

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2020

Bc. Lucie Benešová

**Univerzita Pardubice**

**Fakulta chemicko-technologická**

Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro studium přestupu  
vybraných polyaromátů lidskou kůží.

Diplomová práce

2020

Bc. Lucie Benešová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Benešová**  
Osobní číslo: **C16471**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**  
Téma práce: **Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro studium přestupu vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků lidskou kůží**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

Teoretická část:  
Kůže – stavba, vlastnosti  
Polycyklické aromatické uhlovodíky – výskyt, účinky na lidské zdraví, metabolismus, zástupci  
Možnosti stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků  
Experimentální část:  
Zpracování vzorků pro stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků  
Vyhodnocení naměřených údajů a predikce transdermální absorpce vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultanti diplomové práce: **MUDr. Lenka Kotingová**  
Katedra ošetrovatelství  
**Mgr. Lenka Laštovičková**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně s využitím literárních pramenů a informací, které jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající z autorského zákona č. 121/2000 Sb., zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne:

## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. Mgr. Romanu Kand'árovi, Ph.D. za odborné vedení práce, Mgr. Lence Laštovičkové za její pomoc při psaní diplomové práce a věnovaný čas při HPLC analýzách a v neposlední řadě velké dík patří MUDr. Lence Kotingové Ph.D. za její ochotu, zasvěcení do výzkumu, poskytnutí dílčích výsledků a cenné rady. Rovněž bych ráda poděkovala i dalším zaměstnancům Ústavu hygieny a preventivního lékařství na LF UK v Hradci Králové, jmenovitě prof. Ing. Zdeňku Fialovi, CSc., MUDr. Andree Málkové Ph.D. a Mileně Čížkové, za podporu, pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí. Další velké díky patří mým rodičům a všem, kteří mě během studia jakkoli podporovali.

## **ANOTACE**

Většina studií se zabývá respirační expozicí polycyklických aromatických uhlovodíků na organismus a ostatní expozice jsou tak trochu zatlačeny do pozadí. Neméně důležité je věnovat také pozornost expozici polycyklických aromatických uhlovodíků na lidskou kůži. Při léčbě psoriázy se využívá v rámci Goeckermanovy metody lékařského dehtu, který je aplikován na postižené místo. Proto je tedy dobré vědět, jak polycyklické aromatické uhlovodíky pronikají do živého organismu a jak v něm působí. Pro stanovení vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků ve vzorcích byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Kůže, polycyklické aromatické uhlovodíky, pyren, vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí

## **TITLE**

Use of high-performance liquid chromatography for study the passage of selected polyaromatics through the human skin.

## **ANNOTATION**

Most studies deal with the respiratory exposure of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to the living organism, and other exposures are a bit suppressed into the background. It is equally important to pay attention also to the PAHs exposure on human skin. In the treatment of psoriasis by the Goeckerman method, medical tar is used, which is applied to the affected area. Therefore, it is good to know how PAHs penetrate into aliving organism and how they act in it. High-performance liquid chromatography with fluorescence detection was used to determine selected PAHs in the samples.

## **KEYWORDS**

Human skin, polycyclic aromatic hydrocarbons, pyrene, high-performance liquid chromatography with fluorescence detection

# OBSAH

ÚVOD.....	15
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	16
1.1 KŮŽE.....	16
1. 1. 1 Epidermis .....	17
1. 1. 2 Dermis.....	18
1. 1. 3 Hypodermis.....	19
1. 2 Transport látek přes kůži.....	19
1. 3 Polycyklické aromatické uhlovodíky.....	21
1. 3. 1 Zdroje a využití polycyklických aromatických uhlovodíků .....	22
1. 3. 2 Goeckermanova metoda léčby lupénky .....	23
1. 4 Metabolismus polycyklických aromatických uhlovodíků .....	25
1. 4. 1 Metabolismus benzo(a)pyrenu .....	27
1. 4. 2 Metabolismus polycyklických aromatických uhlovodíků v kůži .....	30
1. 5 Účinky polycyklických aromatických uhlovodíků .....	30
1. 6 Přehled významných polycyklických aromatických uhlovodíků .....	32
1. 6. 1 Fenanthren .....	32
1. 6. 2 Naftalen.....	32
1. 6. 3 Pyren .....	32
1. 6. 4 Benzo(a)pyren.....	33
1. 6. 5 Anthracen.....	33
1. 6. 6 Benz(a)anthracen .....	33
1. 6. 7 Fluoren .....	33
1. 7 Metody stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků .....	35
1. 7. 1 Plynová chromatografie .....	35



1. 7. 2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	35
2	CÍL PRÁCE .....	37
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	38
3. 1	Materiál .....	38
3. 1. 1	Pomůcky a přístroje .....	38
3. 1. 2	Chemikálie .....	39
3. 1. 3	Roztoky a vzorky .....	40
3. 2	Metodika zpracování vzorku .....	41
3. 2. 1	Test výtěžnosti extrakce pyrenu ze vzorků kůže toluenem .....	45
3. 3	Postup stanovení pyrenu metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí	45
3. 3. 1	Příprava vzorků pro stanovení pyrenu metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí .....	45
3. 3. 2	Parametry chromatografické analýzy .....	45
3. 3. 3	Kalibrace .....	47
3. 4	Zpracování výsledků .....	47
4	VÝSLEDKY .....	48
5	DISKUZE .....	58
6	ZÁVĚR .....	62
7	ZDROJE .....	63
8	ZDROJE OBRÁZKŮ, TABULEK, GRAFŮ .....	71
9	PŘÍLOHY .....	73

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

<b>Obrázek 1</b> Stavba lidské kůže .....	17
<b>Obrázek 2</b> Vrstvy epidermis .....	18
<b>Obrázek 3</b> Stavba pokožky .....	20
<b>Obrázek 4</b> Mechanismus aktivace benzo(a)pyren .....	26
<b>Obrázek 5</b> Struktury Bay (oblast zátoky) a Fjord (oblast fjordu) polycyklických aromatických uhlovodíků .....	27
<b>Obrázek 6</b> Struktura metabolitů benzo(a)pyrenu .....	28
<b>Obrázek 7</b> Metabolická aktivace benzo[a]pyrenu za vzniku isomerních forem benzo(a)pyren-7,8-diol-9,10-epoxidů .....	28
<b>Obrázek 8</b> Struktura konjugátů benzo(a)pyrenu .....	29
<b>Obrázek 9</b> Souhrnné schéma biotransformacebenzo(a)pyrenu .....	29
<b>Obrázek 10</b> Difúzní komůrka .....	41
<b>Obrázek 11</b> Kroužek ze silikonové gumy .....	42
<b>Obrázek 12</b> Přístroj na měření transepidermální ztráty vody MPA5 .....	43
<b>Obrázek 13</b> Přístroj na měření elektrického odporu kůže Tecpel LCR 612 .....	43
<b>Obrázek 14</b> Temperování komůrek se vzorky kůže v magnetickém míchadle .....	44

## SEZNAM TABULEK A GRAFŮ

<b>Tabulka 1</b>	Klasifikace karcinogenity PAU dle IARC.....	22
<b>Tabulka 2</b>	Vybrané PAU ve vzorcích farmaceutického dehtu.....	24
<b>Tabulka 3</b>	Analytické parametry metody HPLC s fluorescenční detekcí pro stanovení PYR v receptorové tekutině a toluenu, parametry rovnice kalibrační křivky .....	46
<b>Tabulka 4</b>	Časový program gradientové eluce metody kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí.....	46
<b>Tabulka 5</b>	Absorpce pyrenu v receptorové tekutině (nmol/cm <sup>2</sup> ) v časových intervalech po aplikaci donorového roztoku (pyren v isopropylmyristátu o koncentraci 70 mg/ml).....	48
<b>Graf 1</b>	Absorpce donorového roztoku pyrenu v isopropylmyristátu (70 mg/ml) v daných časových intervalech.....	49
<b>Tabulka 6</b>	Absorpce pyrenu v receptorové tekutině (nmol/cm <sup>2</sup> ) v časových intervalech po aplikaci donorového roztoku (pyren v isopropylmyristátu o koncentraci 7 mg/ml).....	49
<b>Graf 2</b>	Absorpce donorového roztoku pyrenu v isopropylmyristátu (7 mg/ml) v daných časových intervalech.....	50
<b>Tabulka 7</b>	Absorpce pyrenu v receptorové tekutině (nmol/cm <sup>2</sup> ) v časových intervalech po aplikaci donorového roztoku (pyren v isopropylmyristátu o koncentraci 0,7 mg/ml).....	51
<b>Graf 3</b>	Absorpce donorového roztoku pyrenu v isopropylmyristátu (0,7 mg/ml) v daných časových intervalech.....	52
<b>Tabulka 8</b>	Výtěžnost pyrenu z různých kompartmentů.....	53
<b>Tabulka 9</b>	Průměrná výtěžnost pyrenu ve všech sledovaných kompartmentech.....	54
<b>Tabulka 10</b>	Průměrná výtěžnost pyrenu ve všech sledovaných kompartmentech („mokrě“ difúzní komůrky).....	54

<b>Tabulka 11</b>	Průměrná výtěžnost pyrenu ve všech sledovaných kompartmentech („suché“ difúzní komůrky).....	55
<b>Tabulka 12</b>	Průměrná výtěžnost pyrenu v různých kompartmentech („suché“ difúzní komůrky).....	55
<b>Tabulka 13</b>	Průměrná výtěžnost pyrenu v různých kompartmentech („mokrý“ difúzní komůrky).....	56
<b>Tabulka 14</b>	Výtěžnost extrakce pyrenu z kůže toluenem.....	57

## SEZNAM ZKRATEK

OHP	1-hydroxypyren
ACN	acetonitril
AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky
ATB	antibiotika
BaA	benzo(a)antracen
BaP	benzo(a)pyren
BPDE	benzo(a)pyren-7,8-dihydrodiol-10-epoxid
BSA	bovinní sérový albumin
CNS	centrální nervová soustava
COX-2	cyklooxygenasa 2
CYP	cytochrom P450
DC	difúzní komůrka (z angl. diffuse cell)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
DR	donorový roztok
ER	estrogenní receptory
FID	plamenově-ionizační detektor (z angl. flame-ionization detector)
GC	plynová chromatografie (z angl. gas chromatography)
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (z angl. gas chromatography-mass spectrometry)
GST	glutathion-S-transferasa
GSTM1	glutathion-S-transferasa Mu 1
GSTP1	glutathion-S-transferasaPi 1
GSTT1	glutathion-S-transferasatheta 1
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)

IARC	mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (z angl. International Agency for Research on Cancer)
IgE	imunoglobulin E
IMP	isopropylmyristát
MCF-7	buněčná linie odvozená z lidského karcinomu prsu (z angl. Michigan Cancer Foundation-7)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (redukovaná forma)
NK	přírození zabíječi (z angl. natural killer)
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PB	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffer)
PNC-STR	penicilin-streptomycin
PYR	pyren
ROS	reaktivní sloučeniny kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na obrácených fázích (z angl. reverse phase high-performance liquid chromatography)
RT	receptorová tekutina
SFE	superkritická fluidní extrakce
SPE	extrakce tuhou fází (z angl. solid phase extraction)
SULT	sulfotransferasa
TER	transkutánní elektrický odpor kůže (z angl. transcutaneous electrical resistance)
TEWL	transepidermální ztráta vody (z angl. transepidermal water loss)
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (z angl. thin layer chromatography)
UGT	UDP-glukuronosyltransferasa
US EPA	agentura pro ochranu životního prostředí spadající pod federální vládu USA (United States Environmental Protection Agency)
UV	ultrafialová (z angl. ultraviolet)
Vis	viditelné spektrum (z angl. visible)

## ÚVOD

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) mají prokázané karcinogenní, toxické, imunosupresivní a genotoxické účinky. Vznikají při spalování organických látek a jsou tedy velkým rizikem zejména pro zaměstnance koksáren a ve výrobcích, kde dochází k jejich uvolňování. Nejpravděpodobnějším vstupem do organismu je jejich vdechování, nicméně významné jsou také cesty perorální a dermální. Celková plocha kůže u dospělého člověka je 1,5 až 2,3 m<sup>2</sup> a z toxikologického hlediska je významnou bránou vstupu látek do organismu. PAU se ale v medicíně používají i cíleně, a to zejména při léčbě lupénky farmaceutickým dehtem. Kůže je tvořena 3 základními vrstvami, epidermis, dermis a hypodermis. Dalšími 4-5 vrstvami je tvořena epidermální membrána, *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* a *stratum corneum*. *Stratum corneum* epidermální membrány je tvořena až z 50 % ceramidy a je bohatá na lipidy. Protože PAU jsou látky lipofilní, lze předpokládat, že budou snadno prostupovat právě v epidermální membráně vrstvou *stratum corneum*. V ostatních vrstvách epidermální membrány, které jsou tvořeny vodným prostředím, dochází k biotransformaci PAU. Vzniklé volné radikály a reaktivní meziprodukty mohou dále reagovat s DNA, RNA a proteiny a působit jejich nezvratné změny. Vliv na to, jak rychle PAU prostoupí kožní bariérou do systémové cirkulace, má i subpapilární arteriální a venózní pleteň, která se nachází mezi epidermis a dermis. Molekuly PAU a jejich metabolitů pronikají přes cévní stěny do systémové cirkulace, když je tato pleteň dilatovaná. V opačném případě, kdy je tato pleteň ve vazokonstrikci, procházejí PAU a jejich metabolity až do podkožní cévní pleteně a teprve zde vstupují do systémové cirkulace. V experimentech *in vitro* je míra penetrace látek přes kožní bariéru vyjadřována veličinou Flux a rychlost penetrace látek přes kožní bariéru veličinou Lag time [1-6].

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

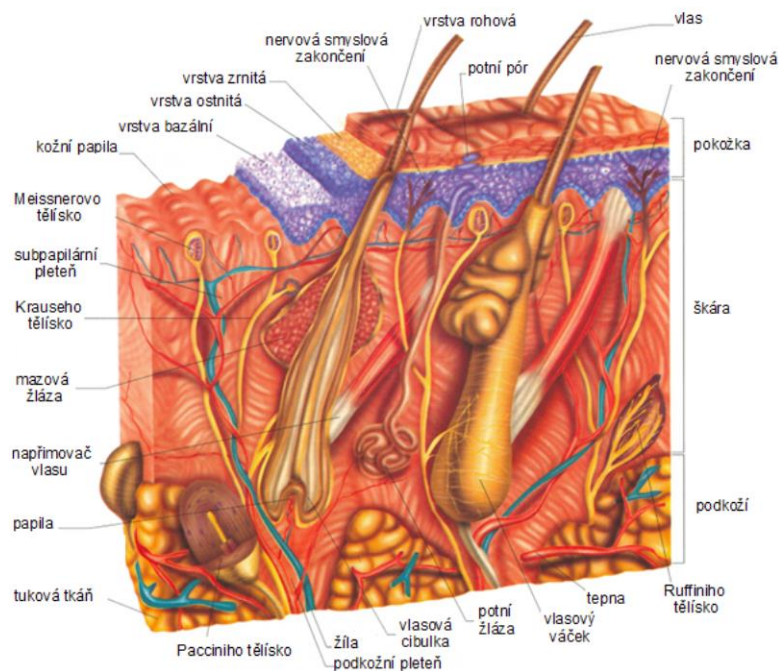
## 1.1 KŮŽE

Kůže (*cutis, derma*) je největším plošným orgánem lidského těla. Zaujímá plochu přibližně 1,2-2,3 m<sup>2</sup> a její hmotnost se pohybuje okolo 16 % celkové tělesné hmotnosti jedince [1].

V organismu plní mnoho nepostradatelných funkcí. Zabraňuje fyziologickým ztrátám tekutin, má podíl na regulaci tělesné teploty, funguje jako ochrana před mechanickým a chemickým poškozením, obsahuje nervová zakončení pro vnímání tlaku, teploty a bolesti, plní imunologickou funkci a spolu s mírně kyselým kožním filmem brání invazi řadě mikroorganismů do těla. I za normálních okolností kůži osídlují miliardy mikroorganismů, avšak k rozvoji infekce dochází až při proniknutí mikroorganismů pod kožní bariéru. Například při popáleninách kůže dochází k jejímu výraznému poškození a otvírá se vstupní brána do organismu pro různé škodliviny a mikroorganismy. Mimo jiné se kůže podílí na metabolismu sacharidů, tuků a bílkovin a syntéze vitamínu D vlivem UV záření. Důležitou vlastností kůže je bezesporu její elasticita. Na její vlastnosti mají také vliv pohlavní hormony, potažmo pohlaví. Androgeny například zvyšují tloušťku kůže, estrogeny stimulují imunitní funkce a naopak testosteron imunitní funkce inhibuje. Estrogeny stárnutí kůže zpomalují [1, 2].

Kůže (*Obrázek 1*) se skládá ze tří vrstev, pokožky (*epidermis*), škáry (*dermis*) a podkoží (*hypodermis, tela subcutanea*). K lidské kůži řadíme i kožní deriváty jako jsou vlasy, nehty, mazové a potní žlázy. Pokožka je bezcévná a je vyživována škárou. V dolních vrstvách dochází k neustálému růstu a dělení buněk, které pak vytlačují směrem na povrch buňky starší. Ty cestou pomalu rohovatější až nakonec odumřou a začnou se odlupovat. Tímto způsobem se celá pokožka obmění za 3-4 týdny. Ve spodní vrstvě kůže je obsaženo pigmentové barvivo melanin, které je zodpovědné za barvu kůže a chrání hlubší vrstvy před účinky UV záření [2].





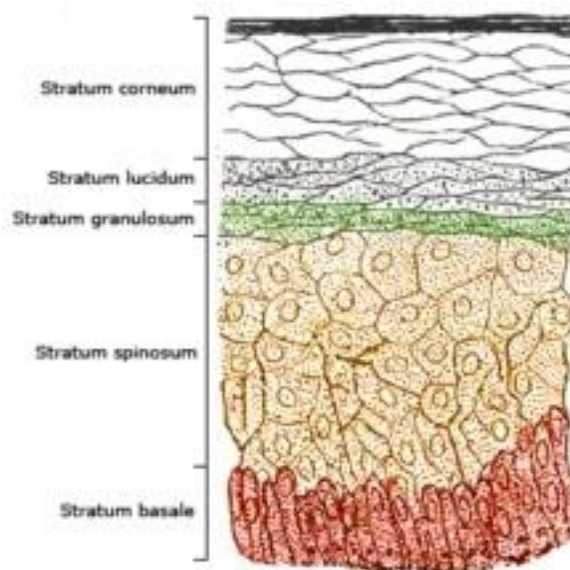
### 1. 1. 1 Epidermis

**Obrázek 1** Stavba lidské kůže [1A]

Pokožka (*epidermis*) se skládá z pěti vrstev (Obrázek 2), vrstvy základní (*stratum basale*), ostnitě (*stratum spinosum*), zrnité (*stratum granulosum*), světlé (*stratum lucidum*) a vrstvy rohové (*stratum corneum*). Je tvořena mnohvrstevným dlaždicovým epitelem, jehož buňky se nazývají keratinocyty a jsou ektodermálního původu. Ektoderm, zárodečný list, je tvořen jednovrstevným kubickým epitelem. Keratinocyty směrem k povrchu postupně rohovatí a odlupují se v podobě šupinek. Dochází tedy k neustálé obnově buněk. Tloušťka pokožky značně kolísá a pohybuje se v rozmezí od 75-800  $\mu\text{m}$  v závislosti na typu. Většinou bývá kůže rozlišována na kůži tlustého typu (dlaně, chodidla) a kůži tenkého typu (ochlupená kůže). V závislosti na topografii se mění i celková tloušťka kůže, například na hlavě činí přibližně 1,5 mm, zatímco na zádech může dosahovat až 4 mm [1, 3].

Epidermis obsahuje i další buňky se speciálními funkcemi, jako jsou melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky. Melanocyty migrují do epidermis během druhého měsíce embryonálního vývoje a produkují barvivo melanin, které dodává pokožce, vlasům, chlupům a očím zbarvení. Melanin je syntetizován z tyrosinu přes dopachinon za katalýzy tyrosinásou. Z buněk je melanin vylučován v granulární formě jako melanosomy, které jsou

následně fagocytovány keratinocyty. Tímto procesem je zajištěno rovnoměrné rozptření pigmentu v epidermis. Langerhansovy buňky mají hvězdovitý tvar, jsou původem z kostní dřeně a mají schopnost na sebe vázat antigeny a následně je prezentovat T-lymfocytům. Hrají tedy důležitou úlohu v imunitních reakcích. Původ významu Merkelových buněk není přesně znám. Buď vytvářejí komplex s neuritem a tím se podílejí na mechanoreceptci, nebo stimulují diferenciaci a proliferaci keratinocytů a řídí jejich apoptózu [1, 3].



**Obrázek 2** Vrstvy epidermis [2B]

### 1. 1. 2 Dermis

Škára (*dermis*) se skládá z pojivového vaziva kolagenu a s pokožkou ji pevně spojuje bazální membrána. Dermis obsahuje velká množství nervových zakončení, které nám umožňují vnímat teplo a hmat a organismus je díky ní schopen se zbavovat odpadních látek ve formě potu. Ve škáře nalézáme potní a mazové žlázy, vlasové folikuly a cévy. Potní žlázy rozlišujeme na malé (*ekrinní*), přímo ústící na povrch těla, které jsou důležité pro termoregulaci, a velké (*apokrinní*) potní žlázy, které se nacházejí jen na určitých místech těla (podpaží, oblast análního otvoru a genitálu) a jsou charakterizovány jako žlázy aromatické. Mazové žlázy jsou, mimo plosek nohou a dlaní rukou, na celém povrchu těla. Mazové žlázy produkují maz (*sebum*), který obsahuje cholesterol a jeho deriváty, triacylglyceroly, skvalen a vosky [1, 2, 4].

Tloušťka dermis je proměnlivá. Záleží jak na místě, kde se nachází, tak stáří organismu. V dětství a období dospívání se zvyšuje, naopak po padesátém roce života dochází k jejímu zeslabování. Dermis tvoří dvě vrstvy s nepatrným rozhraním, zevní vrstvy (*stratum papillare*)

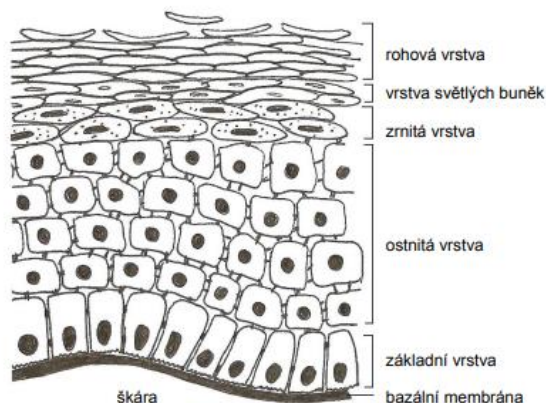
a vnitřní vrstvy (*stratum reticulare*). *Stratum papillare* je tvořena řídkým vazivem. Z této vrstvy vystupují kolagenní vlákna, která se upínají do bazální membrány a pevně tak vážou dermis k epidermis. Těmto speciálním kolagenním vláknům se proto říká kotevní vlákna. Papilární vrstva hojně obsahuje fibroblasty, žírné buňky, leukocyty a makrofágy a tvoří dermální papily. *Stratum reticulare* je oproti *stratum papillare* silnější, obsahuje méně buněk a více kolagenních vláken prvního typu. Tvoří ji neuspořádaná síť hustého vaziva. Obsahuje velké množství krevních kapilár, které mají za úkol vyživovat jinak bezcévnou epidermis. Mezibuněčnou hmotu dermis tvoří voda a glykosaminoglykany, z nichž hlavním je dermatansulfát. Cévní zásobením dermis je zajištěno třemi venózními a dvěma arteriálními pleteněmi. Absorpci látek do organismu výrazně ovlivňuje vaskularizace dermis. Vasokonstrikce a vasodilatace cév dermis se využívá při aplikaci transdermálních farmaceutických přípravků. Při přidání vasokonstrikčních látek se absorpce látek do organismu snižuje, při přidání vasodilatačních látek naopak zvyšuje [1, 2, 4].

### **1. 1. 3 Hypodermis**

Podkoží (*hypodermis*) je nejhlubší část pokožky obsahující velké množství tukových buněk, kde se ukládají živiny. Mimo to, že hypodermis slouží jako energetická zásobárna organismu, plní ještě funkci ochrannou. Zajišťuje tlumení nárazů a podílí se na termoregulaci. Největší šířky hypodermis dosahuje na hýždích, plosek nohou a na dlaních [5].

## **1. 2 Transport látek přes kůži**

Pokožka se skládá z pěti vrstev různých typů buněk, které mají vliv na to, jakým způsobem a jestli vůbec se látka transportuje do organismu. Prvním typem jsou bezjaderné buňky zevní rohové vrstvy, které jsou vyplněny keratinem. Tato vrstva je bezcévná a obsahuje mezibuněčnou hmotu složenou z volných mastných kyselin, ceramidů, cholesterolu a cholesterolsulfátu. Za rohovou vrstvou následuje vrstva bezjaderných světlých buněk. Zrnitá vrstva je tvořena buňkami s plochými jádry a zrny obsahujícími prekurzor keratinu, keratohyalin. Ostnitou vrstvou tvoří polygonální buňky pospojované buněčnými můstky. Tyto buňky mají jádra a všechny náležité buněčné organely a mezi nimi cirkuluje tkáňový mok. Na bazální membráně nalézáme cylindrické jaderné buňky (*Obrázek 3*). Důležitým poznatkem je, že rohová vrstva je hydrofobní, kdežto ostatní vrstvy pokožky jsou hydrofilní. Právě tyto vlastnosti různých vrstev kůže mají vliv na vstup chemických látek do organismu. Právě rohová vrstva je jakousi prvotní bariérou bránící vstupu látek a spodní hydrofilní vrstvy se stávají limitující pro průnik látek lipofilních [6].



**Obrázek 3** Stavba pokožky [3C]

Do vnitřního prostředí organismu mohou látky pronikat různými způsoby, přes těla buněk jednotlivých vrstev, mezibuněčným prostorem, mazovými a potními žlázami a vlasovými folikuly, a to zejména pasivní difuzí. Vedle pasivní difuze má na průniku látky vliv i podtlak vzniklý při odvádění krve a tkáňové tekutiny ze škáry, který má za následek jakési nasávání látky. Chemická látka se buď může vázat pouze v rohové vrstvě a společně se s jejími odlupujícími buňkami z organismu vyloučit (adsorpce) nebo prostupuje až do hlubších struktur, kde se mezibuněčný tkáňový mok setkává s cévami a prostupuje tak do systémové cirkulace, pak hovoříme o absorpci [5, 6].

Transdermální absorpci chemických látek přes lidskou kůži ovlivňují faktory jako pohlaví, věk a hydratace kůže. Je třeba si uvědomit, že na různých místech těla nabývá kůže různých tloušťek, a tím pádem dochází i na různých místech těla k rozdílným absorpcím látek do organismu. Při laboratorním testování transdermální absorpce se využívají lidské kůže odebrané z kožních štěpů ze zad, hrudníku či břicha nebo kůže prasečí či opičí. Je nutno brát v potaz to, že *in vitro* absorpce látek přes lidskou kůži bývá vyšší než při *in vivo* absorpci. Zohledňuje se věk, pohlaví dárce, místo odběru a podmínky pokusu. Kůže se používají pokud možno čerstvé s aktivním enzymatickým systémem (do dvou dnů po odběru), a buď v plné tloušťce, nebo seříznuté asi na polovinu, pak neobsahují celou vrstvu škáry, ale pouze její horní část. Lze použít i kůže mražené při  $-18$  až  $-20$  °C. Takové vzorky již aktivní enzymatický systém nemají a jsou mírně poškozeny krystalizací vody. Nicméně jejich výhoda spočívá v tom, že se dají použít i rok po uskladnění. Výjimečně se po rehydrataci používají kůže sušené nebo kůže umělé. Vhodným vzorkem je pouze kůže bez viditelného poškození, bez tetování či známek malignit, bez předchozího ošetření dezinfekčními prostředky. Po

odběru je kůže zbavena chloupků, ošetřena pouze mýdlem a vodou a je seříznuto podkoží. Poté se vzorky balí do aluminiové folie a zamrazí se [6].

### 1.3 Polycyklické aromatické uhlovodíky

PAU jsou organické sloučeniny, které obsahují pouze uhlík a vodík a jsou tvořeny nejméně dvěma benzenovými jádry. Na těchto kruhových strukturách nejsou žádné substituenty a nejsou přítomny žádné heteroatomy. Jsou to molekuly nenabitě, nepolární, v čistém stavu většinou bílé nebo žluté krystalické látky, jejichž fyzikální a chemické vlastnosti se mění s molekulovou hmotností konkrétního PAU. PAU s méně než čtyřmi kruhy, o relativní molekulové hmotnosti 128-178, bývají v plynném stavu, PAU se čtyřmi kruhy o relativní molekulové hmotnosti 202 mohou být jak plynné, tak pevné a PAU s relativní molekulovou hmotností větší než 228 jsou obvykle pevného skupenství. Spolu s rostoucí relativní molekulovou hmotností například klesá jejich těkavost či polarita a naopak roste lipofilita a bod varu. PAU, které se vyskytují v prostředí, většinou těkavé nejsou. Jsou to látky velmi málo rozpustné ve vodě a naopak dobře se rozpouští v tucích, olejích a organických rozpouštědlech, jako jsou acetonitril, toluen, aceton, benzen, xylen apod. PAU jsou jedny z nejběžnějších polutantů vznikajících především při nedokonalém spalování fosilních paliv jako je ropa, uhlí a dřevo. V zimě jsou koncentrace PAU v ovzduší několikanásobně vyšší než v létě. PAU v plynné fázi začínají od asi 150 °C kondenzovat a vázat se na prachové částice. Ve vodném prostředí se PAH váží na částice kalu a ukládají se v sedimentech. PAU mají charakteristický zápach, jejich páry dráždí oči a kůži, působí fotosenzibilizaci a mají negativní vliv na ledviny a játra. Nejdůležitějším poznatkem je, že jsou to látky karcinogenní. Asi nejznámějším karcinogenním PAU je benzo(a)pyren. Karcinogenita PAU stoupá spolu s počtem jejich kondenzovaných jader až do pěti, pak opět klesá. Dle IARC (mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny) jsou PAU podle stupně karcinogenity členěny do skupin (*Tabulka 1*) [7-9].

**Tabulka 1** Klasifikace karcinogenity PAU dle IARC [10]

SKUPINA	KARCINOGENITA	PŘÍKLAD
1	karcinogenní pro člověka	benzo(a)pyren
2A	pravděpodobně karcinogenní pro člověka	benz(a)antracen, dibenz(a,h)antracen
2B	možná karcinogenní pro člověka	benzo(b)fluoranthen, benzo(j)fluoranthen,
3	neklasifikováno jako karcinogenní pro člověka	fluoren
4	pravděpodobně není karcinogenní pro člověka	

IARC mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (z angl. International Agency for Research on Cancer)

### 1. 3. 1 Zdroje a využití polycyklických aromatických uhlovodíků

PAU se nacházejí všude kolem nás. Setkáváme se s nimi každý den. Jak už bylo zmíněno, jedná se o produkty nedokonalého spalování nebo se uvolňují z materiálů, které PAU obsahují, například asfalt. Do prostředí se dostávají při výrobě energie, hliníku a koksu, krakování ropy, z metalurgických procesů, spalování odpadů, silniční dopravy, z rafinérií a krematorií či při kouření a grilování. Dá se říci, že ve všech případech, kdy můžeme pozorovat tmavý kouř a vznik sazí, vzniká velké množství PAU. PAU ale vznikají v přírodě i přirozeně. Takovými přirozenými zdroji PAU je například vulkanická činnost a požáry. Nicméně přírodní zdroje PAU tvoří minoritní složku veškerých vyprodukovaných PAU. Podle některých studií významný podíl veškerého uhlíku ve vesmíru představují právě PAU [7, 11].

PAU mohou do organismu vstupovat několika způsoby, inhalačně, orálně, nebo přes kůži. Malé PAU vstupují rychleji, velké PAU s 5-6 kruhy pomaleji. Díky svojí lipofilitě mají tendenci se hromadit v tukové tkáni. Nemalá rizika pro organismus představuje například i kondenzát cigaretového kouře na kůži, kdy dochází k dermální absorpci PAU, nebo domácí prach, který obsahuje PAU v různé koncentraci a představuje rizika zejména pro malé děti. Čerstvé potraviny PAU většinou neobsahují, ale to se mění s jejich tepelnou úpravou, grilováním, pečením, smažením či opékáním nad otevřeným ohněm. Černý inkoust používaný pro tetování kůže nejenom že obsahuje PAU, které jsou pak trvale deponovány v kůži, ale také fenol, který je karcinogenní a má negativní vliv na CNS a ledviny [12-14].

### 1. 3. 2 Goeckermanova metoda léčby lupénky

Goeckermanova metoda využívá při léčbě lupénky kamenouhelný dehet a ultrafialové záření. Lupénka je chronické autoimunitní onemocnění kůže a u 10-20 % pacientů je možné pozorovat i onemocnění kloubů. Lupenkou může být postižené jakékoli místo na těle, zejména se ale vyskytuje v oblasti velkých kloubů. Faktorů vedoucích k propuknutí onemocnění je více. Jedná se především o dědičnost, nedědí se však choroba, ale pouze náchylnost k ní, a autoimunitnímu onemocnění, kdy dochází k uvolňování velkého množství cytokinů v bazálních vrstvách kůže, což vede k propuknutí chronického zánětu kůže, nadměrné tvorbě nových kožních buněk a jejich následnému odlupování. Nástup onemocnění může spolu v kombinaci s dědičnými faktory urychlit nebo zhoršit vliv vnějšího prostředí, jako je stres, životospráva, infekce, obezita, cukrovka, hormonální změny a působení některých léků. Prevalence lupénky v Evropě je 1-2 %, ve světě pak 2-3 %. U méně závažných forem lupénky se k léčbě užívají kortikosteroidy, černouhelný dehet a kalcitriol, které jsou účinnými látkami mastí a gelů určených pro lokální použití. Hlavní indikací pro léčbu dehtem Goeckermanovou metodou je chronická stacionární lupénka. Dehty jsou směsi aromatických uhlovodíků a dalších látek, které vznikají suchou destilací uhlí, dřeva a břidlice. Již Hippokrates před více než 2000 lety popsal léčebné využití dřevěného dehtu z jehličnanů. Koncem 19. století byly dehty zavedeny do běžné dermatologické praxe. Nicméně přes nesporné výhody je třeba mít na zřeteli, že PAU jsou v určitých koncentracích genotoxické a karcinogenní. Nejúčinnější jsou dehty kamenouhelné [12, 13].

Kamenouhelný dehet (*pix lithanthracis*) obsahuje především pyren, fenol, antracen a naftalen. Má hnědočernou barvu, je tekutý, málo rozpustný ve vodě s typickým zápachem po naftalenu. Účinky dehtu jsou především antiproliferativní, adstringentní, antiflogistické, antimykotické a antimikrobiální. Složité mechanismy působení nejsou zcela objasněny, ale k nejdůležitějším bezesporu patří potlačování syntézy DNA, což vede ke snížení epidermální hyperproliferace a k normalizaci porušené diferenciaci keratinocytů v kůži postižené lupenkou. Ozáření v oblasti vlnových délek 330-550 nm, má dehet výrazné fotosenzibilizující účinky, a to především díky přítomnosti antracenu a pyrenu. Goeckermanova metoda zahrnuje v různých modifikacích aplikaci kamenouhelného dehtu s následným ozářením v UV oblasti. Kombinace UVA záření (315-400 nm) a dehtu vede ke klinicky závažným fototoxickým reakcím, proto se používá UVB záření (280-315 nm), které je sice méně účinné, ale bez viditelných nežádoucích účinků. Pro výslednou účinnost léčby jsou důležité různé parametry metody, jako je koncentrace dehtu a celková doba jeho aplikace. Nejlepší výsledky a nejdelší

remise byly popsány po kontinuální 3-4 týdenní ústavní léčbě. Dnes se používají pasty obsahující 3-5 % farmaceutického dehtu, přičemž farmaceutický dehet obsahuje 30 % PAU, a následné ozáření UVB světlem. Nežádoucí účinky jsou folikulitida nebo kontaktní alergická reakce. Pokud je dehet aplikován na velké plochy kůže, pak nelze opomenout možná systémová rizika. Jedná se především o neurotoxické a hepatotoxické účinky [12-14].

Ve studii, která proběhla v letech 2004-2016 na Lékařské fakultě v Hradci Králové, bylo vyšetřeno celkem 320 pacientů (228 dospělých a 92 dětí) léčených Gockermanovou metodou s farmaceutickým dehtem o složení uvedeném v *Tabulce 2*. Byla sledována dermální absorpce PAU, imunotoxická a genotoxická odpověď organismu na dermální expozici PAU a UV záření. Rozsah expozice byl maximálně na 83 % povrchu těla. Před a po terapii se pacientům odebírala krev a moč. Jako ukazatel dermální absorpce PAU sloužily hladiny 1-hydroxypyrenu, 1-hydroxyfenanthrenu, 2-hydroxyfenanthrenu, 3-hydroxyfenanthrenu a 4-hydroxyfenanthrenu v moči. Ukazatelé imunotoxického rizika byly Treg (specializovaná populace T lymfocytů s CD163 monocyto-makrofágovým receptorem), Toll-like receptor (TLR 2), imunoglobuliny, CRP, IL-6, TNF-alfa a jako ukazatelé genotoxicity pak hladiny nukleosomů, proteinu p53, benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid-DNA komplexů, cirkulujících protilátek proti benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid-DNA komplexům v séru, dále pak DNA zlomy (Comet Assay) a chromosomální aberace v periferních lymfocytech. Výsledkem studie byl závěr potvrzující vysokou účinnost léčby dehtem v kombinaci s UV, ale i nežádoucí vysokou dermální absorpci PAU a jejich mutagenní a genotoxické účinky. Doporučením bylo modifikovat terapii tak, aby měla dostatečnou účinnost, ale menší rizika [15-18].

**Tabulka 2** Vybrané PAU ve vzorcích farmaceutického dehtu [16]

<b>VYBRANÉ PAU VE VZORCÍCH FARMACEUTICKÉHO DEHTU</b>			
<b>PAU</b>	<b>IARC</b>	<b>% hmotnosti</b>	<b>mg/g</b>
benzo(a)pyren	1	0,3-1,0	0,008
dibenz(a,h)antracen	2A	0,3-0,6	< 0,001
naftalen	2B	10,2-11,8	3,286
Benz(a)antracen	2B	0,7-1,2	< 0,001
chrysen	2B	0,3-0,9	0,028
benzo(b)fluoranthen + benzo(k)fluoranthen	2B	0,3-0,7	< 0,001
indeno(1,2,3-c,d)pyren	2B	0,2-0,5	< 0,001
acenaften	3	0,2-0,4	0,104

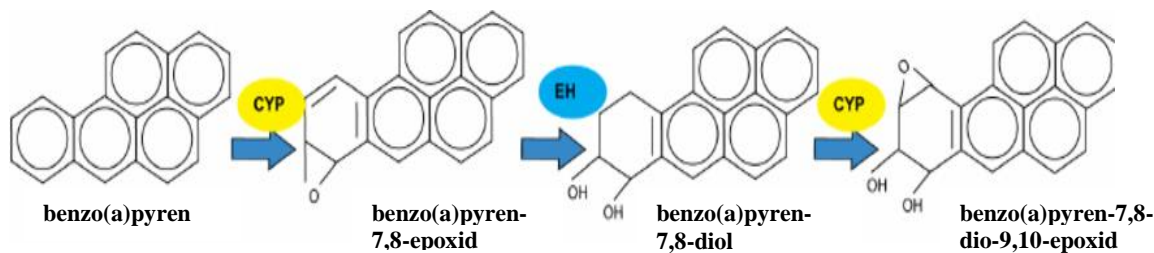


fluoren	3	1,8-2,1	0,299
fenanthren	3	4,8-7,1	2,520
antracen	3	1,3-1,5	2,494
fluoranthren	3	2,2-2,9	0,413
pyren	3	3,3-4,2	0,241
benzo(g,h,i)perylene	3	0,2-0,4	< 0,001
acenaftalen	-	0,5-1,2	0,153

PAU, polycyklické aromatické uhlovodíky; IARC, mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny

## 1. 4 Metabolismus polycyklických aromatických uhlovodíků

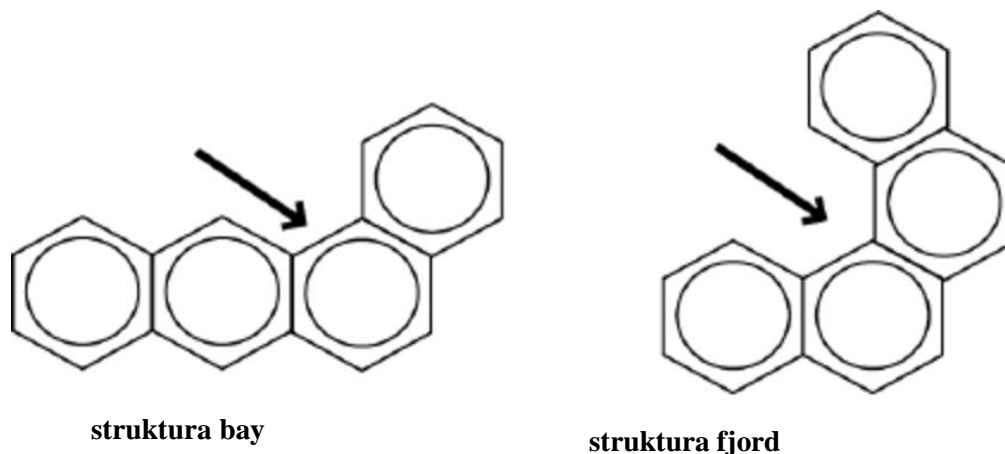
Metabolismus PAU začíná již v epitelové vrstvě plicní tkáně, trávicí trubici a kůži. Hlavním místem, kde jsou PAU metabolizovány, jsou játra, mohou být metabolizovány i v řadě jiných orgánů, například v ledvinách a plicích. PAU se vylučují do žluče, moči nebo mateřského mléka a hromadí se v omezeném množství v tukové tkáni. Sami o sobě jsou PAU inertní, v organismu, ať už živočišném nebo rostlinném, podléhají procesům biotransformace. Biotransformačními pochody, za katalýzy odpovídajícími enzymy, dochází k jejich detoxikaci, ale v některých případech mohou být přeměněny na mnohem reaktivnější sloučeniny, například epoxidy. Tyto daleko reaktivnější látky reagují s DNA a poškozují ji. Existují tři hlavní cesty aktivace PAU, tvorba PAU radikálového kationtu, vzniklého oxidací katalyzovanou peroxidasou cytochromu P450, tvorba PAU-o-chinonů, vzniklých oxidací katalyzovanou dihydrodioldehydrogenasou a nakonec tvorba dihydrodiolových epoxidů za katalýzy cytochromy P450. Biotransformační pochody probíhají ve dvou fázích. V první fázi biotransformace dochází k oxidačním reakcím. Tyto oxidační reakce jsou katalyzovány mikrosomálním systémem monooxygenasy endoplazmatickém retikulu, jako jsou cytochromy P450 (CYP) a peroxidasy, nebo NAD(P)H:chinon-oxidoreduktasa. Při biotransformaci PAU se uplatňují zejména cytochromy CYP1A1 (mimojaterní tkáň), CYP1A2 (játra), CYP1B1 (nádorová tkáň) a CYP3A4. Při těchto reakcích, kdy je polární skupina (-OH, -SH, -NH<sub>2</sub>) zavedena do molekuly lipofilního PAU, vznikají hydroxylované a epoxidované deriváty PAU, které jsou hydrofilní a reagují s DNA. Tvorba dihydrodiolových epoxidů je nejběžnějším mechanismem metabolické aktivace PAU, například z benzo(a)pyrenu přes benzo(a)pyren-7,8-epoxid a benzo(a)pyren-7,8-diol vzniká benzo(a)pyren-7,8-dio-9,10-epoxid (*Obrázek 4*) [21, 22].



**Obrázek 4** Mechanismus aktivace benzo(a)pyren [4D]  
CYP, cytochrom P450; EH, epoxidhydrolasa

V druhé fázi biotransformace PAU dochází ke konjugaci produktů první fáze biotransformace s endogenními sloučeninami, jako jsou glutathion, kyselinou glukuronová nebo sulfát. Konjugační reakce katalyzují glutathion-S-transferas a (GSTM1, GSTP1, GSTT1), UDP-glukuronosyltransferasa (UGT) a sulfottransferasa (SULT). Vzniklé konjugáty jsou polární a tedy lépe rozpustné ve vodě. Tímto způsobem je zajištěno jejich vyloučení z organismu. Aktivita GST souvisí s genotoxickým poškozením, přinejmenším v placentě, proto lze GST použít jako biomarker expozice PAU. Oxidované benzo(a)pyrenové deriváty jsou běžnými substráty UDP-glukuronyltransferasy, metabolity 1-hydroxypyren-glukuronid a 1-hydroxypyren se používají také jako biomarkery expozice PAU. Ať už PAU vstoupí do organismu jakoukoli cestou, tj. inhalační, orální či dermální, jsou vždy vylučovány močí nebo stolicí. PAU s nižší relativní molekulovou hmotností se vylučují močí, stolicí se vylučují PAU s čtyřmi a více aromatickými jádry [21, 23].

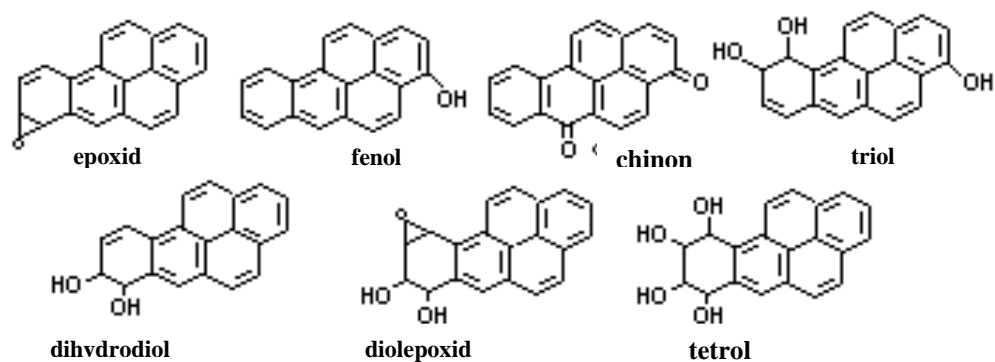
Některé PAU jsou reaktivnější než jiné. Je to dáno nejenom jejich molekulovou hmotností, ale také jejich strukturou. Některé PAU tvoří takzvaný *bay region* (oblast zátoky) a některé *fjord region* (oblast fjordu), (Obrázek 5). Právě díky těmto oblastem se PAU kovalentně váží na nukleofilní části DNA. Na adenin se přednostně váží PAU mající fjord region a na guanin pak PAU mající bay region. Vznikají kovalentní adukty, které jsou karcinogenní a mutagenní. Pokud kontrolní mechanismy v organismu nepracují správně, mutace se hromadí a mohou vyvolat karcinogenezi [24].



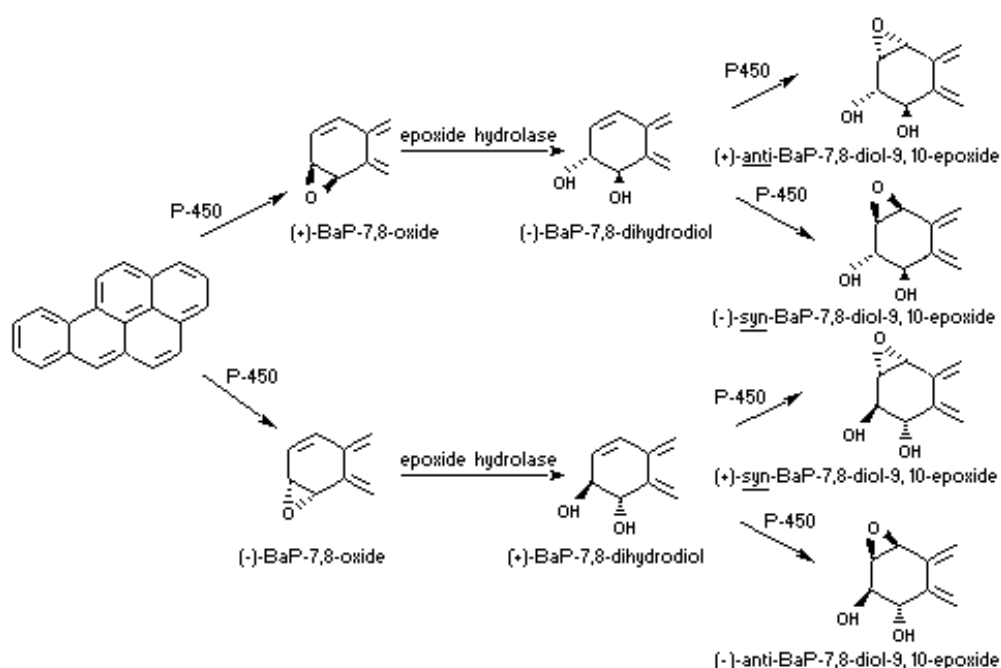
**Obrázek 5** Struktury Bay (oblast zátoky) a Fjord (oblast fjordu) polycyklických aromatických uhlovodíků [5E]

#### 1. 4. 1 Metabolismus benzo(a)pyrenu

Benzo(a)pyren (BaP), je dle IARC řazen do skupin 1, tedy je prokázaným karcinogenem. Jeho metabolity se kovalentně váží na DNA a způsobují tak mutace. Stejně tak jako všechny PAU i BaP, ke svému biologickému působení vyžaduje metabolickou aktivaci. V organismu absolvuje obě fáze biotransformace. Prvně je oxidován systémem CYP (CYP1A1 a CYP1B1) a peroxidas za vzniku epoxidů. Vzniklé epoxidy se spontánně přeskupí za vzniku fenolů (3-hydroxy-, 6-hydroxy-, 7-hydroxy- a 9-hydroxy-BaP) a následnou hydratací vznikají dihydrodioly (4,5-, 7,8- nebo 9,10-dihydrodioly). Hydratace je katalyzována epoxid hydrolasou. Vzniklé dihydrodioly mohou být za účasti CYP dále oxidovány až na dihydrodiolepoxy (BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid), (*Obrázek 6 a 7*), které vytvářejí s DNA kovalentní adukty. Přítomností chirálních uhlíků v oblasti bay region existuje vždy několik stechiometrických forem příslušné sloučeniny. Mohou vznikat celkem čtyři opticky aktivní isomery každého diolepoxy (+)/(-)-*anti*- a (+)/(-)-*syn*-BaP-7,8-diol-9,10-epoxid (*Obrázek 7*). Z diolepoxy vznikají otevřením epoxidového kruhu elektrofilní částice, které reagují zejména s purinovými bázemi, deoxyguanosinem a deoxyadenosinem, přičemž každý produkt může být v konformaci *cis* nebo *trans*. Nejčastěji se vyskytujícím DNA aduktem je 10-(deoxyguanosin-N-2-yl)-7,8,9-trihydroxy-7,8,9,10-tertrahydro-BaP [24, 26].



**Obrázek 6** Struktura metabolitů benzo(a)pyrenu [6F]

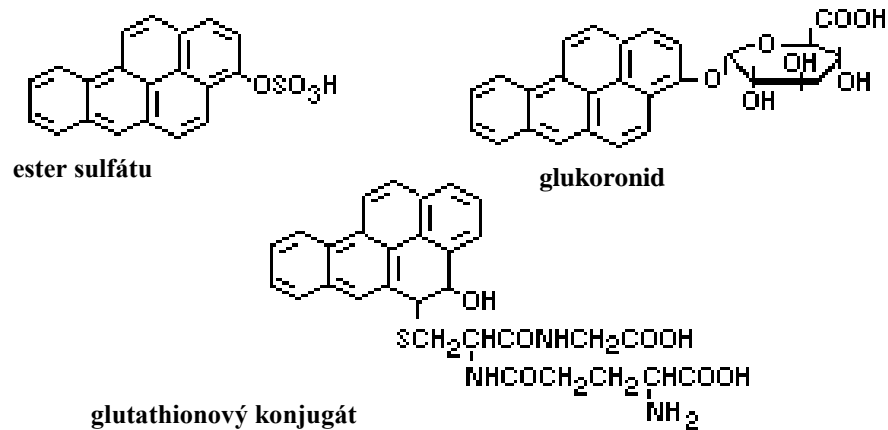


**Obrázek 7** Metabolická aktivace benzo[a]pyrenu za vzniku isomerních forem benzo(a)pyren-7,8-diol-9,10-epoxidů [7G]

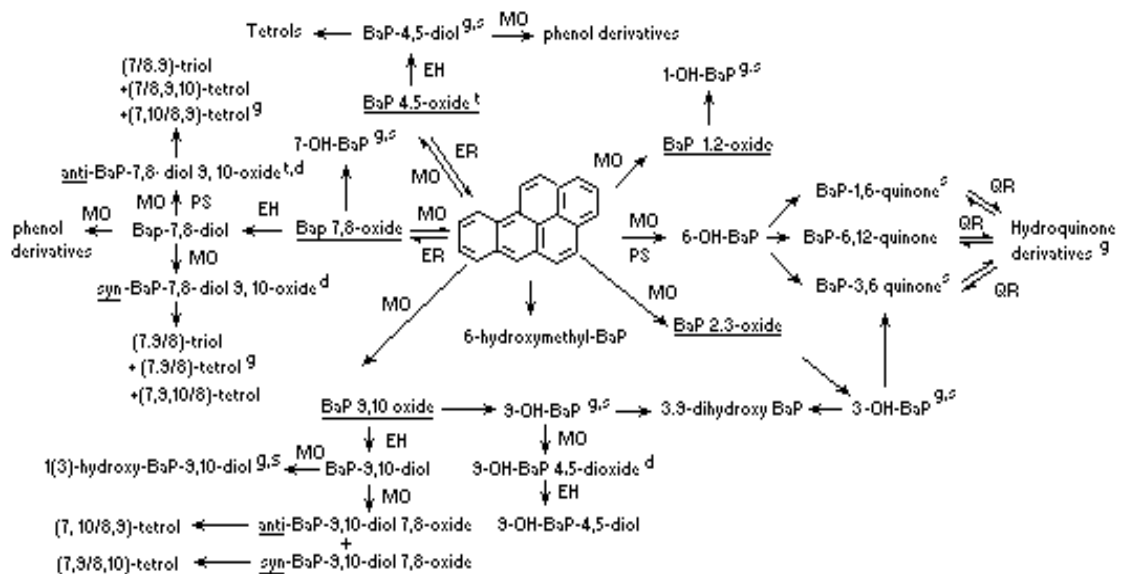
6-Hydroxybenzo(a)pyren se dále oxiduje buď spontánně, nebo metabolicky na 1,6-, 3,6-, nebo 6,12-chinon. 3-hydroxybenzo(a)pyren je metabolizován na 3,6-chinon a 9-hydroxybenzo(a)pyren je metabolizován na 9-hydroxy-4,5-dihydrodiol. Tyto deriváty mají schopnost opakovaně vstupovat do redoxních cyklů, během kterých vznikají reaktivní formy kyslíku (ROS). Jsou to např. superoxidové anionty, hydroxylové a peroxylové radikály. Pokud není mezi tvorbou ROS a jeho odstraňováním rovnováha, nastává tzv. oxidační stres a díky přebytku volných radikálů kyslíku dochází k poškození DNA. Volné radikály se pak podílejí na tvorbě řetězcových zlomů a vzniku vysoce mutagenního 7-hydro-8-oxo-20-deoxyguanosinu, který byl nalezen v lidských nádorových buňkách karcinomu plic. Fenoly,

chinony a dihydrodioly mohou být konjugovány s glutathionem, sulfátem a kyselinou glukuronovou (Obrázek 8) za účasti GST, SULT a UGT, ve většině případů tak dochází k jejich detoxikaci. Například GST katalyzuje konjugaci epoxidů s glutathionem za vzniku konjugátu, který je pak v játrech a ledvinách přeměněn na konečný produkt, který je vyloučen močí [23-26].

Souhrnná biotransformace BaP je uvedena na Obrázku 9.



Obrázek 8 Struktura konjugátů benzo(a)pyrenu [8H]



Obrázek 9 Souhrnné schéma biotransformace benzo(a)pyrenu [9I]

### **1. 4. 2 Metabolismus polycyklických aromatických uhlovodíků v kůži**

Enzymy, které se účastní první i druhé fáze metabolismu cizorodých látek, se nachází v kůži v mnohem menších koncentracích, než v játrech a ledvinách. Většinu těchto enzymů můžeme nalézt v keratinocytech, proto také právě zde je metabolizováno největší množství PAU. Podle *in vitro* testu s radioaktivně značeným BaP [27], metabolismus PAU může probíhat i v melanocytech. HPLC analýzou byla prokázána přítomnost metabolitů BaP. První fáze metabolismu PAU se účastní především CYP, v lidské kůži se jich nachází devatenáct. Jde o podskupiny CYP1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2A7, 2B6, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 2J2, 2R1, 2S1, 2U1, 2W1, 3A4, 3A5, 3A7. Pro biotransformaci PAU je důležitý zejména CYP 1A1, který se nachází v bazální vrstvě keratinocytů, v celé epidermis je přítomen CYP1A2 a CYP 1B1. Mimo CYP se biotransformace exogenních látek v první fázi účastní i alkoholdehydrogenasy, aldehyddehydrogenasy, epoxidhydrolasy, amidasy, esterasy a flavindependentní monooxygenasy. Do druhé fáze biotransformace se zapojuje acetyltransferasa a methyltransferasa, glukuronosyltransferasa, sulfottransferasa a glutathion-S-transferasa. Všechny tyto enzymy jsou v kůži přítomny [27].

### **1. 5 Účinky polycyklických aromatických uhlovodíků**

PAU způsobují závažné mutagenní a karcinogenní změny v organismu. I přesto, že dosud nebyla prokázána akutní toxicita pro člověka, nebezpečí karcinogenity je značné. Toxicita a karcinogenita nezávisí pouze na koncentraci PAU, ale obzvláště na době kontaktu a druhu PAU. Nejvyšší míru mutagenity mají PAU s pěti kruhy PAU snadno přecházejí skrz placentu. Karcinogenní jsou především některé metabolity PAU, například diolepoxydy a radikály PAU. Různé teorie mechanismu karcinogenity PAU berou v úvahu jejich chemickou strukturu (oblast zátoky) a jejich ionizační potenciál. PAU jsou postupně metabolizovány na oxidy a dihydrodioly a jejich následnou oxidací vznikají diolepoxydy, které jsou nejreaktivnější, reagují s guaninem a adeninem DNA. To vede ke vzniku DNA aduktů, které jsou mutagenní. Diolepoxydy mimo jiné zvyšují expresi vaskulárního endoteliálního růstového faktoru [26, 28].

Dalším možným mechanismem je tvorba hydroxymethyl-PAU, které jsou přeměněny na reaktivní sulfátstery, které reagují s DNA za vzniku odpovídajících aduktů. Tyto dukty vedou svým účinkem k mutaci tumor supresorového genu (TP53), jehož produktem je transkripční faktor protein p53. V cytoplazmě většiny buněk je přítomen receptor pro aromatické uhlovodíky (AhR), po jeho aktivaci navázáním PAU vzniká komplex, který

vstupuje do buněčného jádra. Zde může ovlivnit expresi různých genů (CYP1A1), jejichž produkty jsou enzymy, které se podílejí na biotransformaci PAU na reaktivnější metabolity. Tyto reaktivní metabolity PAU reagují s DNA. Aktivace AhR indukuje také expresi genu pro cyklooxygenasu 2 (COX-2), která katalyzuje přeměnu arachidonové kyseliny na prostaglandiny a zahajuje tak zánětlivou kaskádu generující ROS. ROS a volné radikály hrají významnou úlohu ve stárnutí kůže, autoimunitě, karcinogenezi a fotosenzitivitě [26, 28, 29].

Tvorba adduktů s DNA a ROS není jediným mechanismem, kterým PAU vyvolávají karcinogenezi. Dalším nebezpečím je jejich podobnost se steroidními hormony, PAU tak mohou aktivovat estrogení receptory (ER) [30].

Nejvýznamnějším mechanismem karcinogeneze je nedostatečná oprava poškozené DNA u klíčových genů, které se podílejí na regulaci buněčného cyklu. Vzhledem k tomu, že expozice PAU je dlouhodobá, je poškození DNA kumulativní. Několik studií spojilo chronickou expozici PAU s různými typy rakoviny, jako jsou rakovina močového měchýře, plic, ledvin, jater a prsu [31, 32].

Po vstupu do organismu, PAU inhibují diferenciaci monocytů na makrofágy, endocytózu, fagocytózu, produkci cytokinů, snižují proliferaci T-lymfocytů, zvyšují aktivitu NK-buněk a zvyšují počet chromosomálních aberací periferních lymfocytů. Je také znám inhibiční vliv expozice BaP na B-lymfocyty. Některé studie potvrdily možnou asociaci expozice PAU s alergickou reakcí. Dermální expozice i inhalace zvyšuje hladiny imunoglobulinů třídy E (IgE). PAU tvoří s DNA adukty, které se usazují v cévních stěnách a tím se mohou zapojit do procesu vzniku aterosklerózy. V játrech, ledvinách, plicích a srdci se nachází CYP1A1, který aktivuje PAU na reaktivní metabolity, které ve svém důsledku mohou způsobovat karcinogenezi. Například epitelové buňky močového měchýře obsahují enzymy CYP 1B1 a 4B1, jejichž účinkem jsou PAU aktivovány. Vzniklé adukty s DNA vedou k tvorbě nádorů močového měchýře. PAU působí také neurotoxicky. CYP1A1 se nachází v mozkové tkáni a dalo by se očekávat, že mechanismus biotransformace PAU bude stejný, jako v ostatních tkáních, obsahujících tento enzym. Nicméně CYP1A1 v mozku má delecii na exonu 6 a díky tomu nemůže vázat BaP. PAU mají vliv i na reprodukci. U mužů způsobují změnu morfologie spermií a snižují tím jejich plodnost. Exponovaní jedinci jsou také náchylnější k rakovině prostaty. Expozice PAU v prenatálním a časném postnatálním období má vliv na správný vývoj dítěte, může změnit normální vývoj metabolických, imunitních a neurologických

funkcí. Důvodem je vyšší proliferace buněk, nezralý imunitní systém, snížená schopnost detoxikace a oprav poškozené DNA. Metabolity PAU mohou také poškozovat oční čočku a vést ke vzniku šedého zákalu. Lidé s enzymem CYP1B1\*3/\*3 jsou po expozici PAU náchylní k různým karcinomům hlavy, hltanu, hrtanu a dutiny ústní [33, 34].

## **1. 6 Přehled významných polycyklických aromatických uhlovodíků**

### **1. 6. 1 Fenanthren**

Fenanthren je bezbarvá krystalická látka se slabým aromatickým zápachem, jejíž roztoky vykazují modrou fluorescenci. Jeho molekula je tvořena třemi benzenovými jádry utvářející oblast zátoky (bay region). Díky této struktuře má fenanthren karcinogenní účinky. Fenanthren je isomerem antracenu. Dobře se rozpouští v organických rozpouštědlech (acetonitril, benzen, ethanol, toluen). Jeden gram fenanthrenu je možno rozpustit v 60 ml studeného 95% alkoholu, v 10 ml vroucího 95% alkoholu nebo v 25 ml absolutního alkoholu. Jeden gram fenanthrenu lze rozpustit v 2,4 ml toluenu nebo tetrachlormethanu, ve 2 ml benzenu a v 1 ml sirouhlíku. Dobře rozpustný je také v ledové kyselině octové. UVzáření absorbuje při vlnových délkách > 290 nm [35-37].

### **1. 6. 2 Naftalen**

Naftalen je bílá krystalická těkavá látka s charakteristickou vůní uhelného dehtu. Získává se buď z uhelného dehtu, nebo destilací ropy. Používá se hlavně k výrobě anhydridu kyseliny ftalové, různých mazadel a také provýrobu odpuzujících látek proti molům. Je velmi špatně rozpustný ve vodě, ale dobře rozpustný v organických rozpouštědlech. Jeden gram naftalenu lze rozpustit v 13 ml ethanolu nebo methanolu, 3,5 ml benzenu nebo toluenu, 8 ml olivového oleje, 2 ml chloroformu a tetrachlormethanu, nebo 1,2 ml sirouhlíku. Inhalace naftalenu, požití a styk s kůží je spojeno s hemolytickou anémií, poškozením jater, neurologickým poškozením a poškozením sítnice. Kožní a gastrointestinální absorpce je usnadněna, když je naftalen podáván s olejem nebo tukem. Předpokládá se, že naftalen je pro člověka karcinogenní a může být spojen se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu hrtanu a konečníku. Naftalense nachází v černém ořechu a mnoha esenciálních olejích. Má schopnost fluorescence a absorbuje UV záření o vlnové délce 275 nm [37, 38].

### **1. 6. 3 Pyren**

Pyren je bezbarvá pevná látka, jejíž roztoky vykazují slabou modrou fluorescenci. Její molekula se skládá ze čtyř kondenzovaných benzenových kruhů. Jedná se o látku



s poměrně nízkou toxicitou a není karcinogenní. Pyren je rozpustný v ethanolu, ethyletheru, sirouhlíku, benzenu, toluenu, lehce rozpustný v tetrachlormetanu. Absorbuje UV záření o vlnové délce 335 nm. Pyren je standardní součástí směsi PAU vyskytujících se v životním a pracovním prostředí. Po vstupu do organismu se rychle biotransformuje za vzniku různých metabolitů [39-44].

#### **1. 6. 4 Benzo(a)pyren**

Je žlutý krystalický PAU tvořící drobné jehličky. Skládá se z pěti kondenzovaných benzenových jader s oblastí zátoky (*bay region*). Jeho diolové metabolity reagují s DNA, což vede k mutacím, případně vzniku nádorového onemocnění. Dobře se rozpouští v methanolu, ethanolu, benzenu, toluenu, xylenu, etheru a chloroformu, ve vodě je prakticky nerozpustný. BaP se nachází hlavně ve výfukových plynech a naftě, cigaretovém kouři a uhelném dehtu. Snadno se vstřebává ze střev a hromadí se v tukové tkáni [45-50].

#### **1. 6. 5 Anthracen**

Antracen je bezbarvá krystalická látka, na světle tmavne. Je tvořen ze tří za sebou umístěných aromatických jader bez oblastí zátoky a fjordu. Dobře se rozpouští v ethanolu, methanolu, benzenu, toluenu, sirouhlíku a hůře v acetonu. Jeden gram se rozpustí v 67 ml absolutního alkoholu, 70 ml methanolu, 62 ml benzenu, 85 ml chloroformu, 200 ml etheru, 31 ml sirouhlíku, 86ml tetrachlormethanu a 125 ml toluenu. Používá se především jako meziprodukt při výrobě barviv, scintilačních krystalů a organických polovodičů [51, 52].

#### **1. 6. 6 Benz(a)anthracen**

Benz(a)anthracen je bezbarvá krystalická látka, roztok vykazuje zeleno-žlutou fluorescenci. Je dobře rozpustný ve většině organických rozpouštědlech. Ve vodě se rozpouští velmi špatně. Jeho struktura obsahuje čtyři kondenzované kruhy. Primárně je obsažen v benzínu a výfukových plynech, uhlí, sazí, tabáku, cigaretovém kouři, asfaltu a minerálních olejích. Jedná se o genotoxickou a karcinogenní látku [53, 54].

#### **1. 6. 7 Fluoren**

Fluoren je tvořen dvěma benzenovými jádry, mezi nimiž se nachází cyklopentan. Za pokojové teploty jde o bílou krystalickou látku se schopností fialové fluorescence. Zápachem připomíná naftalen. Ve vodě se téměř nerozpouští, stejně jako v mnoha organických rozpouštědlech. Výjimku tvoří například aceton, ether a benzen. Je také rozpustný v ledové kyselině octová. Fluoren lze získat z uhelného dehtu, redukcí fluorenonu zinkem nebo dehydrogenací

difenylmethanu. Vzniká při nedokonalém spalování uhlí, olejů, dřeva, odpadu a tabáku. Jeho expozici čelí zejména pracovníci v průmyslových odvětvích, kteří mohou vdechovat jeho výpary nebo přijít do přímého kontaktu se sazemí. Nachází se také v tabákovém kouři, výfukových plynech a grilovaných pokrmech. Fluoren uvolněný do životního prostředí se na vzduchu rozkládá slunečním zářením. Bylo prokázáno, že se hromadí v některých druzích ryb [55-57].

V *Příloze 1* jsou uvedeny základní charakteristiky vybraných PAU, včetně jejich strukturních vzorců.

## **1. 7 Metody stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků**

PAU mají schopnost bioakumulace, jsou rezistentní a lehko se váží na pevné částice. Stanovení PAU v zeminách, sedimentech či vodách je zahájeno extrakcí PAU ze vzorku vhodným rozpouštědlem, což obvykle bývá hexan. Dále je extrakt přečištěn a analyzován. Pro stanovení PAU se nejčastěji používají chromatografické metody. Dříve se pro stanovení PAU používala chromatografie na tenké vrstvě (TLC), ale dnes je TLC používána spíše jen pro orientační stanovení. Největší zastoupení má v praxi plynová chromatografie (GC) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).

### **1. 7. 1 Plynová chromatografie**

Separace PAU GC je v převážné míře prováděna na křemenných kolonách se středně polární chemicky vázanou polysiloxanovou stacionární fází. Kromě univerzální plamenově ionizační detekce (FID), nachází stále širší uplatnění přímé spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). GC má vysokou separační účinnost a separované PAU lze snadno identifikovat [60-62].

Před samotným stanovením GC je zapotřebí PAU ze vzorku extrahovat. Používají se techniky kapalina-kapalina, extrakce tuhou fází (SPE) nebo superkritická fluidní extrakce (SFE). Při SFE existuje superkritická kapalina v jediném kondenzovaném stavu nad svým kritickým tlakem a teplotou s vlastnostmi mezi plynem a kapalinou. Má tedy hustotu blízkou kapalinám a viskozitu podobnou plynům. Proto je využitelná jako kapalné rozpouštědlo a díky viskozitě podobné plynům snadno proniká do porézních materiálů. Při spojení GC s MS jsou PAU v ideálním případě identifikovány porovnáním jejich retenčních časů a hmotnostních spekter s retenčními časy a hmotnostními spektry standardů. Některé standardy PAU mohou být nedostupné, pak je identifikace PAU založena na interpretaci jeho hmotnostního spektra a shody s knihovnou spekter. V porovnání s HPLC s fluorimetrickou detekcí je GC/MS náročnější na přístrojové vybavení, také nároky na kompetenci a znalost pracovníků jsou rovněž vyšší. Technika GC/MS je upřednostňována pro analýzu komplexních směsí PAU, která vyžaduje vysokou separační účinnost [62, 63].

### **1. 7. 2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie**

U vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) je vzorek unášen proudem kapalné mobilní fáze skrz kolonu, kde je fáze stacionární. Dělení látek probíhá podle rozdílné afinity k mobilní a stacionární fázi. Pro stanovení PAU metodou HPLC se pro jejich detekci nejčastěji používá fluorescenční, UV nebo hmotnostní detektor. Nevýhodou HPLC oproti GC je delší doba analýzy a nižší účinnost separace. Ve snaze zkrátit dobu analýzy a zvýšit

účinnost separace, se dnes vyrábí kolony s malou velikostí sorbentu (2  $\mu\text{m}$ ). Trendem je použití povrchově porézních mikročastic s tuhým jádrem, čímž lze docílit až o polovinu kratší dobu analýzy a lepší rozlišení (užší píky na chromatografu) [63, 64].

Pro stanovení PAU v různých vzorcích je v současné době nejvíce využívána HPLC s obrácenými fázemi (RP-HPLC). Jako stacionární fáze se nejčastěji používá oktadecyl (C18) vázaný na silikagelu, mobilní fází bývá směs vody s acetonitrilem (ACN) nebo metanolem. Detekce je buď UV, kdy se používá detektor s diodovým polem, nebo fluorimetrická. Pro stanovení PAU v odpadních, podzemních a pitných vodách je doporučenou metodou podle agentury pro ochranu životního prostředí spadající pod federální vládu USA (US EPA) metoda HPLC s UV nebo fluorescenční detekcí. PAU vykazují celkem charakteristická UV spektra a většina rovněž fluoreskuje. Fluorescenční detekce (FD) ve spojení s HPLC je vhodná pro kvantitativní stanovení PAU ve stopových množstvích. Také se používá k analýze metabolitů PAU jako ukazatelů znečištění životního prostředí [64-66].

## **2 CÍL PRÁCE**

Cílem práce je určit prostup vybraných PAU přes lidskou kůži a zjistit, zda koncentrace daného PAU na povrchu kůže má vliv na množství PAU, které pronikne skrz kůži do receptorové tekutiny.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Pomůcky a přístroje

- Analytické váhy Kern ABJ 320-4NM, (Kern&Sohn, Balingen, Německo)
- Centrifuga Rotina 380 (Hettich, Tuttlingen, Německo)
- Dotykový teploměr Oberflächen-Thermostick DOT 150 pro měření kožního povrchu (Voltcraft, Conrad Electronic, Hirschau, Německo)
- Injekční stříkačky Braun, 2 ml (B. Braun, Melsungen, Německo)
- Injekční stříkačky Chirana, 10 ml (Chirana, Nové Město na Moravě, Česká Republika)
- Injekční jehly Sterican Neur 0,80x120 mm, (B. Braun, Melsungen, Německo)
- Kapalinový chromatograf (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)
  - Vysokotlaká pumpa LC-20AD s čtyřcestným nízkotlakým ventilem a odplyňovačem DGU-20A5
  - Analytická kolona (Nucleodur 100-3 C18ec, 125 x 3 mm, 3 µm), (Macherey-Nagel, Düren, Německo)
  - Autosampler SIL-20AC
  - Termostat kolon CTO-20AC
  - Fluorescenční detektor RF-20AXL
  - Řídicí systém CBM-20A
  - Software LC Solution
- Kroužky ze silikonové gummy o tloušťce 3 mm (vyrobena na provozně-technickém oddělení Lékařské fakulty UK v Hradci Králové, Česká Republika)
- Magnetické míchadlo s ohřevem Ikamag-RT 15 (IKA-Werke, Staufen, Německo)
- Modifikované Franzovy difúzní komůrky (průměr skleněné válcové nádoby 1,5 cm, penetrační plocha 1,77cm<sup>2</sup>, objem receptorové části komůrky 10 ml, Laboratorní sklo Jiří Pokorný, Hradec Králové, Česká republika)
- Pipety Biohit M-line, (StarLab, Hamburk, Německo)
- Plastový držák na difúzní komůrky (vyrobený na provozně-technickém oddělení Lékařské fakulty UK v Hradci Králové, Česká Republika)
- Polypropylenové zkumavky Eppendorf PP-3810X, objem 1,5 ml (Eppendorf AG, Hamburk, Německo)

- Předvážky Kern Laborwaage 440-47N, (Kern&Sohn, Balingen, Německo)
- Přenosný chladicí box
- Přístroj na měření transepidermální ztráty vody (TEWL) - MPA 5 (Courage+Khazaka, Kolín nad Rýnem, Německo)
- Přístroj k měření transdermálního elektrického odporu (TER) – Tecpel LCR 612 (Tecpel Co, Nová Tchaj-pej, Tchaj-wan)
- Silnostěnná skleněná nádoba
- Skleněné vialky z hnědého skla (4 ml) a víčka s teflonovými septy (Chromservis, Praha, Česká Republika)
- Skleničky na louhování kroužků (zavařovací sklenice mini, 41 ml)
- Sřídkačkové filtry PTFE, 0,45  $\mu\text{m}$ , průměr 13 mm, (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA)
- Špičky Optifit (Sartorius, Gottingen, Německo)
- Třepačka Reax Control (Heidolph, Šwabach, Německo)
- Třepací vodní lázeň GFL-1083 (Verkon, Praha, Česká Republika)
- Ultrazvuková vana P702, (GT Sonic Co., Guangdong, Čína)
- Zábrusové zkumavky
- Ostatní: pryžové gumičky, alobal, párátka, odměrné válce, chladnička, lednička, odměrné válce

### 3. 1. 2 Chemikálie

- Acetonitril pro HPLC,  $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ ,  $M = 41,05 \text{ g/mol}$  (Merck, Darmstadt, Německo)
- Bovinní sérový albumin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Chlorid sodný,  $\text{NaCl}$ ,  $M = 58,44 \text{ g/mol}$  (Lachema, Brno, Česká republika)
- Deionizovaná voda,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $M = 18,00 \text{ g/mol}$ ,  $G = 0,055 \mu\text{S}$
- Fosfátový pufr,  $\text{pH} = 7,4$ ,  $1,0 \text{ M}$  (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Isopropylmyristát,  $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$ ,  $M = 270,45 \text{ g/mol}$  (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina dusičná,  $\text{HNO}_3$ ,  $M = 63,01 \text{ g/mol}$  (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina octová 100%,  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ,  $M = 60,05 \text{ g/mol}$ ,  $\rho = 1,05 \text{ g/cm}^3$  ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ), (Merck, Darmstadt, Německo)
- Methanol pro HPLC,  $\text{CH}_4\text{O}$ ,  $M = 32,04 \text{ g/mol}$  (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Penicilin se streptomycinem (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Pyren,  $\text{C}_{16}\text{H}_{10}$ ,  $M = 202,26 \text{ g/mol}$  (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

- Toluén, C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>, M = 92, 14 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

### 3. 1. 3 Roztoky a vzorky

- Deionizovaná voda

Deionizovaná voda pro přípravu mobilních fází byla přefiltrována skrz nylonový filtr o porozitě 0,2 µm.

- Směs acetonitrilu a vody (25:75, v/v), mobilní fáze A

Mobilní fáze A byla připravena smícháním 250 ml ACN s 750 ml vody a odvzdušněna ultrazvukem (10 minut).

- Směs acetonitrilu a kyseliny octové (1000:2, v/v), mobilní fáze B

Mobilní fáze B byla připravena smícháním 1000 ml ACN s 2 ml ledové kyseliny octové a odvzdušněna ultrazvukem (10 minut).

- Roztok pyrenu v isopropylmyristátu (asi 70 mg/ml)

Do skleněné zkumavky o objemu 7 ml bylo odváženo 280 mg PYR a přidány 4 ml isopropylmyristátu (IPM). Zkumavka byla uzavřena skleněnou zátkou, obsah třepán na třepačce 30 min při 1500 rpm a odstředěn (19520  $\times$  g) po dobu 10 minut. Injekční stříkačkou byl odebrán supernatant (3 ml) a přefiltrován skrz nylonový filtr o porozitě 0,2 µm do vialky.

- Roztok pyrenu v isopropylmyristátu (asi 7 mg/ml)

Do vialky bylo pipetováno 300 µl roztoku PYR v IPM (asi 70 mg/ml) a přidáno 2,7 ml IPM.

- Roztok pyrenu v isopropylmyristátu (asi 0,7 mg/ml)

Do vialky bylo pipetováno 300 µl roztoku PYR v IPM (asi 7 mg/ml) a přidáno 2,7 ml IMP.

- Receptorová tekutina

Navážka 20 g BSA byla důkladně rozpuštěna v 500 ml PB, po rozpuštění BSA bylo přidáno 5 ml směsi antibiotik penicilinu a streptomycinu (PNC-STR). Receptorová tekutina byla připravována denně čerstvá.



- Fyziologický roztok (asi 0,9%)

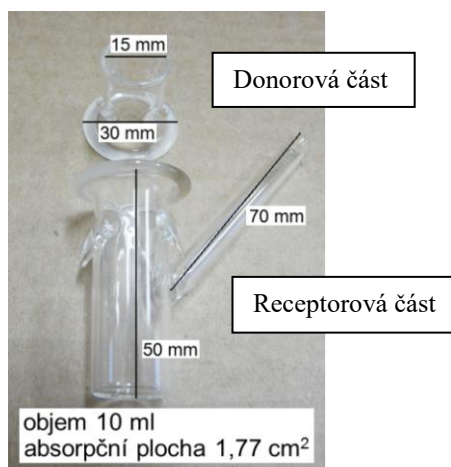
Navážka 0,9 g NaCl byla rozpuštěna v 100 ml deionizované vody.

- Zásobní roztok pyrenu (asi 2g/l)

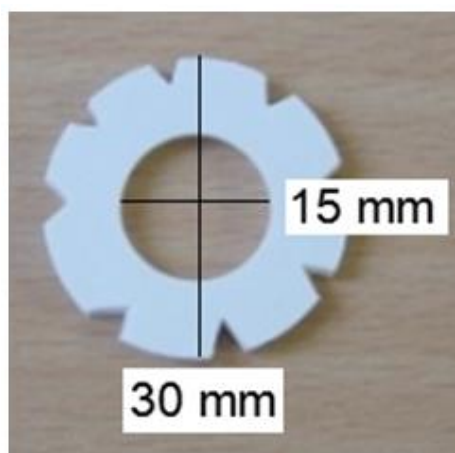
Navážka 0,0200 g PYR byla rozpuštěna v 10 ml ACN. Roztok byl uchovávan při 4 °C maximálně po dobu 1 měsíce.

### 3. 2 Metodika zpracování vzorku

Všechny vzorky kůže, použité při experimentu, byly z oblasti břicha. Jednalo se o přebytečné tkáně po plastických operacích provedených ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. Vzorky kůže byly od 4 různých dárců obou pohlaví a šlo na nich pozorovat rozdílné strukturální změny. Některý vzorek byl více ochlupený a jiný měl zase více strií, kde je kůže ztenčená. Všechny tyto odchylky byly sledovány, jestli budou mít zásadní vliv na výsledky pokusu. Po vizuálním zhodnocení, byly kůže očištěny tekutým mýdlem a opláchnuty pod tekoucí vodou. Viditelné chlupy byly seříznuty běžným elektrickým strojkem. Chirurgickým skalpelem byla odseparovaná kůže a seříznuta dermatomem na tloušťku 0,8 mm. Všechny vzorky kůže byly do doby experimentu uchovány při teplotě -20 °C. Stabilita vzorků při -20 °C byla 12 měsíců. V den experimentu byly vzorky kůže rozmrazeny při teplotě 4 °C a vloženy mezi donorovou a receptorovou část difúzních komůrek (*Obrázek 10*) na jejichž povrch byl položen kroužek ze silikonové gumy (*Obrázek 11*), který posloužil k lepšímu vymezení penetrační plochy. Po obvodu silikonového kroužku byly vystříhány zářezy, které umožnily lepší fixaci donorové a receptorové části difúzní komůrky pryžovými gumičkami.



**Obrázek 10** Difúzní komůrka [10J]



**Obrázek 11** Kroužek ze silikonové gumy [10J]

Následně bylo do receptorové části difúzní komůrky vloženo magnetické míchadlo a tato část byla doplněna receptorovou tekutinou tak, aby mezi kapalinou a kůží nevznikaly žádné bublinky vzduchu a obě styčné plochy na sebe přiléhaly. Takto bylo připraveno 34 vzorků, které byly při 37 °C po dobu 1 h temperovány ve vodní lázni, aby došlo k jejich rehydrataci. Po inkubaci a odvzdušnění vzorků byla na jejich povrchu měřena transepidermální ztráta vody (TEWL) přístrojem MPA5 (Courage+Khazaka, Kolín nad Rýnem, Německo), viz *Obrázek 12*. Poté bylo na povrch kůží aplikováno 0,5 ml fyziologického roztoku a byl měřen elektrický odpor kůže (TER) přístrojem Tecpel LCR 612 (Tecpel Co, Nová Tchaj-pej, Tchaj-wan), viz *Obrázek 13*. K experimentu byly použity pouze takové vzorky, u kterých byly hodnoty TEWL nižší než 15 g/m<sup>2</sup>/h a hodnoty TER vyšší než 2,8 kΩ [14].

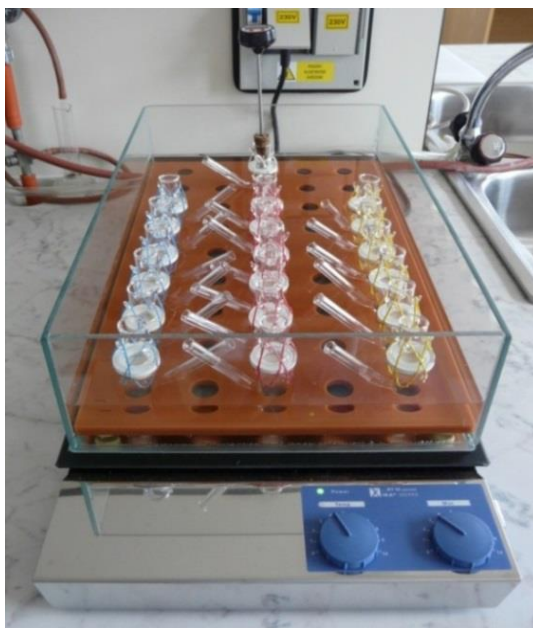


**Obrázek 12** Přístroj na měření transepidermální ztráty vody MPA5 [10J]



**Obrázek 13** Přístroj na měření elektrického odporu kůže Tecpel LCR 612 [10J]

Fyziologický roztok byl odsát buničinou a komůrky byly vloženy do plastového držáku temperovaného magnetického míchadla (*Obrázek 14*). Kontaktním teploměrem byla průběžně měřena teplota povrchu kůže, která se pohybovala v rozmezí  $32 \pm 1$  °C. Destilovaná voda v boxu nesměla dosahovat na povrch kůží, aby nedocházelo k jejich hydrataci.



**Obrázek 14** Temperování komůrek se vzorky kůže v magnetickém míchadle [10J]

V dalším kroku bylo na takto připravené difúzní komůrky aplikováno 50  $\mu$ l roztoku PYR v IPM (70, 7 nebo 0,7 mg/ml). Součástí experimentu byly také kontrolní vzorky, na jejichž povrch nebyl aplikován žádný roztok. Následně byly v různých časech prováděny odběry 0,6 ml receptorové tekutiny (RT) z receptorové části difúzní komůrky. Odběry byly prováděny 2ml injekční stříkačkou s dlouhou jehlou. Odebrané množství RT bylo vždy doplněno do původního objemu novou RT. Odběry byly prováděny v časech 0,5, 1, 2, 6, 12, 24, 36, 48 h a odebraná RT byla uchována do doby HPLC analýzy ve vialkách z hnědého skla s teflonovým septem při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  maximálně po dobu 4-9 měsíců. Difúzní komůrky byly po ukončení pokusu vyndány a osušeny, pryžové gumičky sundány a kroužek ze silikonové gumy, který sloužil pro vymezení penetrační plochy, vložen do skleničky spolu se 4 ml toluenu k vylouhování absorbovaného PYR. Dále byl kouskem vaty setřen povrch kůže každého vzorku a tato vata byla vložena do vialky. K vatám se stěrem povrchu kůže byly přidány 3 ml toluenu. Vzorky toluenu s vylouhovaným PYR z kroužků a vaty ze stěru povrchu kůže byly analyzovány metodou HPLC pro zjištění množství PYR. Kůže z difúzních komůrek byly opatrně sejmuty a rozprostřeny na alobal tak, aby epidermis směřovala dolů a suchou cestou byla provedena separace epidermis od dermis. Obě části byly umístěny zvlášť do vialek z hnědého skla a přidány 2 ml toluenu. Kroužky, vaty, dermis i epidermis, byly ponechány v toluenu po dobu 24 hodin. Po 24hodinovém louhování byl toluen ze vzorků odsát a přefiltrován skrz nylonový filtr o porozitě 0,2  $\mu$ m do vialek z hnědého skla. Vzorky byly uchovány do doby HPLC analýzy při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  maximálně po dobu 4-9 měsíců.

### **3. 2. 1 Test výtěžnosti extrakce pyrenu ze vzorků kůže toluenem**

Paralelně byl proveden test výtěžnosti extrakce PYR ze vzorků kůže toluenem. Do sklenice bylo vloženo po jednom kusu kůže od 4 dárců, přidáno 50  $\mu$ l donorového roztoku PYR v IPM (asi 70 mg/ml) a obsah inkubován 48 hodin při laboratorní teplotě. Po 48 hodinách vsakování bylo do každé sklenice přidáno 5 ml toluenu a PYR byl louhován po dobu 24 hodin. Poté byly do vialky z hnědého skla přeneseny 2 ml toluenu s vyextrahovaným PYR a uchovávány při -20 °C až do doby HPLC analýzy (maximálně 9 měsíců). Pro zabránění přenosu mezi vzorky byly po použití vialky ponechány 2 hodiny v zapnuté digestoři, tak aby se odpařil toluen, a následně byly omyty koncentrovanou HNO<sub>3</sub> a methanolem.

### **3. 3 Postup stanovení pyrenu metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí**

#### **3. 3. 1 Příprava vzorků pro stanovení pyrenu metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí**

Standardy PYR pro sestrojení kalibrační křivky byly připraveny v rozsahu koncentrací 0,035-30 mg/ml a 30-1000 mg/l. Rozsah koncentrací byl zvolen s ohledem na mez detekce, mez stanovitelnosti a očekávané koncentraci PYR ve vzorcích. Kalibrační křivky byly lineární v celém svém rozsahu. Zásobní roztok PYR v ACN (asi 2 g/l) byl na požadované koncentrace ředěn receptorovou tekutinou. V 1,5 ml polypropylenové (PP) zkumavce bylo smícháno 20  $\mu$ l vzorku nebo standardu nebo receptorové tekutině (slepý vzorek) s 1 ml ACN, obsah řádně promíchán, inkubován 30 minut při laboratorní teplotě a odstředěn (19520  $\times$  g, 20 minut). Do insertu vialky bylo přeneseno 300  $\mu$ l supernatantu, vialka uzavřena víčkem se septem a vložena do autosampleru [67, 68].

V případě stanovení PYR ve vzorku toluenu bylo postupováno následovně. Standardy PYR pro sestrojení kalibrační křivky byly připraveny v rozsahu koncentrací 0,035-30 mg/ml a 30-1000 mg/l. Zásobní roztok PYR v ACN (asi 2 g/l) byl na požadované koncentrace ředěn ACN. V 1,5 ml PP zkumavce bylo smícháno 20  $\mu$ l vzorku nebo standardu nebo ACN (slepý vzorek) s 1 ml ACN a obsah řádně promíchán. Do insertu vialky bylo přeneseno 300  $\mu$ l supernatantu, vialka uzavřena víčkem se septem a vložena do autosampleru.

#### **3. 3. 2 Parametry chromatografické analýzy**

Hladiny PYR rozpuštěného v RT a toluenu byly stanoveny metodou HPLC s fluorescenční detekcí. Separace PYR od interferujících látek byla provedena na koloně Nucleodur C18,

125 x 3 mm, eluce byla gradientová, průtok mobilní fáze byl udržován na hodnotě 0,6 ml/min při teplotě 20 °C. PYR byl detekován fluorescenčním detektorem ( $\lambda_{EX} = 270$  nm,  $\lambda_{EM} = 390$  nm, zesílení  $\times 4$  s citlivostí střední, objemem dávkovaným na kolonu 10  $\mu$ l; zesílení  $\times 1$  s citlivostí nízkou, dávkovaným objemem 5  $\mu$ l). Mobilní fázi A byla směs ACN a vody (25:75, v/v), mobilní fázi B ACN s přidavkem ledové kyseliny octové (1000:2, v/v). Pro kvantifikaci hladiny PYR v receptorové tekutině a toluenu byla použita metoda kalibrační křivky. Parametry 5 kalibračních křivek jsou uvedeny v *Tabulce 3*. V příloze 2-3 jsou zobrazeny chromatografické záznamy standardu a reálného vzorku.

**Tabulka 3** Mez stanovitelnosti, mez detekce a průměrné parametry 5 kalibračních křivek metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

<b>citlivost, zesílení, dávkovaný objem</b>	<b>pracovní rozsah kalibrační křivky [mg/l]</b>	<b>směrnice AVG (SD)</b>	<b>intercept AVG (SD) [mg/l]</b>	<b>R (SD)</b>	<b>LOD [mg/l]</b>	<b>LOQ [mg/l]</b>
<b>střední, <math>\times 4</math>, 10 <math>\mu</math>l</b>	0,015-30	$3,993 \cdot 10^6$ (6495)	19900 (5985)	0,9999 (0,0005)	0,005	0,015
<b>nízká, <math>\times 1</math>, 5 <math>\mu</math>l</b>	30-1000	$1,419 \cdot 10^4$ (397)	19211 (5040)	0,9988 (0,0004)	1,172	3,553

AVG, aritmetický průměr; SD, směrodatná odchylka; R, korelační koeficient. Mez stanovitelnosti (LOQ, z angl. limit of quantification) a mez detekce (LOD, z angl. limit of detection) byly vypočteny z následujících rovnic:  $LOQ = 10 S_a/b$ ;  $LOD = 3,3 S_a/b$ , kde  $S_a$  je standardní odchylka interceptu a  $b$  je průměrná směrnice kalibračních křivek

Časový program gradientové eluce je uveden v *Tabulce 4*. S ohledem na spektrální hranu kyseliny octové a emisní spektrum xenonové výbojky fluorescenčního detektoru, byla při výběru excitačních vlnových délek zvolena pouze absorpční maxima s vlnovou délkou větší než 240 nm.

**Tabulka 4** Časový program gradientové eluce metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

Čas (min)	MFA (%)	MFB (%)
0,01	52	48
5,00	52	48
17,00	8	92
22,00	8	92
22,01	52	48

### 3. 3. 3 Kalibrace

Pro kvantitativní stanovení PYR v RT a toluenu byla použita metoda kalibrační křivky. Na osu  $x$  byly vyneseny koncentrace jednotlivých standardů PYR (mg/l) a na osu  $y$  plocha píku PYR. Rovnice kalibrační křivky byla získána proložení závislosti těchto dvou proměnných metodou nejmenších čtverců.

### 3. 4 Zpracování výsledků

Pro zpracování výsledků byl použit program Excel a STATISTICA 12 (StatSoft, Praha, ČR).

## 4 VÝSLEDKY

Průměrné množství PYR, které prošlo přes jednotkovou plochu kůže ( $1,77 \text{ cm}^2$ ) za jednotku času (Flux) při aplikaci donorového roztoku PYR v IMP (70 mg/ml;  $17,3 \text{ } \mu\text{mol}/50 \text{ } \mu\text{l}$ ) bylo  $2,02 \text{ nmol}/\text{cm}^2/\text{h}$  (Tabulka 5).

**Tabulka 5** Absorpce pyrenu v receptorové tekutině ( $\text{nmol}/\text{cm}^2$ ) v časových intervalech po aplikaci donorového roztoku (pyren v isopropylmyristátu o koncentraci 70 mg/ml)

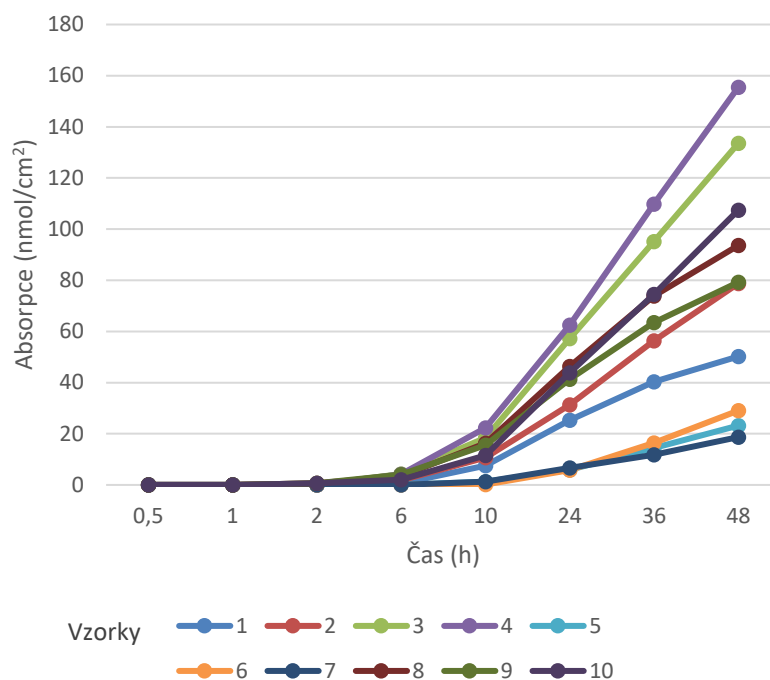
		Čas odběru [h]								Flux	Lag time	
		0,5	1	2	6	10	24	36	48	[h]	[h]	
PYR-IPM (70 mg/ml)	1	0,00	0,00	0,06	0,54	7,53	25,34	40,28	50,21	1,45	6,21	
	2	0,00	0,00	0,06	1,84	10,65	31,38	56,32	78,76	1,97	7,71	
	3	0,00	0,00	0,06	4,26	18,49	57,26	95,19	133,51	3,25	6,47	
	4	0,00	0,00	0,06	4,12	22,36	62,43	109,80	155,45	3,87	7,73	
	5	0,00	0,00	0,00	0,06	1,28	5,94	14,45	23,20	0,76	17,49	
	6	0,00	0,00	0,00	0,06	0,21	5,79	16,37	29,03	1,07	20,70	
	7	0,00	0,00	0,00	0,06	1,28	6,70	11,76	18,69	0,55	14,27	
	8	0,00	0,00	0,70	3,40	16,31	46,40	73,81	93,62	2,46	4,69	
	9	0,00	0,00	0,70	3,98	15,61	41,27	63,45	79,24	2,09	3,74	
	10	0,00	0,00	0,70	2,00	11,56	43,89	74,45	107,40	2,73	8,32	
<b>AVG</b>										<b>76,91</b>	<b>2,02</b>	<b>9,73</b>
<b>medián</b>										<b>79,00</b>	<b>2,03</b>	<b>7,72</b>
<b>VSO</b>										<b>1,09</b>	<b>5,73</b>	

AVG, aritmetický průměr; VSO, výběrová směrodatná odchylka

Absorpce u každého vzorku po přidání donorového roztoku PYR v IMP (70 mg/ml) v závislosti na čase je znázorněna v *Grafu 1*.



**Graf 1** Absorpce donorového roztoku pyrenu v isopropylmyristátu (70 mg/ml) v daných časových intervalech [11K]



Při aplikaci donorového roztoku PYR v IPM (7 mg/ml; 1,73  $\mu\text{mol}/50 \mu\text{l}$ ) byl aritmetický průměr flux PYR 0,37  $\text{nmol}/\text{cm}^2/\text{h}$  (Tabulka 6).

**Tabulka 6** Absorpce pyrenu v receptorové tekutině ( $\text{nmol}/\text{cm}^2$ ) v časových intervalech po aplikaci donorového roztoku (pyren v isopropylmyristátu o koncentraci 7 mg/ml)

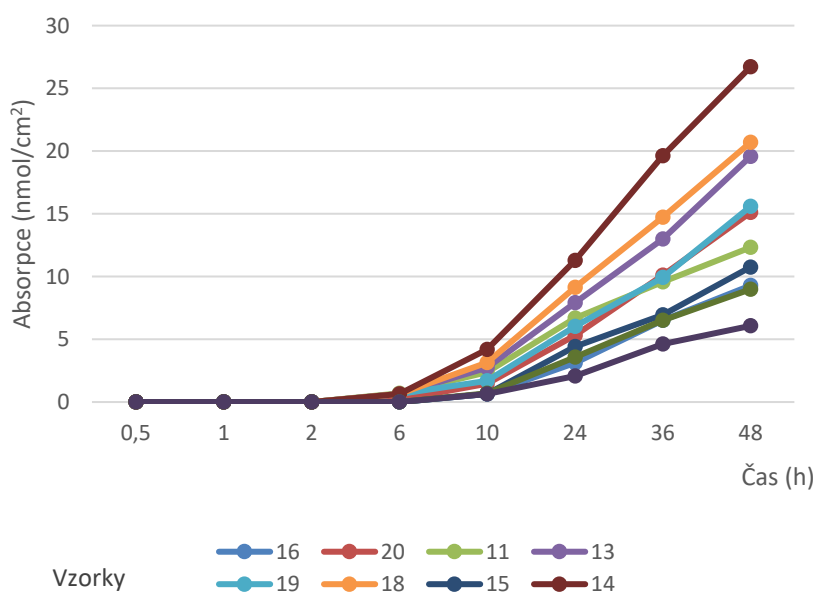
Čas odběru [h]									Flux	Lag time	
	0,5	1	2	6	10	24	36	48	[h]	[h]	
PYR – IPM (7 mg/ml)	11	0,00	0,00	0,00	0,70	2,37	6,70	9,56	12,32	0,33	3,53
	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,70	3,57	6,52	8,99	0,25	9,89
	13	0,00	0,00	0,00	0,64	2,75	7,92	13,00	19,57	0,43	5,15
	14	0,00	0,00	0,00	0,64	4,20	11,28	19,63	26,71	0,65	6,15
	15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,64	4,43	6,94	10,75	0,28	10,17
	16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,64	3,11	6,50	9,28	0,27	12,06

	Čas odběru [h]								Flux	Lagtime	
	0,5	1	2	6	10	24	36	48	[h]	[h]	
17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,64	2,08	4,61	6,07	0,18	10,73	
18	0,00	0,00	0,00	0,64	3,14	9,13	14,73	20,69	0,50	5,77	
19	0,00	0,00	0,00	0,64	1,68	6,01	9,93	15,58	0,41	10,01	
20	0,00	0,00	0,00	0,20	1,47	5,31	10,12	15,10	0,42	12,18	
<b>AVG</b>									<b>14,51</b>	<b>0,37</b>	<b>8,57</b>
<b>medián</b>									<b>13,71</b>	<b>0,37</b>	<b>9,95</b>
<b>VSO</b>									<b>0,14</b>	<b>3,11</b>	

AVG, aritmetický průměr; VSO, výběrová směrodatná odchylka

Absorpce u každého vzorku po přidání donorového roztoku PYR v IPM (7 mg/ml) v závislosti na čase je znázorněna v *Grafu 2*.

**Graf 2:** Absorpce donorového roztoku pyrenu v isopropylmyristátu (7 mg/ml) v daných časových intervalech [11K]



Při aplikaci donorového roztoku PYR v IPM (0,7 mg/ml; 173nmol/50  $\mu$ l) byl aritmetický průměr flux PYR 0,04 nmol/cm<sup>2</sup>/h (*Tabulka 7*).

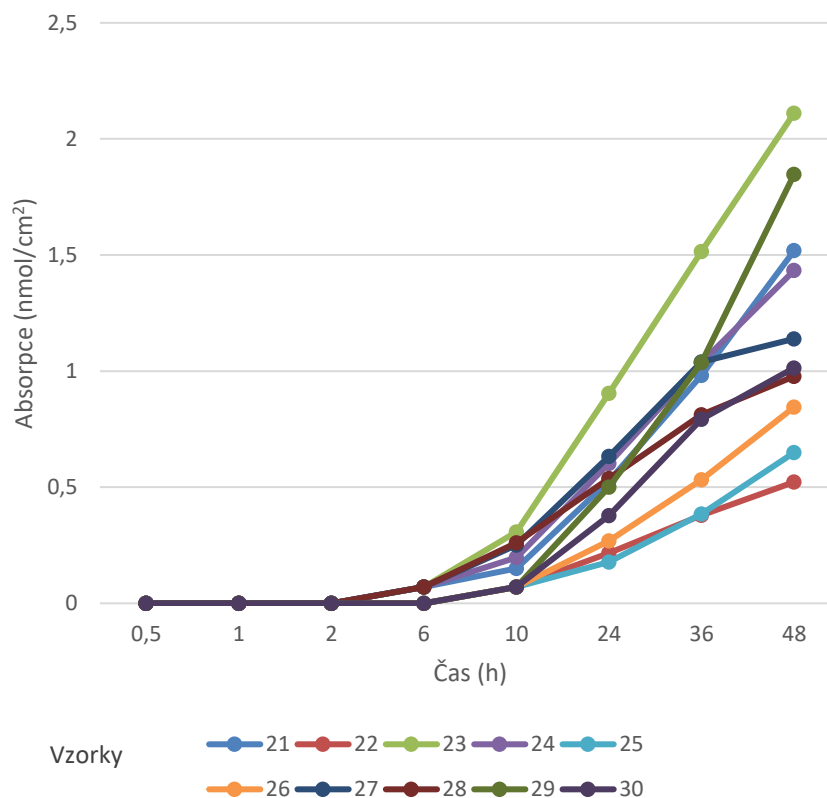
**Tabulka 7** Absorpce pyrenu v receptorové tekutině (nmol/cm<sup>2</sup>) v časových intervalech po aplikaci donorového roztoku (pyren v isopropylmyristátu o koncentraci 0,7 mg/ml)

Čas odběru [h]										Flux	Lag time
	0,5	1	2	6	10	24	36	48	[h]	[h]	
<b>PYR – IPM (0,7 mg/ml)</b>	<b>21</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,53	0,98	1,52	0,05	21,20
	<b>22</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,22	0,38	0,52	0,01	7,57
	<b>23</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,31	0,90	1,52	2,11	0,05	6,24
	<b>24</b>	0,00	0,00	0,00	0,07	0,20	0,60	1,04	1,43	0,04	6,38
	<b>25</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,18	0,39	0,65	0,02	21,56
	<b>26</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,27	0,53	0,85	0,03	19,78
	<b>27</b>	0,00	0,00	0,00	0,07	0,25	0,63	1,04	1,14	0,04	4,140
	<b>28</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,26	0,54	0,81	0,98	0,03	2,170
	<b>29</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,50	1,04	1,85	0,05	13,180
	<b>30</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,38	0,79	1,01	0,03	11,940
<b>AVG</b>									<b>1,21</b>	<b>0,04</b>	<b>11,42</b>
<b>medián</b>									<b>1,08</b>	<b>0,03</b>	<b>9,76</b>
<b>VSO</b>									<b>0,01</b>	<b>7,28</b>	

AVG, aritmetický průměr; VSO, výběrová směrodatná odchylka

Absorpce u každého vzorku po přidání donorového roztoku PYR v IPM (0,7 mg/ml) v závislosti na čase znázorňuje *Graf 3*.

**Graf 3:** Absorpce donorového roztoku pyrenu v isopropylmyristátu (0,7 mg/ml) v daných časových intervalech [11K]



Dle očekávání byla nejvyšší absorpce po 48h s nejvyšší aplikovanou koncentrací PYR a se snižující se aplikovanou koncentrací PYR se také absorpce snižovala (po 48 h v průměru 76,91, 14,51 a 1,21 nmol/cm<sup>2</sup>). Flux PYR se snižoval, byla-li nižší koncentrace PYR v donorovém roztoku (2,02, 0,37 a 0,04 nmol/cm<sup>2</sup>/h). Lag time, tedy doba, za kterou PYR projde přes kožní bariéru a dosáhne oblast cirkulace, byl nejkratší u aplikované koncentrace 7 mg/ml. (8,56±3,11h), při koncentraci 70 mg/ml to bylo 9,73±5,73 h a při koncentraci 0,7 mg/ml pak 11,42±7,28 h.

Výtěžnost nebyla velká. Množství PYR, který prošel přes membránu do receptorové tekutiny a toho, který se vylouhoval do toluenu z vaty ze stěrů povrchu kůže, kroužků sloužících k zakotvení penetrační membrány, dermis a epidermis, bylo 30 % z aplikované dávky donorového roztoku s koncentrací 70 mg/ml, 37 % s koncentrací 7 mg/ml a 37 % s koncentrací 0,7 mg/ml.

Průměrné hodnoty PYR v daných kompartmentech po aplikaci donorového roztoku o koncentraci 70, 7 a 0,7 mg/ml jsou uvedeny v *Tabulce 8*.

**Tabulka 8** Výtěžnost pyrenu z různých kompartmentů [11K]

Donorový roztok (mg/ml)	Povrch kůže				Kroužky			
	m [μg]	m [μmol]	% a.d.	% n.m.	m [μg]	m [μmol]	% a.d.	% n.m.
70	496,76	2,46	14,43	48,52	435,94	2,16	12,66	42,58
7	68,96	0,34	18,74	50,84	54,61	0,27	14,84	40,26
0,7	5,31	0,03	18,00	48,52	4,66	0,02	15,79	42,57
Donorový roztok (mg/ml)	Epidermis				Dermis			
	m [μg]	m [μmol]	% a.d.	% n.m.	m [μg]	m [μmol]	% a.d.	% n.m.
70	59,73	0,30	1,74	5,83	4,05	0,02	0,12	0,40
7	6,38	0,03	1,73	4,70	0,50	0,00	0,14	0,37
0,7	0,53	0,00	1,80	4,83	0,02	0,00	0,05	0,14
Donorový roztok (mg/ml)	Receptorová tekutina							
	m [μg]	m [μmol]	% a.d.	% n.m.				
70	27,31	0,14	0,80	2,67				
7	5,19	0,03	1,41	3,83				
0,7	0,43	0,00	1,46	3,94				

m [μg, μmol], aritmetický průměr nalezeného množství pyrenu v daném kompartmentu; % a.d., množství aplikované dávky (%), které za daný časový úsek penetrovalo přes membránu; % n.m., procento z celkem nalezeného množství pyrenu ve všech kompartmentech

Součet nalezeného PYR v jednotlivých kompartmentech po aplikaci donorového roztoku o koncentraci 70, 7 a 0,7 mg/ml ve vztahu k aplikovanému množství PYR je uveden v *Tabulce 9*.

**Tabulka 9** Průměrná výtěžnost pyrenu ve všech sledovaných kompartmentech

Donorový roztok (mg/ml)	Aplikováno		Celkem nalezeno		% a.d.
	[µg]	[µmol]	[µg]	[µmol]	
70	3 443,00	17,02	1023,78	5,06	29,74
7	368,00	1,82	135,64	0,67	36,86
0,7	29,50	0,15	10,94	0,05	37,10

% a.d., množství aplikované dávky (%), které za daný časový úsek penetrovalo přes membránu

Vizuálně měly některé komůrky mokřý povrch. U těchto vzorků se očekávalo, že se aplikovaný olej do kůže nevsál zcela, a tudíž nalezené koncentrace PYR budou menší. U „mokrých“ komůrek, byly výsledky výtěžnosti paradoxně lepší, 64,19, 59,54 a 71,49 % (Tabulka 10), u „suchých“ komůrek, které byly na pohled suché, se předpokládalo, že se aplikovaný olej vsál a koncentrace PYR budou vyšší, výsledky výtěžnosti však byly horší, 6,77, 2,84 a 2,70 % (Tabulka 11).

**Tabulka 10** Průměrná výtěžnost pyrenu ve všech sledovaných kompartmentech („mokrý“ difúzní komůrky)

Donorový roztok (mg/ml)	Aplikováno		Celkem nalezeno		% a.d.
	[µg]	[µmol]	[µg]	[µmol]	
70 n = 4	3 443,00	17,02	2209,85	10,93	64,18
7 n = 6	368,00	1,82	219,10	1,08	59,54
0,7 n = 5	29,50	0,15	21,09	0,10	71,49

% a.d., množství aplikované dávky (%), které za daný časový úsek penetrovalo přes membránu; n = počet vzorků

**Tabulka 11** Průměrná výtěžnost pyrenu ve všech sledovaných kompartmentech („suché“ difúzní komůrky)

Donorový roztok (mg/ml)	Aplikováno		Celkem nalezeno		% a.d.
	[µg]	[µmol]	[µg]	[µmol]	
70 n = 6	3 443,00	17,02	233,07	1,15	6,77
7 n = 4	368,00	1,82	10,44	0,05	2,84
0,7 n = 5	29,50	0,15	0,80	0,00	2,70

% a.d., množství aplikované dávky (%), které za daný časový úsek penetrovalo přes membránu; n = počet vzorků

Největší rozdíly byly na povrchu kůže. U mokrých difúzních komůrek bylo nalezeno asi 35, 31 a 35 % aplikované dávky, z kroužků 25, 24 a 31 % (Tabulka 12) a u suchých difúzních komůrek 0,7, 0,2 a 0,5 % aplikované dávky, u kroužků 4,7, 0,5 a 0,1 % (Tabulka 13). V epidermis a dermis rozdíly mezi mokrymi a suchými difúzními komůrkami zase nebyly tak velké, pro epidermis je to (mokrý 3, 2 a 3 %, suché 1, 1 a 1 % aplikované dávky) a pro dermis (mokrý 0,19, 0,18 a 0,09 %, suché 0,07, 0,07 a 0,01 % aplikované dávky). U receptorové tekutiny je to pro mokré difúzní komůrky 0,91, 1,8 a 1,9 % aplikované dávky, pro suché difúzní komůrky pak 1,4, 3 a 1,9 % aplikované dávky. Na povrchu kůže zůstalo nejvíce PYR, do epidermis proniklo méně a nejméně pak do dermis.

**Tabulka 12** Průměrná výtěžnost pyrenu v různých kompartmentech („suché“ difúzní komůrky)

Donorový roztok (mg/ml)	Povrch kůže				Kroužky			
	m [µg]	m [µmol]	% a.d.	% n.m.	m [µg]	m [µmol]	% a.d.	% n.m.
70 n = 4	1207,65	5,97	35,08	54,65	849,70	4,20	24,68	38,45
7 n = 6	114,37	0,57	31,08	52,20	89,66	0,443	24,37	40,92
0,7 n = 5	10,46	0,05	35,46	49,60	9,27	0,05	31,44	43,97

Donorový roztok (mg/ml)	Epidermis				Dermis			
	m [µg]	m [µmol]	% a.d.	% n.m.	m [µg]	m [µmol]	% a.d.	% n.m.
70 n = 4	114,68	0,57	3,33	5,19	6,62	0,03	0,19	0,30
Donorový roztok (mg/ml)	Epidermis				Dermis			
	m [µg]	m [µmol]	% a.d.	% n.m.	m [µg]	m [µmol]	% a.d.	% n.m.
7 n = 6	7,95	0,04	2,16	3,63	0,66	0,00	0,18	0,30
0,7 n = 5	0,78	0,00	2,63	3,68	0,03	0,00	0,09	0,12
Donorový roztok (mg/ml)	Receptorová tekutina							
	m [µg]	m [µmol]	% a.d.	% n.m.				
70 n = 4	31,21	0,15	0,91	1,41				
7 n = 6	6,47	0,03	1,76	2,96				
0,7 n = 5	0,56	0,00	1,88	2,63				

m [µg, µmol], aritmetický průměr nalezeného množství pyrenu v daném kompartmentu; % a.d., množství aplikované dávky (%), které za daný časový úsek penetrovalo přes membránu; % n.m., procento z celkem nalezeného množství pyrenu ve všech kompartmentech; n = počet vzorků

Tabulka 13 Průměrná výtěžnost pyrenu v různých kompartmentech („mokrý“ difúzní komůrky)

Donorový roztok (mg/ml)	Povrch kůže				Kroužky			
	m [µg]	m [µmol]	% a.d.	% n.m.	m [µg]	m [µmol]	% a.d.	% n.m.
70 n = 6	22,83	0,11	0,66	9,79	160,10	0,79	4,65	68,69
7 n = 4	0,86	0,00	0,23	8,21	2,02	0,01	0,55	19,35
0,7 n = 5	0,16	0,00	0,54	19,94	0,04	0,00	0,15	5,45
Donorový roztok (mg/ml)	Epidermis				Dermis			
	m [µg]	m [µmol]	% a.d.	% n.m.	m [µg]	m [µmol]	% a.d.	% n.m.
70 n = 6	23,09	0,11	0,67	9,91	2,33	0,01	0,07	1,00
7 n = 4	4,02	0,02	1,09	38,49	0,26	0,00	0,07	2,52



0,7 n = 5	0,28	0,00	0,96	35,40	0,00	0,00	0,01	0,50
<b>Donorový roztok (mg/ml)</b>	<b>Receptorová tekutina</b>							
	m [µg]	m [µmol]	% a. d.	% n. m.				
70 n = 6	24,71	0,12	0,72	10,60				
7 n = 4	3,28	0,02	0,89	31,43				
0,7 n = 5	0,31	0,00	1,04	38,71				

m [µg, µmol], aritmetický průměr nalezeného množství pyrenu v daném kompartmentu; % a. d., množství aplikované dávky (%), které za daný časový úsek penetrovalo přes membránu; % n. m., procento z celkem nalezeného množství pyrenu ve všech kompartmentech; n = počet vzorků

Dle výsledků lze předpokládat, že koncentrace donorového roztoku působící na povrch kůže nemá zásadní vliv na množství absorbovaného PYR. Do receptorové tekutiny proniklo srovnatelné množství PYR. Ze 4 kůží v testu výtěžnosti, na které bylo aplikováno 3500 µg PYR bylo po louhování v 5 ml toluenu výtěženo v průměru 104,8 %. Výsledky výtěžnosti jsou uvedeny v *Tabulce 14*. Výsledky naznačují, že PYR ochotně přechází do toluenu. Vzhledem k průměrné výtěžnosti kolem 100 % lze s jistotou říci, že PYR difunduje do toluenu ochotně a bezzbytku.

**Tabulka 14** Výtěžnost extrakce pyrenu z kůže toluenem

Vzorek	c PYR [mg/l]	c PYR [µg/ml]	z 5 ml [µg]	Výtěžnost %
kůže 1	720,59	720,59	3603	104,6
kůže 2	712,35	712,35	3562	103,4
kůže 3	701,78	701,78	3509	101,9
kůže 4	751,66	751,66	3758	109,2
			AVG	<b>104,8</b>

PYR, pyren

## 5 DISKUZE

PAU jsou látky genotoxické a karcinogenní a tudíž pro živý organismus nebezpečné. Do organismu mohou pronikat jak po orální, inhalační, tak dermální expozici. Většina prací zabývajících se studiem prostupu vybraných PAU přes kůži, používá k pokusům zvířecí kůže. To je zcela logické, protože dostupnost lidské kůže je omezená, významné je také etické hledisko. Nejčastěji se pro experimenty používá kůže prasečí, jelikož se té lidské nejvíce podobá [69-71]. Někteří autoři uvádějí, že prasečí kůže je vhodnějším modelem než umělá lidská kůže [72]. Kůže používaná v experimentech obsahuje epidermis i dermis a je silná 1-2 mm, nebo bývá seříznuta dermatomem na tloušťku 200-500  $\mu\text{m}$ , přičemž ale stále obsahuje část dermis. V experimentech lze použít i tepelně, chemicky nebo enzymaticky oddělenou samotnou epidermis. Vzhledem k její malé tloušťce je ale manipulace s epidermis obtížná.

Při výběru, jakou kůži použít, zda celou, seříznutou dermatomem, či jen epidermis, je třeba si uvědomit, že absorpci hydrofobních PAU s větší molekulou (BaA a BaP) výrazně zpomaluje přítomnost vodného prostředí dermis. Aby k tomu nedocházelo, je vhodné použít jen samotnou epidermální membránu. Vhodnými rozpouštědly pro přípravu donorového roztoku ve vodě špatně rozpustných látek, jako jsou PAU, jsou v literatuře uváděny aceton nebo ethanol. Některé studie uvádějí, že aceton zvyšuje rozpustnost PAU ve vodné fázi živé epidermis [77]. V acetonu rozpuštěné látky se váží na proteiny. Na začátku, kdy je v aplikované dávce nejvyšší koncentrace PAU, se prodlužuje jejich průnik kůží, protože interagují s proteiny. Poté dojde k nasycení vazebných center proteinů PAU, proto pak PAU pronikají kůží rychleji a zkracuje se tzv. „Lag time“ PAU. Proto se jako matrice používají minerální oleje, ropné meziprodukty, maziva a dehtové výrobky. Farmaceutický dehet ve formě masti je používán i v dermatologii. V tomto experimentu bylo jako rozpouštědlo PYR používán isopropylmyristát. Je zde nutno poznamenat, že výsledky výpočtů Flux a Lag time hodnot mohou být zatíženy chybami. To lze eliminovat dodržením tzv. pseudo-ustáleného stavu. Doba experimentu by měla být delší než je 2,7násobek průměrné hodnoty Lag time daného PAU. Délka experimentu byla 48 hodin, přičemž průměrné hodnoty Lag time PYR jsou 11,4 h, tedy podmínka byla splněna. Na rychlosti (Lag time) a intenzitě (Flux) penetrace PAU se podílí řada faktorů, jako je struktura molekuly, charakter substituentů nebo povrchový náboj.

Ve studii Kotingové a kol. [14], kde byl jako rozpouštědlo použit aceton a penetrační membrána byla prasečí kůže ze zadní strany ušního boltce, byla nejvyšší hodnota Flux dosažena při střední koncentraci PYR (9,5 mg/ml) a nejnižší při nejvyšší koncentraci (95 mg/ml). V našem experimentu, kde byl rozpouštědlem IPM, klesaly hodnoty Flux s nižší koncentrací PYR v donorovém roztoku. Flux činil 2,02 nmol/cm<sup>2</sup>/h pro nejvyšší koncentraci PYR v donorovém roztoku (70 mg/ml), 0,37 nmol/cm<sup>2</sup>/h pro střední koncentraci PYR v donorovém roztoku (7 mg/ml) a 0,04 nmol/cm<sup>2</sup>/h pro nejnižší koncentraci PYR v donorovém roztoku (0,7 mg/ml). Nejvyšší a nejnižší hodnota Flux se lišila 60x, rozdíl v koncentraci PYR byl stonásobný. Sartorelli a kol. [74] sledovali průnik 13 PAU kůží, mezi nimi i PYR, při průchodu plnou kůží kočkodana za použití acetonu jako rozpouštědla. Po aplikaci PYR v donorovém roztoku o koncentraci 8,3 nmol/ml, tedy dávky mnohem nižší, než jaká byla použita v tomto experimentu (3461, 34612, 346123nmol/ml), našli hodnotu Flux PYR 0,04±0,04 nmol/cm<sup>2</sup>/h. Ve stejné studii, jen za použití mazacího motorového oleje jako rozpouštědla, byla hodnota parametru Flux 0,0015±0,0003 nmol/cm<sup>2</sup>/h. Z uvedeného je zřejmé, že na parametr Flux má zásadní vliv rozpouštědlo, v kterém je PYR rozpuštěn, neboť pro PYR rozpuštěný v mazacím motorovém oleji je jak hodnota samotného parametru Flux, tak i jeho rozptyl, několikanásobně nižší. Proto je tedy vhodné porovnávat naše výsledky s autory, kteří při přípravě donorového roztoku používali jako rozpouštědla oleje. I tak jsou naše hodnoty Flux parametru o několik řádů vyšší v porovnání s hodnotami uvedenými v publikaci Sartorelliho a kol. Je nutno poukázat na to, že se oba experimenty podstatně lišily, a to ve volbě penetrační membrány, rozpouštědla, koncentrace aplikovaného PYR a zda je PYR ve směsi jiných PAU či nikoliv. V práci Málkové a kol. [75], kde byla jako penetrační membrána zvolena samotná epidermis prasečího ucha a rozpouštědlem byl IPM, dosahovaly hodnoty Flux po aplikaci PYR v donorovém roztoku o koncentraci 13898 nmol/ml 4,38±1,98 nmol/cm<sup>2</sup>/h. Hodnota parametru Flux byla 2x vyšší při použití plné kůže.

V již výše zmiňované studii Kotingové a kol. [14], kde byla jako penetrační membrána použita celá prasečí kůže a rozpouštědlem byl aceton, hodnoty Lag time klesaly s rostoucí koncentrací PYR v donorovém roztoku a dosahovaly 14,4 h při koncentraci PYR v donorovém roztoku 0,95 mg/ml, 11,9 h při koncentraci 9,5 mg/ml a 5,33 h při koncentraci 95 mg/ml. Ve stejné studii, kdy jako rozpouštědlo použili slunečnicový olej, byl patrný pokles hodnot Lag time s rostoucí koncentrací PYR v donorovém roztoku, 17,4 h při koncentraci PYR v donorovém roztoku 0,95 mg/ml a 18,1 h při koncentraci 9,5 mg/ml. V této studii, kdy byl jako rozpouštědlo použit IPM, byla nejvyšší hodnota Lag time 11,414 h při koncentraci

0,7 mg/ml a nejnižší hodnota Lag time 8,56 h při koncentraci 7 mg/ml. Ve studii Sartorelliho a kol. [73], kde byla jako permeační membrána použita celá kůže z břicha kočkodana zeleného a rozpouštědlem byl aceton, bylo monitorováno celkem 8 PAU ve směsi. Při koncentraci PYR v acetonu 8,8 nmol/ml byla hodnota parametru Lag time  $17,41 \pm 8,25$  h. V další práci stejného kolektivu [74], kde byla opět použita celá kůže kočkodana, a rozpouštědlem byl aceton, bylo monitorováno 13 PAU ve směsi. Po aplikaci PYR v donorovém roztoku o koncentraci 8,3 nmol/ml byla hodnota parametru Lag time  $24,46 \pm 2,68$  h. Na hodnotu parametru Lag time mají vliv PAU, které byly ve směsi s PYR. Tedy při aplikaci směsi s 13 PAU se hodnota parametru Lag time PYR prodloužila o třetinu v porovnání s hodnotou parametru Lag time PYR ve směsi jen s 8 PAU. Je pravděpodobné, že dochází k ovlivňování jednotlivých PAU mezi sebou. Vzhledem k tomu, že se PAU ve vzorcích z životního a pracovního prostředí vyskytují téměř výhradně společně, pak při porovnání dat získaných aplikací samotného PAU se tyto výsledky budou významně lišit od výsledků získaných aplikací reálného vzorku, který obsahuje celou řadu dalších PAU.

Při stejné koncentraci PYR v donorovém roztoku (8,3 nmol/ml), ale při změně rozpouštědla na mazací motorový olej, zaznamenali Sartorelli a kol. [74] hodnotu parametru Lag time  $13,38 \pm 8,91$  h. V našem experimentu byla hodnota parametru Lag time PYR při samostatné aplikaci PYR v IPM (3461 nmol/ml)  $11,42 \pm 7,28$  h. V obou pokusech, kde bylo použito rozpouštědlo na olejové bázi (motorový olej, IPM), byly hodnoty parametru Lag time srovnatelné. Z uvedeného vyplývá, že při samostatné aplikaci PYR vstupuje do systémové cirkulace za kratší dobu. Je nutno podotknout, že v obou pracích byla použita jiná tkáň a rozpouštědlo, a byly použity různé koncentrace aplikovaného PYR. V práci Málkové a kol. [75], kde použili epidermální membránu z prasečího ucha a jako rozpouštědlo IPM, aplikovali PYR o koncentraci 13898 nmol/ml, byla hodnota parametru Lag time  $3,25 \pm 0,50$  h. Hodnota parametru Lag time, po aplikaci PYR o koncentraci 346123 nmol/ml, v našem pokusu činil  $9,73 \pm 5,73$  h. I když námi aplikovaná koncentrace PYR v donorovém roztoku byla daleko vyšší, hodnota parametru Lag time byl v jejich práci 3x nižší. Rozptyl hodnot parametru Lag time je desetkrát nižší. Z teorie plyne, že hodnota parametru Lag time závisí pouze na difuzním koeficientu penetrující látky v daném prostředí a délce difuzní dráhy, tj. tloušťkou membrány. Hodnota parametru Lag time by tak neměla významně záviset na koncentraci PAU v donorovém roztoku.

Množství PAU, které dosáhne systémové cirkulace, je při dermální expozici mimo jiné ovlivňováno vasodilací nebo vasokonstrikcí subpapilární arteriální a venózní pleteně mezi

dermis a epidermis. Molekuly PAU mohou pronikat do systémové cirkulace, když je tato pleteň dilatována. K takové situaci dochází v živém organismu vlivem okolní teploty nebo fyzické námahy. Za této situace dosahují PAU systémové cirkulace již při prvním kontaktu se subpapilární arteriální a venózní pletení mezi epidermis a dermis, a ne až v oblasti podkožní cévní pleteně. Z tohoto důvodu může být při experimentech na celé kůži úroveň rizika dermální expozice PAU do jisté míry podhodnocena. Pro přesnější odhady zdravotního rizika by mohly mít vyšší výpovědní hodnotu experimenty kombinující transepidermální a transdermální data. Dermální expozice je významnou branou vstupu látek do organismu. Avšak dostupné experimentální údaje o intenzitě a rychlosti penetrace látek do systémové cirkulace jsou omezené. Pokusy s epidermální membránou jsou metodicky i časově náročné [75, 76].

Z výsledků výtěžnosti PYR z různých kompartmentů z (*Tabulky 12 a 13*) je patrné, že na povrchu kůže je největší koncentrace PYR, do epidermis proniklo méně a nejméně pak do dermis. Zvláštností bylo, že některé komůrky měly po ukončení testu mokré povrch, proto jsme předpokládali, že se aplikovaný PYR v IPM nevstřebal úplně. Opak byl ale pravdou. U „mokrých“ komůrek byla výtěžnost aplikovaného PYR o koncentraci 70 mg/ml 64,2%, 59,5% pro koncentraci 7 mg/ml a 71,5% pro koncentraci 0,7 mg/ml. U komůrek, kde byl po skončení experimentu povrch suchý, jsme naopak očekávali hodnoty výtěžnosti vysoké. U těchto komůrek byly naopak hodnoty výtěžnosti daleko nižší - 6,8 % pro koncentraci 70 mg/ml, 2,8 % pro koncentraci 7 mg/ml a 2,7 % pro koncentraci 0,7 mg/ml. Výtěžnost byla celkově nízká, 30 % pro koncentraci 70 mg/ml, 37 % pro koncentraci 7 mg/ml a 37 % pro koncentraci 0,7 mg/ml. Podobný problém s nízkou výtěžností nebyl dosud v literatuře popsán.

## 6 ZÁVĚR

Cílem práce bylo studovat prostup vybraného polycyklického aromatického uhlovodíku, kterým byl pyren, přes lidskou dermatomovanou kůži za využití kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí. Z dostupných informací a předběžných výsledků je patrné, že dermální expozice je důležitou vstupní bránou polycyklických aromatických uhlovodíků do organismu. V práci byly určeny hodnoty Flux, Lag time a výtěžnosti pyrenu. Do budoucna by bylo zajímavé sledovat prostup vícero různých polycyklických aromatických uhlovodíků společně ve směsi, jejich vzájemné ovlivňování a také prostup různými typy tkání. Experimenty s epidermální membránou jsou časově i metodicky náročné.

## 7 ZDROJE

- [1] MASARYKOVA UNIVERZITA. Anatomie funkce kůže [online]. [cit. 20.02.2018]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/th/20438/lf\\_d/6\\_Anatomie.pdf](https://is.muni.cz/th/20438/lf_d/6_Anatomie.pdf)
- [2] MASARYKOVA UNIVERZITA. Stavba kůže a kožních adnex [online]. [cit. 20.02.2018]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/1411/jaro2013/BKHI021p/um/P13\\_-\\_kuze.pdf](https://is.muni.cz/el/1411/jaro2013/BKHI021p/um/P13_-_kuze.pdf)
- [3] MASARYKOVA UNIVERZITA. Ústav histologie a embryologie. MedAtlas. Epidermis[online]. [cit. 20.02.2018]. Dostupné z: [http://www.med.muni.cz/histology/MedAtlas\\_2/MA\\_txt8-1-1.htm](http://www.med.muni.cz/histology/MedAtlas_2/MA_txt8-1-1.htm)
- [4] MASARYKOVA UNIVERZITA. Ústav histologie a embryologie. MedAtlas. Apokrinní potní žlázy [online]. [cit. 20.02.2018]. Dostupné z: [http://www.med.muni.cz/histology/MedAtlas\\_2/MA\\_txt8-2-1-2.htm](http://www.med.muni.cz/histology/MedAtlas_2/MA_txt8-2-1-2.htm)
- [5] FARRIS, K. P. Nuskin. Skin Anatomy and Physiology.[online]. [cit. 20.02.2018]. Dostupné z: [https://www.nuskin.com/en\\_ZA/corporate/company/science/skin\\_care\\_science/skin\\_anatomy\\_andphysiology.html](https://www.nuskin.com/en_ZA/corporate/company/science/skin_care_science/skin_anatomy_andphysiology.html)
- [6] KOTINGOVÁ,L., BORSKÁ, L., FIALA, Z. Testování transdermální absorpce chemických látek in vitro.[cit. 20.02.2018]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009\\_07\\_533-539.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_07_533-539.pdf)
- [7] IRZ. Polycyklické aromatické uhlovodíky. [online]. [cit. 20.02.2018]. Dostupné z: [https://www.irz.cz/repository/latky/polycyklicke\\_aromaticke\\_uhlovodiky.pdf](https://www.irz.cz/repository/latky/polycyklicke_aromaticke_uhlovodiky.pdf)
- [8] WISCONSIN DEPARTMENT OF HEALTH SERVICES. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). [online]. [cit. 20.02.2018]. Dostupné z: <https://www.dhs.wisconsin.gov/chemical/pah.htm>
- [9] HAVEL, M., VÁLEK, P. Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs). [online]. [cit. 20.02.2018]. Dostupné z: <http://arnika.org/polycyklicke-aromaticke-uhlovodiky-pahs>

- [10] IARC. Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–125. [online]. [cit. 20.02.2018]. Dostupné z: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification>
- [11] BUJALSKÝ, L., HLAVATÝ, E., MARŠÁK, J. Souhrnná zpráva za rok 2013: Integrovaný registr znečišťování životního prostředí [online]. 2013,116 (53) [cit.20.02.2018]. Dostupné z: [https://www.irz.cz/sites/default/files/Souhrnna\\_zprava\\_2013\\_IRZ\\_C\\_web.pdf](https://www.irz.cz/sites/default/files/Souhrnna_zprava_2013_IRZ_C_web.pdf)
- [12] DITRICOVÁ, D. Návrat k dehtovým externům. [online]. In: 2014, s. 2 [cit.20.02.2018]. Dostupné z: <https://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2014/04/03.pdf>
- [13] MADISON, D., BHUTANI, T., KOO, J.,LIAO, W. Goeckerman therapy for the treatment of eczema: A practical guide and review of efficacy, *Journal of Dermatological Treatment*, 2013, 24:1, 2-6, DOI: 10.3109/09546634.2011.607794
- [14] KOTINGOVÁ, L. Kinetika vybraných látek při dermální expozici (Polycyklické aromatické uhlovodíky) [disertační práce]. Hradec Králové: Univerzita Karlova; 2015.
- [15] FIALA, Z., BORSKÁ, L., PASTORKOVÁ, A., et al. Genotoxic effect of Goeckerman regimen of psoriasis. *Arch Dermatol Res*. 2006; 298:243-251.
- [16] MÁLKOVÁ, L., BORSKÁ, L., ANDRÝS, C., et al. Goeckermanova metoda terapie psoriázy: Model kombinované expozice polycyklickým aromatickým uhlovodíkům a UV záření. UK Hradec Králové, Lékařská fakulta, 2016. [cit. 2018-05-24]. Dostupné z: [http://www.symposiumfons.cz/prezentace/2\\_2.pdf](http://www.symposiumfons.cz/prezentace/2_2.pdf)
- [17] LEBWOHL, M., ALI, S. Treatment of psoriasis. Part 1. Topical therapy and phototherapy. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2001, vol. 45, no. 4, p. 486–495.
- [18] FIALA, Z., BORSKÁ, L., VYSKOČIL A. et al. Polycyklické aromatické uhlovodíky II. Toxické účinky. *Acta Med. (Hradec Králové)*, Suppl., 2000, roč., 43, č. 3, s. 37–61.
- [19] DOSTÁL, J. Lékařská chemie II - Bioorganická chemie. Masarykova univerzita, Brno. 2005.
- [20] STIBOROVÁ, M., ŠULC, M., HODEK, P. et al. Biodegradace polutantů životního prostředí enzymovými systémy rostlin. UK v Praze PřF, katedra biochemie. 2000. Vyd. VŠCHT, Praha.



- [21] KNEJZLÍK, Z., KÁŠ, J., RUML, T. Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem. Listy*. 2000. Vol. 94: 913-918.
- [22] HALL, M., FORRESTER, L. M., PARKER, D. K. et al. Relative contribution of variol forms of cytochrome P450 to themetabolism of benzo[a]pyrene by human liver microsomes. *Carcinogenesis*. 1989. Vol. 10(10): 1815– 1821. 47
- [23] OSBORNE, M. R., CROSBY, N. T. Benzopyrenes. *Cambridge Monographs on Cancer Research*. 1987. Cambridge, England: Cambridge University Press.
- [24] IARC. Other Data Relevant to an Evaluation of Carcinogenicity and its Mechanisms. *IARC Monogr*. Vol. 92: 512-682.
- [25] SHIMADA, T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metabolic Pharmacokinetics*. 2006. Vol. 21(4): 257-276.
- [26] INCHEM. Environmental health kriteria for selected non-heterocyclicpolycyclic Aromatic hydrocarbons. [online]. [cit. 28.05.2018]. Dostupné z: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm#SubSectionNumber:6.1.3>
- [27] AGARWAL, R. Metabolism of benzo[a]pyrene by human melanocytes in culture. *Carcinogenesis*, 1991, vol. 12, no. 10, s. 1963-1966.
- [28] IARC. IARC Monographs o the Evaluation of Carcinogenic Risk to Human - Volume 92 – Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. [online]. c2010 [cit. 28. 05. 2018]. Dostupné z: [http:// monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/ vol92/mono92.pdf](http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/mono92.pdf).
- [29] BAIRD, W. M. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagen*, 2005, vol. 45, no. 1-2, s. 104-114.
- [30] SANTODONATO, J. Review of the estrogenic and antiestrogenic aktivty of polycyclic aromatic hydrocarbons: relationship to carcinogenicity. *Chemosphere*, 1997, Vol. 34, No.4, (Feb), pp. 829-847.

- [31] KARAMI, S., BOFFETTA, P., BRENNAN, J. et. al. Renal Cancer Risk and Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Plastics. *Journal of Occupational & Environmental Medicine*, 2011, Vol. 53, No.2, pp. 218-223
- [32] CHAN, H. Y., WANG, H., TSANG, D. S. et al. Screening of chemopreventive tea polyphenols against PAH genotoxicity in breast cancer cells by a XRE-luciferase reporter construct. *Nutrition and Cancer* , 2003, Vol. 46, No.1, pp. 93- 100, 0163-5581
- [33] PINKERTON, K. E. Influence of air pollution on respiratory health during perinatal development. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006, vol. 33, no. 3, s. 269-272.
- [34] GALLENGA, P. E. Polycyclic aromatic hydrocarbons in clear and cataractous human lenses. *Doc Ophthalmol*, 1994, vol. 85, no. 3, s. 242-245.
- [35] NCBI. Phenanthrene. [online]. [cit. 1.06.2018]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/phenanthrene#section=Top>
- [36] O'NEIL, M. J. *The Merck Index—An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2013., p. 1342
- [37] IARC. Agents Classified by the IARC Monographs. Volumes 1–123 (2018). [online]. [cit. 1.06.2018]. Dostupné z: <https://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>
- [38] O'NEIL, M. J. *The Merck Index - Encyklopedie chemikálií, léků a biologických látek*. Cambridge, UK: Královská společnost chemie, 2013., s. 1187
- [39] HAYNES, W. M. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 95th Edition. CRC Press LLC, BocaRaton: FL 2014-2015, p. 3-356
- [40] YALKOWSKY, S. H., YAN, H., JAIN, P. *Handbook of Aqueous Solubility Data Second Edition*. CRC Press, Boca Raton, FL 2010, p. 1083
- [41] GRAINGER, J. Reference range of polycyclic aromatic hydrocarbons in the US population by measurement of urinary monohydroxy metabolites. *Environ Res*, 2006, vol. 100, s. 394-423.
- [42] LARRANAGA, M. D., LEWIS, R. J. Sr., LEWIS, R. A. *Hawley's Condensed Chemical Dictionary 16th Edition*. John Wiley&Sons, Inc. Hoboken, NJ 2016., p. 1151

- [43] HANSCH, C., LEO, A., HOEKMAN D. Prozkoumávání QSAR - hydrofobní, elektronické a stereo konstanty. Washington, DC: Americká chemická společnost., 1995, str. 137
- [44] VIAU, C., HADDAD, S., TARDIF, R. et al. Toxicology Letters 108 (2-3): 201-7 (1999)
- [45] O'NEIL, M. J. The Merck Index – An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2013., p. 195
- [46] HAYNES, W. M. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 95th Edition. CRC Press LLC, Boca Raton: FL 2014-2015, p. 452-472
- [47] BAXTER, C., WARSHAWSKY, D. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Azaaromatic Compounds. Patty's Toxicology. 6th ed. (1999-2017). New York, NY: John Wiley&Sons, Inc. On-line PostingDate: 17 Aug 2012
- [48 ] BUTERIN, T., HESS, M. T., LUNEVA, N., GEACINTOV, N. et al. Unrepaired fjord region polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts in ras codon 61 mutational hot spots. CancerResearch, 2000, Vol. 60(7): 1849-1856.
- [49] U. S. EPA. Health Effects Assessment for Benzo(a)pyrene. Prepared by the Environmental Criteria and Assessment Office, 1984, Cincinnati, OH, for the Office of Emergency and Remedial Response. s. 7-31.
- [50] IARC. Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk. Chem. Man. 1973. Vol. 3: 1–271.
- [51] IARC. Benzo[a]pyrene. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Polynuclear Aromatic Compounds. 1983. Part 1. Chemical, Environmental and Experimental Data. World Health Organization.
- [52] O'NEIL, M. J. The Merck Index – An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2013., p. 117
- [53] NCBI. Benz[a]anthracene. [online]. [cit. 01.06.2018]. Dostupné z:  
[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benz\\_a\\_anthracene](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benz_a_anthracene)
- [54] INCHEM. Environmental health criteria for selected non-heterocyclic polycyclic Aromatic hydrocarbons. [online]. [cit. 01.06.2018]. Dostupné z:

<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm#SubSectionNumber:6.3.2>

[55] NCBI. Fluorene. [online]. [cit. 01.06.2018]. Dostupné z:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6853#section=Use-and-Manufacturing>

[56] TYLENDÁ, C. ATSDR Toxicological profile for fluorides, hydrogen fluoride, and fluorine, chemical manager(s), 2003, Division of Toxicology, Atlanta. Dostupné z:

<https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp.asp?id=212&tid=38>

[57] INCHEM. International Agency for Research on Cancer (IARC) – Summaries & Evaluations. 1998. [online]. [cit. 01.06.2018]. Dostupné z:

<http://www.inchem.org/documents/iarc/vol32/fluorene.html>

[58] HOLOUBEK, I. Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) v prostředí. Praha: Český ekologický ústav: Ministerstvo životního prostředí ČR, odbor ekologických rizik a monitoringu, 1996. ISBN 8085087448.

[59] ŠIMKO, P. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 2002, roč. 770, č. 1-2, s. 3–18. ISSN 1570-0232.

[60] PASIKANTI, K., HO, P., CHAN, C. Gas chromatography /mass spectrometry in metabolite profiling of biological fluids. Journal of Chromatography B. 2008, 871, 202-211.

[61] UNIVERZITA PALACKÉHO. Stanovení Polycyklických Aromatických Uhlovodíků ve vodách a sedimentech metodou SFE-GC/MS. [online]. Dostupné z:

[http://hydrobiologie.upol.cz/uploads/files/06\\_metody\\_stanoveni\\_pau\\_sfegcms.pdf](http://hydrobiologie.upol.cz/uploads/files/06_metody_stanoveni_pau_sfegcms.pdf)

[62] VŠCHT. Analytické stanovení polyaromatických uhlovodíků v ovzduší. VŠCHT [online]. 2008 [cit. 2019-01-03]. Dostupné z: <https://www.vscht.cz/home>

[63] NOVÁKOVÁ, L. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 2013, 299 s. ISBN 978-80-260-4243-3.

[64] HU, C., HE, M., CHEN, B. et al. Sorptive extraction using polydimethylsiloxane/metal-organic framework coated stirrers coupled with high performance liquid chromatography fluorescence detection for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in

environmental water samples. *Journal of Chromatography A*. 2014, 1356, 42–45. ISSN 0021-9673.

[65] ABDEL-SHAFY, H., MANSOUR, M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*. 2016, 25, 106–118. ISSN 1110-0621.

[66] ZHOU, N., LUO, H., LI, N. et al. Highly sensitive and selective spectrofluorimetric approach for the rapid determination of trace benzo[ $\alpha$ ]pyrene in drinking water and in solution leached from disposable paper cups. *Luminescence. The Journal of Biological and Chemical Luminescence*. 2011, 26, 33-38. ISSN 1522-7243.

[67] BLANCHARD, J. Evaluation of the relative efficiency of various techniques for deproteinizing plasma samples prior to high-performance liquid chromatographic analysis. *J. Chromatogr.* 226 (1981) 455-460.

[68] BRUZZONITI, M. C., FUNGI, M., SARZANINI C. Determination of EPA's priority pollutant polycyclic Aromatic Hydrocarbons in drinking Water by solid phase extraction-HPLC. *Anal. Methods* 2 (2010) 739-745

[69] BEZROUK, A., FIALA, Z., KOTINGOVÁ, L., et al. SAMPA: A free software tool for skin and membrane permeation data analysis. *Toxicol In Vitro* 44, 361-371 (2017)doi: 10.1016/j.tiv.2017.07.017. Epub 2017 Jul 23. IF 2,07 (2017)

[70] DICK, I. P. Pig ear skin as an in-vitro model for human skin permeability. *J Pharm Pharmacol*, 1992, vol. 44, no. 8, s. 640-645.

[71] SEKKAT, N. Biophysical study of porcine ear skin in vitro and its comparison to human skin in vivo. *J PharmSci*, 2002, vol. 91, no. 11, s. 2376-2381.

[72] SCHMOOK, F. P. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int J Pharm*, 2001, vol. 215, no. 1-2, s. 50-56.

[73] SARTORELLI, P., CENNI, A., APREA, C. 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, Hak

- [74] SARTORELLI, P., CENNI, A., MATTEUCCI, G. et al. 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
- [75] MÁLKOVÁ, A., KOTINGOVÁ, L., KANĎÁR, R. et al. Trans-epidermální absorpce polycyklických aromatických uhlovodíků, *Hygiena*, 2018, 63(3)
- [76] KOTINGOVÁ, L., VOŘÍŠEK, V., BORSKÁ, L. et al. Vliv rozpouštědla na dermální absorpci pyrenu in vitro. *Hygiena*. 2012;57(2):50-5. 3.
- [77] GAJJAR, R. M., KASTING, G. B. et al. Absorption of ethanol, acetone, benzene and 1,2-dichloroethane through human skin in vitro: a test of diffusion model predictions. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, vol. 281, no. 1, s. 109-117.

## 8 ZDROJE OBRÁZKŮ, TABULEK, GRAFŮ

[1A] Stavba kůže. Dostupné z:

<http://blog.online-avon.cz/119-serial-o-peci-o-plet/517-dil-1--co-je-to-vlastne-kuze.html>

[2B] Vrstvy epidermis. Dostupné z:

<https://study.com/academy/lesson/what-is-epidermis-definition-function-layers.html>

[3C] KOTINGOVÁ, L., BORSKÁ, L., FIALA, Z. Testování transdermální absorpce chemických látek in vitro. [cit. 20.02.2019]. Dostupné z:

[http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009\\_07\\_533-539.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_07_533-539.pdf)

[4D] Mechanismus aktivace benzo(a)pyrenu pomocí CYP450 a epoxidhydrolázy. Dostupné z:

[https://www.researchgate.net/figure/Mechanism-of-activation-of-BaP-by-cytochrome-P450-CYP-and-epoxide-hydrolase-EH\\_fig2\\_216549753](https://www.researchgate.net/figure/Mechanism-of-activation-of-BaP-by-cytochrome-P450-CYP-and-epoxide-hydrolase-EH_fig2_216549753)

[5E] Bay a Fjord region PAU. Dostupné z:

[https://www.researchgate.net/figure/Difference-between-bay-and-fjord-regions-in-two-PAH-conformations\\_fig3\\_216549753](https://www.researchgate.net/figure/Difference-between-bay-and-fjord-regions-in-two-PAH-conformations_fig3_216549753)

[6F] Struktura metabolitů benzo(a)pyrenu. Dostupné z:

<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm#SubSectionNumber:6.3.2>

[7G] Metabolická aktivace benzo[a]pyrenu za vzniku izomerních forem benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10epoxidů. Dostupné z:

<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm#SubSectionNumber:6.3.2>

[8H] Struktura konjugátů benzo(a)pyrenu. Dostupné z:

<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm#SubSectionNumber:6.3.2>

[9I] Souhrnné schéma metabolismu benzo[a]pyrenu. Dostupné z:

<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm#SubSectionNumber:6.3.2>

[10J] KOTINGOVÁ, L. Kinetika vybraných látek při dermální expozici (Polycyklické aromatické uhlovodíky) [ disertační práce]. Hradec Králové: Univerzita Karlova; 2015.

[11K] KOTINGOVÁ, L. Soukromé poznámky, LK UK Hradec Králové, 2018.



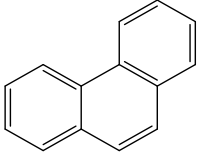
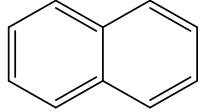
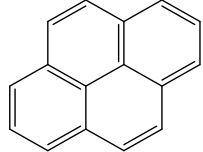
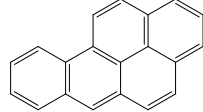
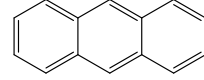
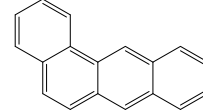
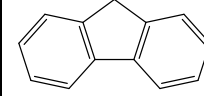
## 9 PŘÍLOHY

**Příloha 1** Základní vlastnosti vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků.....74

**Příloha 2** Chromatografický záznam stanovení pyrenu ve vzorku standardu S1.....75

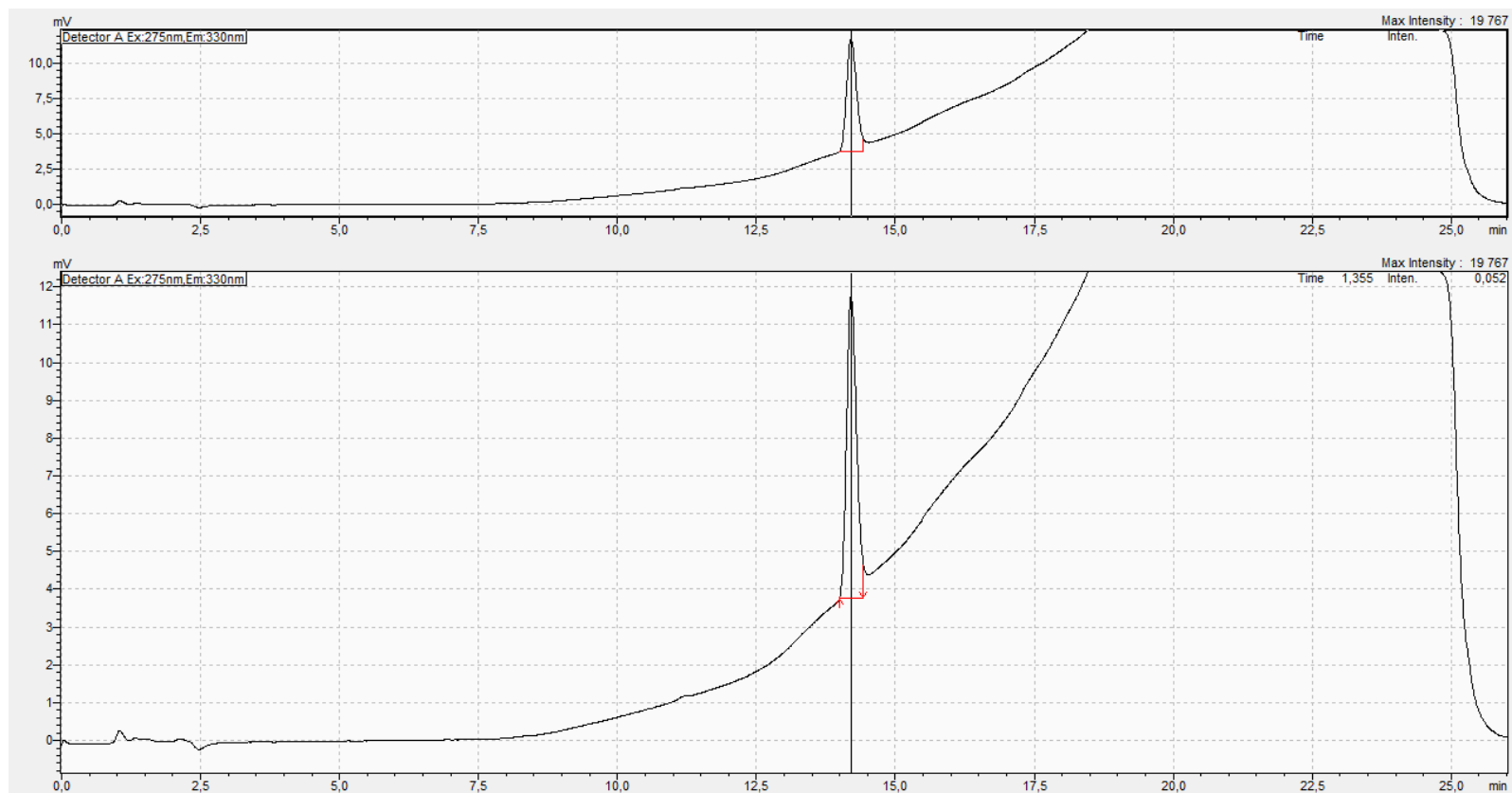
**Příloha 3** Chromatografický záznam stanovení pyrenu v reálném vzorku.....76

### Příloha 1 Základní vlastnosti vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků

	Fenanthren	Naftalen	Pyren	B(a)P	Anthracen	B(a)A	Fluoren
CAS	000085-01-8	000091-20-3	000129-00-0	000050-32-8	000120-12-7	56-55-3	86-75-7
IARC	3	2B	3	1	3	2A	3
Sumární vzorec	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>
M [g/mol]	178,23	128,17	202,26	253,32	118,24	228,29	166,22
ρ [g/cm <sup>3</sup> ]	1,18 při 25°C	0,99 při 20 °C	1,27 při 23 °C	1,35 při 20°C	1,25 při 27°C	1,19 při 20 °C	1,20 při 20 °C
t <sub>i</sub> [°C]	100	80	151	179	216	158	116-117
t <sub>v</sub> [°C]	340	218	394	496	342	438	295
Rozpustnost ve H <sub>2</sub> O [mg/l]	1,100	31,700	0,135	0,004	0,073	0,014	1,992
K <sub>ow</sub>	4,45	3,33	4,88	6,06	4,45	5,61	4,18
Strukturní vzorec							

CAS, jednoznačný numerický identifikátor používaný pro chemické látky; IARS, mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (z angl. International Agency for Research on Cancer); M, molekulová hmotnost; ρ, hustota; t<sub>i</sub>, teplota tání, t<sub>v</sub>, teplota varu; K<sub>wo</sub>, rozdělovací koeficient n-oktanol/voda

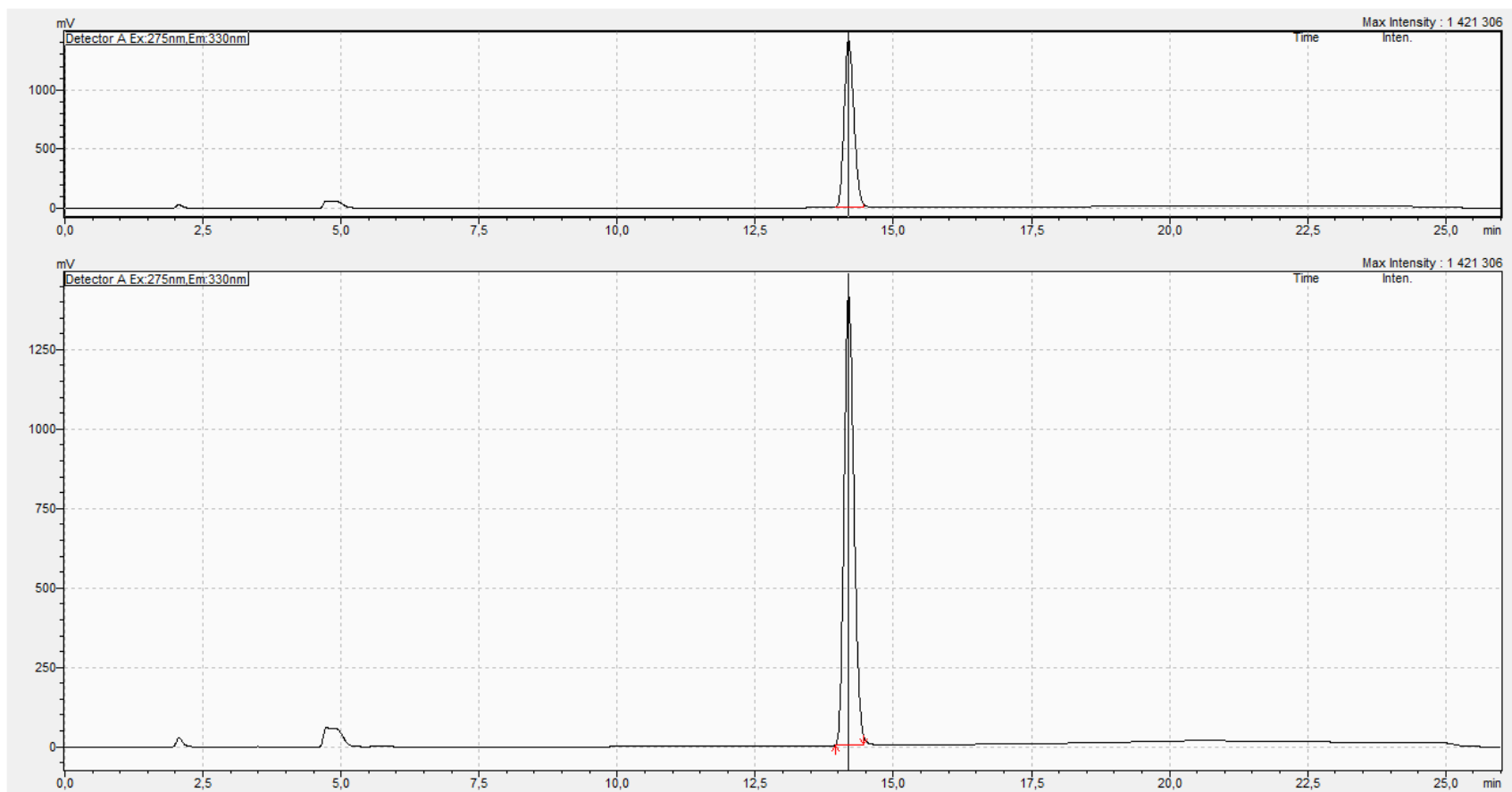
## Příloha 2 Chromatografický záznam stanovení pyrenu ve vzorku standardu S1



Pyren (0,035 mg/l, 14,20 min)

HPLC podmínky: mobilní fáze A byla směs acetonitrilu a vody (25:75, v/v), mobilní fáze B byl acetonitril s přidavkem ledové kyseliny octové (1000:2, v/v), eluce byla gradientová, 0,01 min – 48 % B, 17,00 min – 92 % B, 22,00 min – 48 % B, průtok mobilní fáze byl 0,6 ml/min při 20 °C, detekce byla fluorescenční ( $\lambda_{EX} = 270$  nm,  $\lambda_{EM} = 390$  nm, zesílení  $\times 4$  s citlivostí střední), nástřik na kolonu byl 10  $\mu$ l.

### Příloha 3 Chromatografický záznam stanovení pyrenu v reálném vzorku



Pyren (4,345 mg/l, 14,19 min)

HPLC podmínky: viz příloha 2