FJ. Toxicity of middle distillates from dermal exposure. *Drug Chem Toxicol.* 1999 Feb;22(1):155-64.
17. Ritchie GD, Still KR, Alexander WK, Nordholm AF, Wilson CL, Rossi J 3rd, et al. A review of the neurotoxicity risk of selected hydrocarbon fuels. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2001 Jul-Sep;4(3):223-312.
18. Gallenga PE, Mastropasqua L, Lobefalo L, Morgante A, Ayed M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in clear and cataractous human lenses. *Doc Ophthalmol.* 1994;85(3):243-5.
19. Jongeneelen FJ. Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ann Occup Hyg.* 2001 Jan;45(1):3-13.

20. 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.
21. Walter D, Knecht U. Standardized investigation of percutaneous absorption of bitumen emission in humans. *J Occup Environ Hyg*. 2007;4(S1):144-53.
22. Ng KM, Chu I, Bronaugh RL, Franklin CA, Somers DA. 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 Aug;115(2):216-23.
23. Sartorelli P, Aprea C, Cenni A, Novelli MT, Orsi D, Palmi S, et al. Prediction of percutaneous absorption from physico-chemical data: a model based on data of in vitro experiments. *Ann Occup Hyg*. 1998 May;42(4):267-76.
24. 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.
25. 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.
26. Franz TJ. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol*. 1975 Mar;64(3):190-5.
27. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4 - Health effects. Test no. 428. Skin absorption: in vitro method [Internet]. Paris: OECD; 2004 [cited 2012 Apr 16]. Available from: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-428-skin-absorption-in-vitro-method_9789264071087-en.
28. EU-Scientific Committee for Consumer Products. Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. SCCP/0970/06 [Internet]. Brussels: European Commission; 2006 [cited 2012 Apr 16]. Available from: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_s_03.pdf.
29. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidance document for the conduct of skin absorption studies [Internet]. OECD series on testing and assessment, no. 28. Paris: OECD; 2004 [cited 2012 Apr 16]. Available from: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/guidance-document-for-the-conduct-of-skin-absorption-studies_9789264078796-en.
30. 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.
31. Ministerstvo zdravotnictví ČR. Český lékopis 2009. Praha: Grada; 2009.
32. Singh I, Sri P. Percutaneous penetration enhancement in transdermal drug delivery. *Asian J Pharm*. 2010;4:92-101.
33. Tsai JC, Sheu HM, Hung PL, Cheng CL. Effect of barrier disruption by acetone treatment on the permeability of compounds with various lipophilicities: implications for the permeability of compromised skin. *J Pharm Sci*. 2001 Sep;90(9):1242-54.
34. Rissmann R, Oudshoorn MH, Hennink WE, Ponc M, Bouwstra JA. Skin barrier disruption by acetone: observations in a hairless mouse skin model. *Arch Dermatol Res*. 2009 Sep;301(8):609-13.

Došlo do redakce: 10. 8. 2011

Přijato k tisku: 2. 4. 2012

*MUDr. Lenka Kotingová
Ústav hygieny a preventivního lékařství
Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Šimkova 870
500 38 Hradec Králové
E-mail: kotingoval@lfhk.cuni.cz*