

# TRANS-EPIDERMÁLNÍ PENETRACE PAU IN VITRO

Málková Andrea<sup>1</sup>, Kotingová Lenka<sup>1</sup>, Kandár Roman<sup>2</sup>, Špryncová  
Martina<sup>2</sup>, Andrlová Lenka<sup>2</sup>, Bezrouk Aleš<sup>3</sup>, Benešová Lucie<sup>2</sup>, Fiala Zdeněk<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav hygieny a preventivního lékařství  
Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové

<sup>2</sup> Katedra biologických a biochemických věd,  
Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická

<sup>3</sup> Ústav lékařské biofyziky  
Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové

# POLYCYKLIČKÉ AROMATICKÉ UHLOVODÍKY

- Vulkanická činnost, dehtové výrobky, spalování fosilních paliv, výroba a spalování ropných paliv, spalování tabáku
- Pracovníci koksáren, výrobci pražců, dehtové lepenky, pokrývači, stavební a silniční dělníci
- Emise z dopravy, průmyslová a lokální topeniště, tabákový kouř, uzené a grilované potraviny
- Mutagenní, karcinogenní a imunosupresivní účinky
- Vazba na makromolekulární látky, DNA, RNA a proteinové addukty, indukce oxidativního stresu
- Karcinogeny (IARC 1, 2A, 2B): benzo(a)pyren, dibenz(a,h)anthracen, benz(a)anthracen, benzo(b)fluoranthen, benzo(k)fluoranthen a další

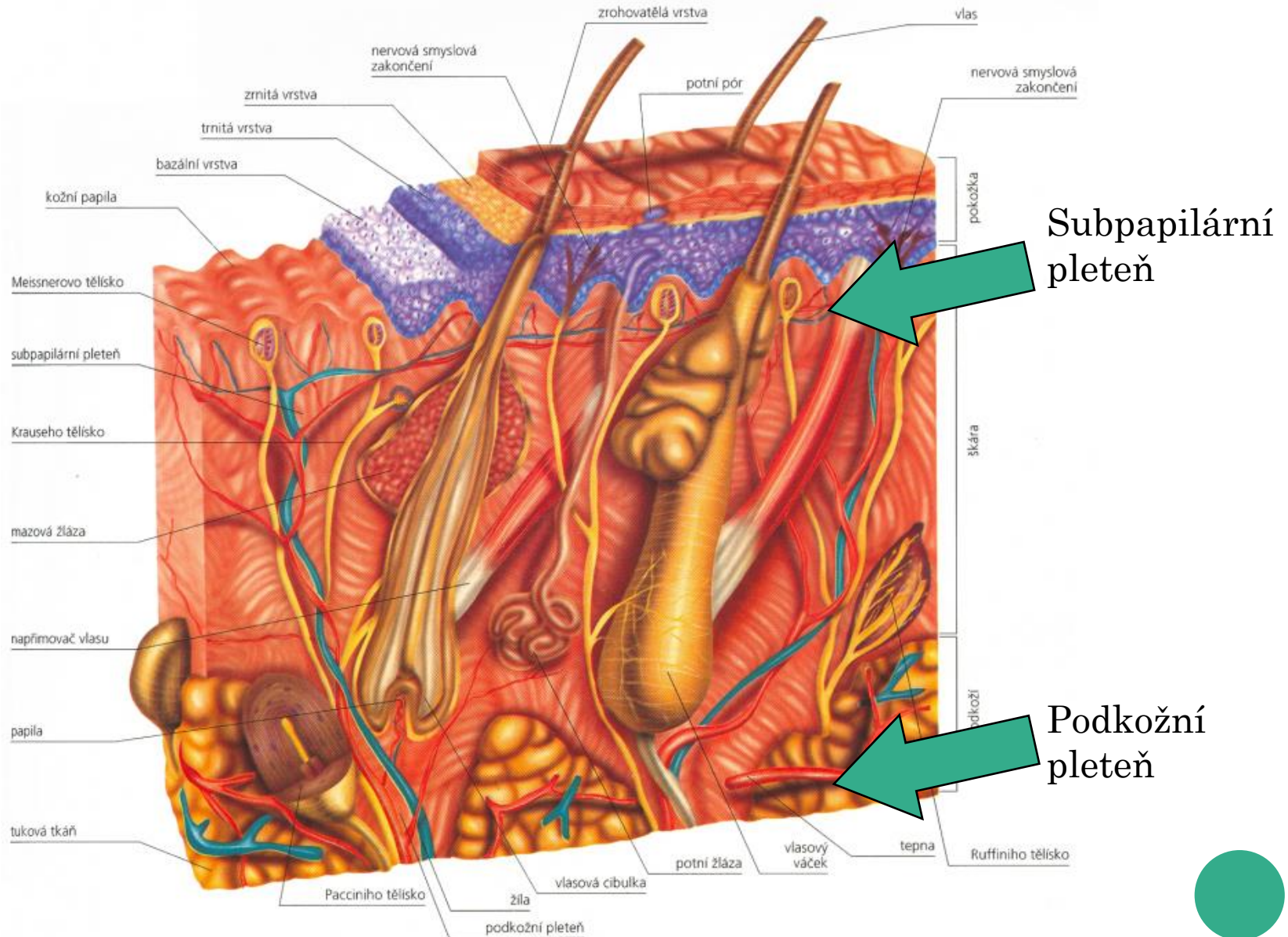


# DERMÁLNÍ BARIÉRA

- **Kůže:** Epidermis, dermis a hypodermis (1,5 až 2,3 m<sup>2</sup>)
- **Absorpce PAU**
  - Stratum corneum
  - Stratum granulosum, Stratum spinosum, Stratum basale: bioaktivace PAU a tvorba reaktivních intermediátů
- **Subpapilární arteriální a venózní pleteň**
  - Hranice epidermis a dermis
  - Vazodilatace: PAU a metabolity → subpapilární pleteň →  
→ cirkulace → cílové orgány a systémy
  - Vazokonstrikce: PAU a metabolity → podkožní pleteň →  
→ cirkulace → cílové orgány a systémy
- **Testování absorpce PAU na plné kůži**
  - Pravděpodobně podhodnocené výsledky s vyšším stupněm variability (Frasch et al. 2007, Kotingová et al. 2012)
- **Testování absorpce PAU na epidermální membráně**



# STAVBA KŮŽE



# DERMÁLNÍ BARIÉRA

- **Kůže:** Epidermis, dermis a hypodermis (1,5 až 2,3 m<sup>2</sup>)
- **Absorpce PAU**
  - Stratum corneum
  - Stratum granulosum, Stratum spinosum, Stratum basale: bioaktivace PAU a tvorba reaktivních intermediátů
- **Subpapilární arteriální a venózní pleteň**
  - Hranice epidermis a dermis
  - Vazodilatace: PAU a metabolity → subpapilární pleteň →  
→ cirkulace → cílové orgány a systémy
  - Vazokonstrikce: PAU a metabolity → podkožní pleteň →  
→ cirkulace → cílové orgány a systémy
- **Testování absorpce PAU na plné kůži**
  - Pravděpodobně podhodnocené výsledky s vyšším stupněm variability (Frasch et al. 2007, Kotingová et al. 2012)
- **Testování absorpce PAU na epidermální membráně**



# MATERIÁL A METODIKA

- **Difuzní komůrky dle Franze (Ng et al. 2010)**

- **Donorová část**

- Nasycený roztok PAU v isopropylmyristátu;
- (nekonečná dávka – konzervativní scénář)

- **Epidermální membrána (n = 32)**

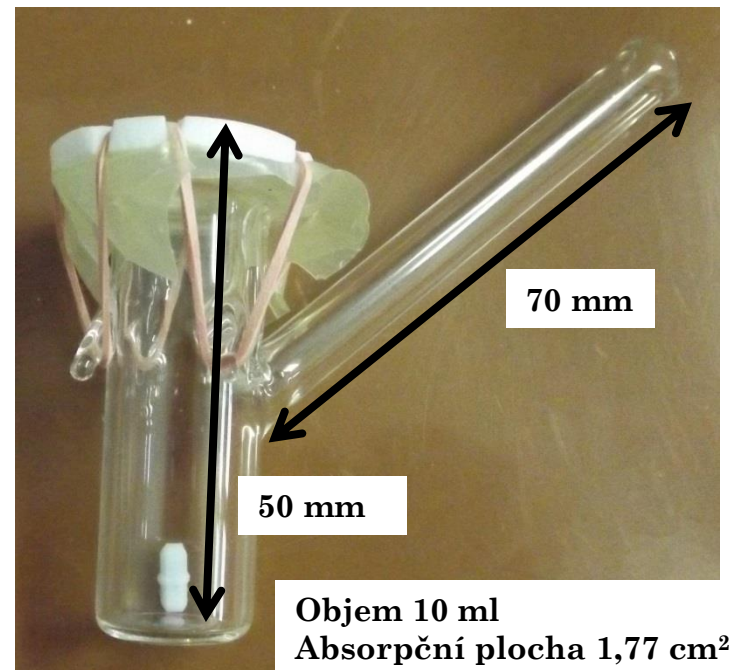
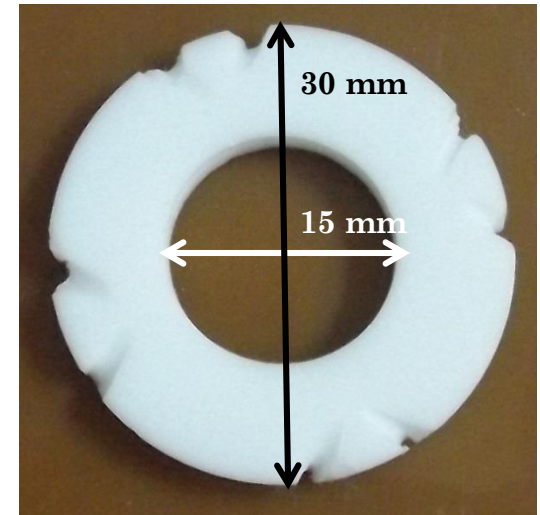
- Dorzální plocha ušního boltce prasete
- Preparace (voda 61°C; 2 min)
- Absorpční plocha 1,77 cm<sup>2</sup>
- Teplota membrány 32 ± 1°C

- **Receptorová část**

- PBS pufr, albumin, antibiotika (RT)
- Nucená cirkulace RT

- **Analýza RT**

- Deproteinace RT
- HPLC s fluorescenční detekcí



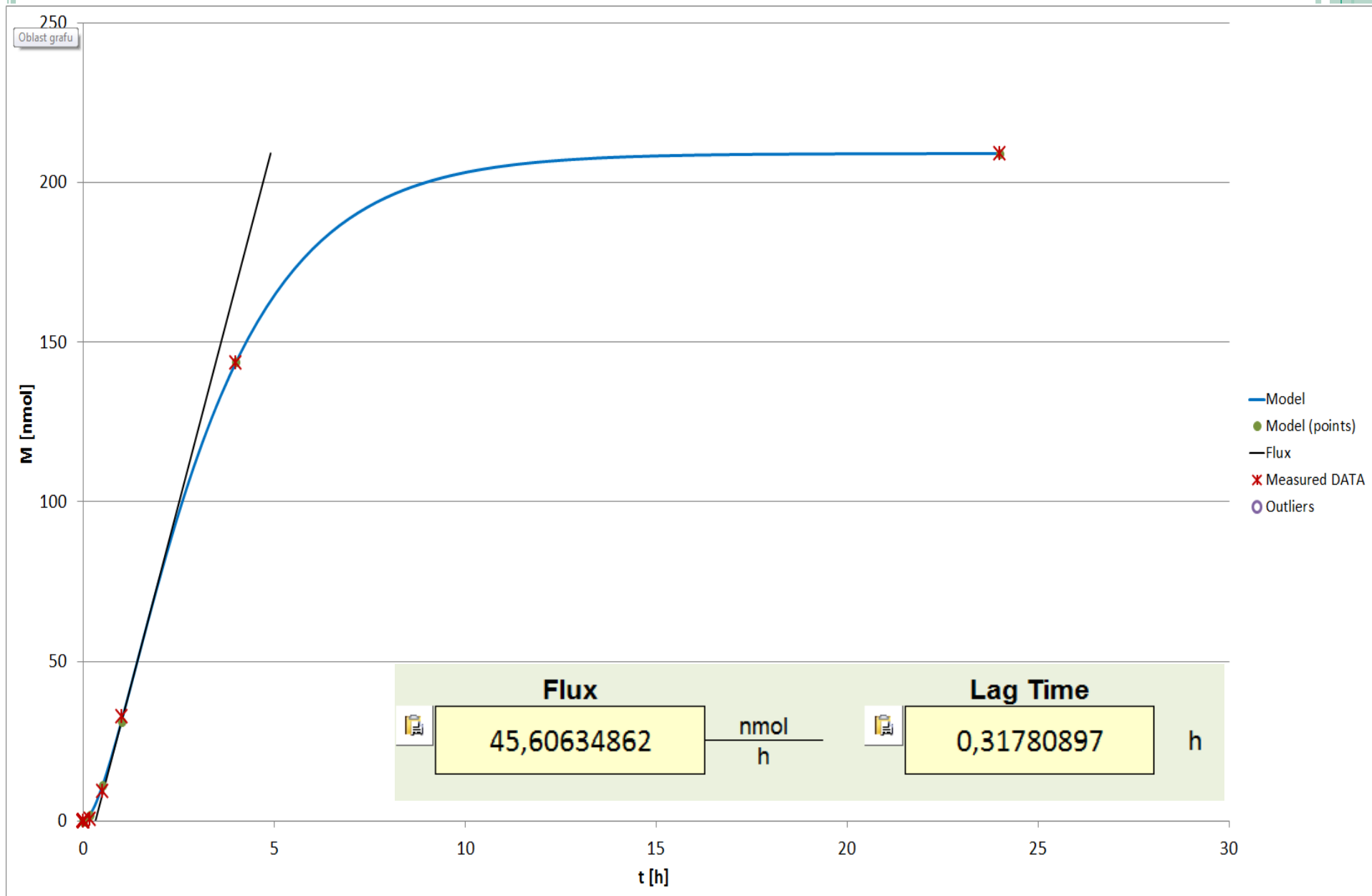


# USPOŘÁDANÍ EXPERIMENTU



# VYHODNOCENÍ DAT (program SAMPA)

(Bezrouk A, Fiala Z, Kotingová L et al., Toxicology In Vitro, 2017)





# ANALÝZY DONOROVÉ A RECEPTOROVÉ TEKUTINY

	DONOROVÁ TEKUTINA		RECEPTOROVÁ TEKUTINA	
	Koncentrace (mmol/l)	Aplikovaná dávka ( $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ )	Koncentrace ( $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ )	% Aplikované dávky
<b>NAP</b>	1099	62,09	0,301	0,48
<b>PHE</b>	635	35,88	0,179	0,50
<b>PYR</b>	246	13,90	0,044	0,32
<b>BaP</b>	55,9	3,158	0,473	0,15

<b>NAP</b>	naftalen
<b>PHE</b>	fenanthren
<b>PYR</b>	pyren
<b>BaP</b>	benzo[a]pyren



# ANALÝZY RECEPTOROVÉ TEKUTINY

## KUMULATIVNÍ ABSORPCE

(nmol/cm<sup>2</sup>, 24h, 48h)

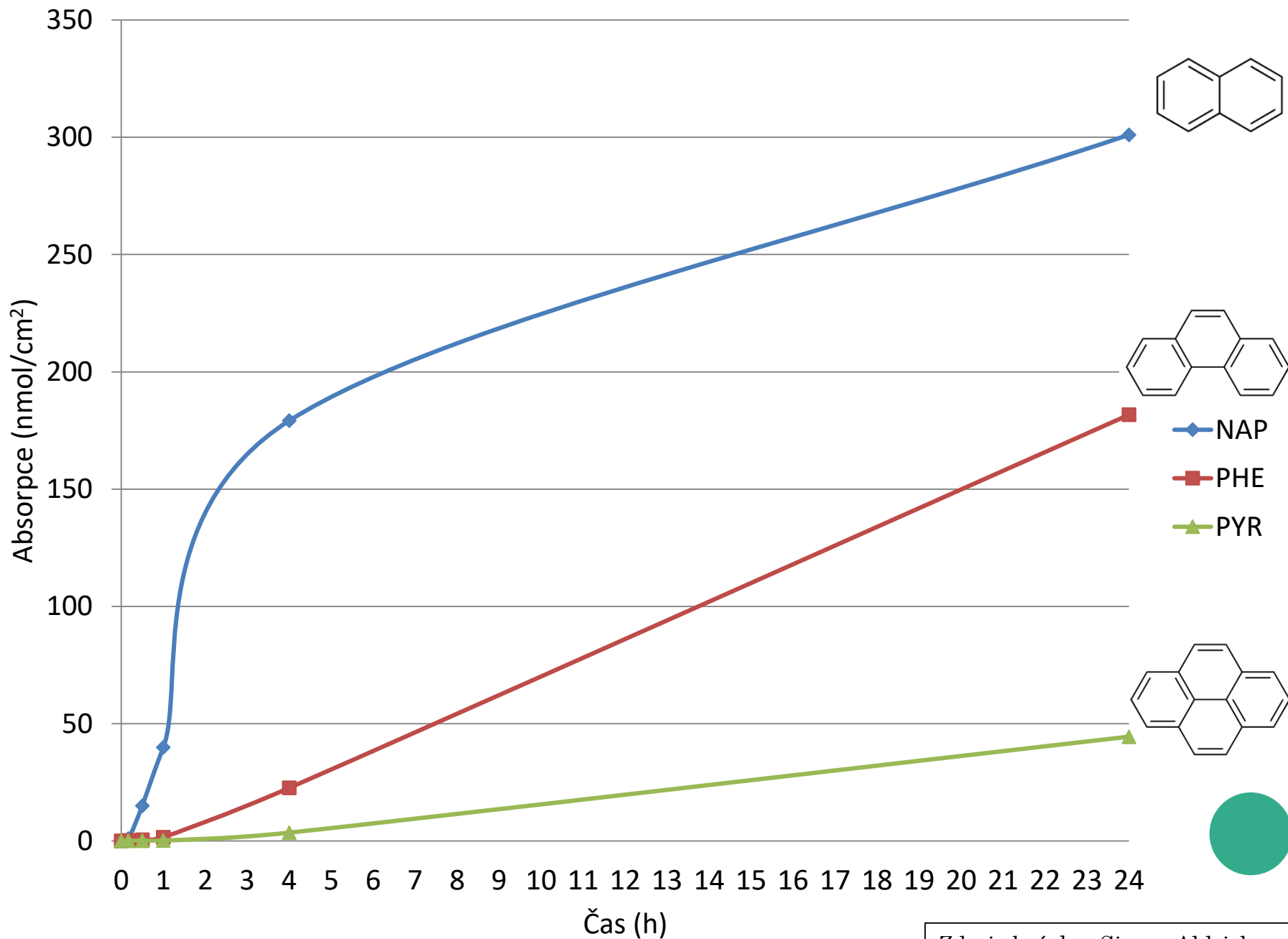
	NAP			PHE			PYR			BaP		
	24 h	Flux (nmol/cm <sup>2</sup> /h)	Lag time (h)	24 h	Flux (nmol/cm <sup>2</sup> /h)	Lag time (h)	24 h	Flux (nmol/cm <sup>2</sup> /h)	Lag time (h)	48 h	Flux (nmol/cm <sup>2</sup> /h)	Lag time (h)
<b>AP</b>	<b>301,1</b>	<b>57,3</b>	<b>0,25</b>	<b>178,5</b>	<b>11,7</b>	<b>2,11</b>	<b>44,4</b>	<b>2,67</b>	<b>3,25</b>	<b>4,73</b>	<b>0,13</b>	<b>10,8</b>
VSO	180,6	27,3	0,17	69,7	5,25	0,42	19,2	1,10	0,51	1,56	0,05	2,90
<b>MED</b>	<b>249,7</b>	<b>56,5</b>	<b>0,32</b>	<b>155,9</b>	<b>9,48</b>	<b>2,13</b>	<b>46,3</b>	<b>2,62</b>	<b>3,26</b>	<b>4,31</b>	<b>0,11</b>	<b>9,60</b>
Min	69,3	18,8	0,00	76,0	6,11	1,37	19,7	1,34	2,43	3,02	0,08	7,90
Max	573,1	94,8	0,43	273,4	20,2	2,84	84,9	4,96	4,21	7,13	0,20	15,3

**NAP** naftalen  
**PHE** fenanthren  
**PYR** pyren  
**BaP** benzo[a]pyren

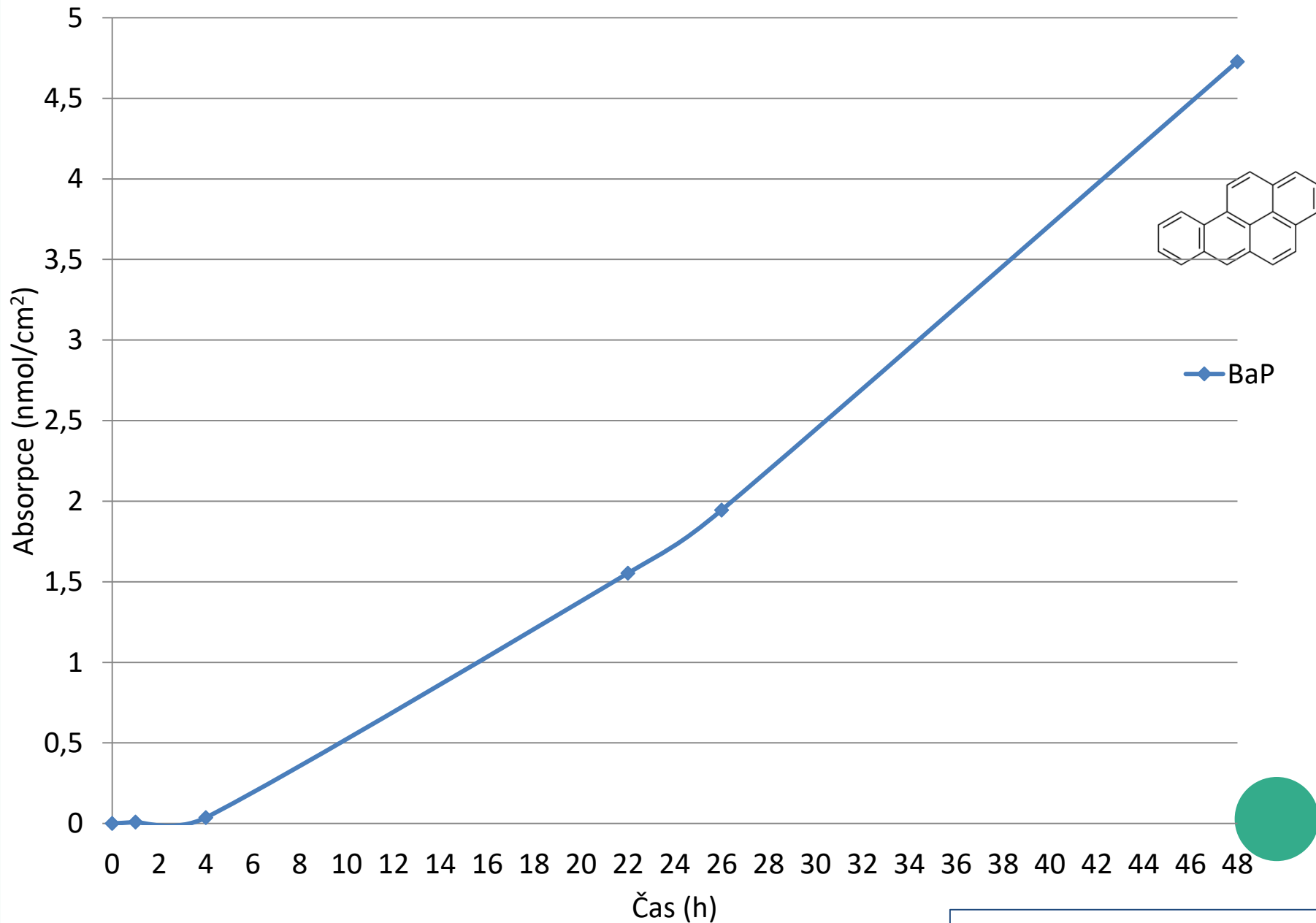
**AP** aritmetický průměr  
**VSO** výběrová směrodatná odchylka  
**MED** medián



# Absorpce NAP, PHE, PYR



# Absorpce benzo[a]pyrenu



Zdroj obrázku: Sigma-Aldrich

# DISKUSE

- Omezená literární data o **transdermální (TD)** penetraci PAU (Frasch et al. 2007, Kotingová et al. 2012)
- Nejsou dostupná literární data o **trans-epidermální (TED)** penetraci PAU za použití isopropyl myristátu
- **Porovnání výsledků TD PAU** (Kotingová et al. 2012) a **TED PAU** (prezentovaná data):
  - ❖ TD: pyren v acetonu nebo ve slunečnicovém oleji
  - ❖ TED: pyren v isopropylmyristátu
  - ❖ **Kumulativní absorpce TD 240 – 1100x nižší než absorpce TED (24 h)**
  - ❖ **Flux TD 200 - 300x nižší než u TED**
  - ❖ **Lag time TD 4 - 5,5x vyšší než u TED**
  - ❖ **Rozptyl VSO TD 55 -150% AP**
  - ❖ **Rozptyl VSO TED 33 - 60% AP**





# ZÁVĚR

- Penetrace PAU přes epidermální membránu (TED) vykazuje v porovnání s penetrací PAU přes plnou kůži (TD) **vyšší hodnoty kumulativní absorpce a fluxu a nižší hodnoty lag time**
- Penetrace PAU přes epidermální membránu (TED) vykazuje v porovnání s penetrací PAU přes plnou kůži (TD) **nižší stupeň variability dat**
- Penetrace PAU přes epidermální membránu (TED) se v porovnání s penetrací PAU přes plnou kůži (TD) **více přibližuje reálným expozičním situacím** (zohlednění možnosti dosažení systémové cirkulace – konzervativní expoziční scénář).
- Experimenty in vitro TED jsou **metodicky a časově náročnější** než experimenty in vitro TD.



# PODĚKOVÁNÍ za podporu

- Grant Vnitřní soutěže UK Lékařské fakulty v Hradci Králové (Málková A.: Zavedení a validace in vitro metodiky testování trans-epidermální penetrace polycyklických aromatických uhlovodíků)
- Program UK PROGRES Q40/09
- Institucionální podpora výzkumu SVV-260397/2017



# DĚKUJI ZA POZORNOST

**3 miliony let evoluce ...**



**... a přišli jsme jen o pár chlupů**

# REFERENCE

- Ng S-F, et al. (2010). "Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies". *AAPS PharmSciTech* 11(3): 1432-41.
- Frasch, H. F., et al. (2007). "Skin penetration and lag times of neat and aqueous diethyl phthalate, 1,2-dichloroethane and naphthalene." *Cutan Ocul Toxicol* 26(2): 147-160.
- Kotingová, L., et al. (2012). "Vliv rozpouštědla na dermální absorpci pyrenu in vitro." *Hygiena* 57(2): 50-55.
- Bezrouk, A., et al. (2017). "SAMPAs: A free software tool for skin and membrane permeation data analysis." *Toxicol In Vitro*, 44, 361-371.

