

## Overskrift

Sammenhæng mellem transport af kemiske stoffer over hud og moderkage.

## Manchet

Dyreksperimentelle undersøgelser viser at adskillige bekæmpelsesmidler kan påvirke fosterets udvikling. Dette kan ske ved overførsel af stofferne fra moderen via moderkagen til det ufødte barn. Optagelse af bekæmpelsesmidler over moderkagen er ikke velundersøgt, medens man ved en del om bekæmpelsesmidlers hudoptagelse. Dette studie sammenligner transport af kemiske stoffer, herunder bekæmpelsesmidler, over hud og moderkage. Resultaterne viser et sammenligneligt optagelsesmønster over de to barrierer, samt at de samme fysisk-kemiske parametre er af betydning for transporten. Disse paralleller kan tænkes anvendt således, at eksisterende viden om enkeltstoffers eller stofgrupperes absorption over huden kan ekstrapoleres til forventning omkring transport over moderkagen.

## Baggrund og formål

Akutte forgiftninger med bekæmpelsesmidler ses efterhånden yderst sjældent. Det er lave doser, der er relevante, og det er de særligt sårbare grupper, som fokus i risikovurdering bør rettes imod. Fostre er en særlig sårbar gruppe, idet det ufødte barn endnu har et ufuldstændigt metaboliseringsystem og har vanskeligt ved at udskille fremmedstoffer. Samtidig er for eksempel nervesystemet under udvikling i hele graviditeten, og dyreksperimentelle studier viser, at flere bekæmpelsesmidler kan påvirke fostrets udvikling ved eksponering. Til risikovurdering omkring eksponering i fosterstadiet er viden om transport af bekæmpelsesmidler over den humane moderkage en mangel. Det stadigt stigende antal nye stoffer på markedet og ønsket om hurtige og troværdige metoder til fareidentifikation har øget interessen stærkt for udvikling af computermodeller, som kan bruges til forudsigelse af kemiske stoffers egenskaber og transport over biologiske barrierer.

De overordnede formål ved dette projekt er gennem anvendelse af en række modelstoffer, herunder bekæmpelsesmidler, at beskrive betydningen af fysisk-kemiske egenskaber for den passive transport over den humane moderkage, samt at supplere eksisterende viden om bekæmpelsesmidlers hudoptagelse. Desuden er det et mål for dette projekt at fremkomme med en samlet vurdering af de undersøgte bekæmpelsesmidlers muligheder for passage af de i relation til fostre relevante barrierer, hvilket kan have umiddelbar anvendelse ved fremtidige fare- og risikovurderinger. Til slut er det målet at opstille matematiske modeller for hudoptagelse såvel som transport over moderkagen.

## Undersøgelsen

Projektet er lavet i et samarbejde mellem Københavns Universitet, Syddansk Universitet og DHI. Undersøgelserne af moderkagetransport er gennemført ved afdeling for miljø og sundhed, Institut for Folkesundhedsvidenskab på Københavns Universitet ved brug af en *ex-vivo* human moderkage perfusionsmodel. Undersøgelsen af bekæmpelsesmidlers optagelse over huden er gennemført ved Miljømedicin, Syddansk Universitet og er udført med en *in vitro* diffusionscellemodel ved anvendelse af human hud. De undersøgte stoffer er benzoesyre, bisphenol A, caffein samt antipyrin, der er kontrolstof for moderkageperfusionerne, og bekæmpelsesmidlerne dimethoat, glyphosat, methiocarb, miconazol og tebuconazol. Resultaterne for transport over henholdsvis moderkage og hud sammenlignes, og en matematisk model afprøves til forudsigelse af transport over huden såvel som moderkagen.

## Hovedkonklusioner

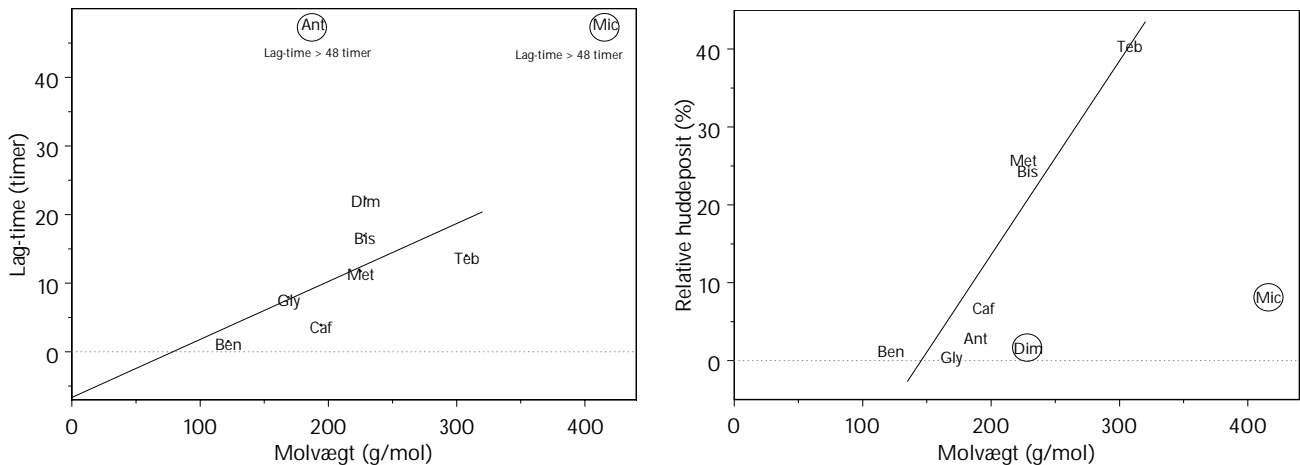
- Undersøgelserne af transport over moderkagen for førnævnte 9 stoffer er gennemført med gode resultater. Studier, hvor transport over huden blev undersøgt er gennemført for 4 af de 9 stoffer, og data for hudoptagelse for de resterende stoffer stammer fra tidligere undersøgelser.
- For hovedparten af modelstofferne ses et sammenligneligt optagelsesmønster over de to barrierer, hvilket indikerer, at de samme fysisk-kemiske parametre har betydning for transporten af stoffer over både hud og moderkage.
- For både hud og moderkage er vandopløselighed, lipofilitet, samt molekyl størrelse af betydning for stoffernes transport.
- Disse ligheder kan tænkes anvendt således, at eksisterende viden om enkeltstoffers eller stofgrupperes hudoptagelse kan ekstrapoleres til en forventning om optagelse over moderkagen.
- Der vil dog eksistere betydende forskelle for enkeltstoffers vedkommende, hvilket også er eksemplificeret i dette studie.
- Dette projekt viser også at med en relativ begrænset datamængde, vil en kvantitativ ekstrapolering næppe være mulig, men at kvalitative ekstrapoleringer forekommer mulige.
- Modellen kan videreudvikles ved generering af flere parallelle datasæt mellem moderkagetransport og hudoptagelse, og forventes at kunne indgå i fremtidige struktur/aktivitetsmodeller til prædiktion af stoffers optagelse/transport over barrierer. På langt sigt og med introduktion af supplerende eksperimentelle undersøgelser forventes denne viden at kunne bidrage til en reduktion i anvendelse af forsøgsdyr til undersøgelser af transport af stoffer over biologiske membraner.

## Projekresultater

### Transport over huden

Ni kemiske stoffers transport over huden er undersøgt *in vitro* med human hud. Data om stofferne glyphosat, koffein, dimethoat, benzoesyre og methiocarb stammer fra tidligere undersøgelser mens bisphenol A, tebuconazol, antipyrin og miconazol er undersøgt indenfor dette projekts rammer. Modelstofferne er udvalgt således at der indenfor gruppen findes et bredt udvalg af stoffer med forskellig opløselighedsprofil ( $\log K_{ow}$ ) samt molekyl størrelse.

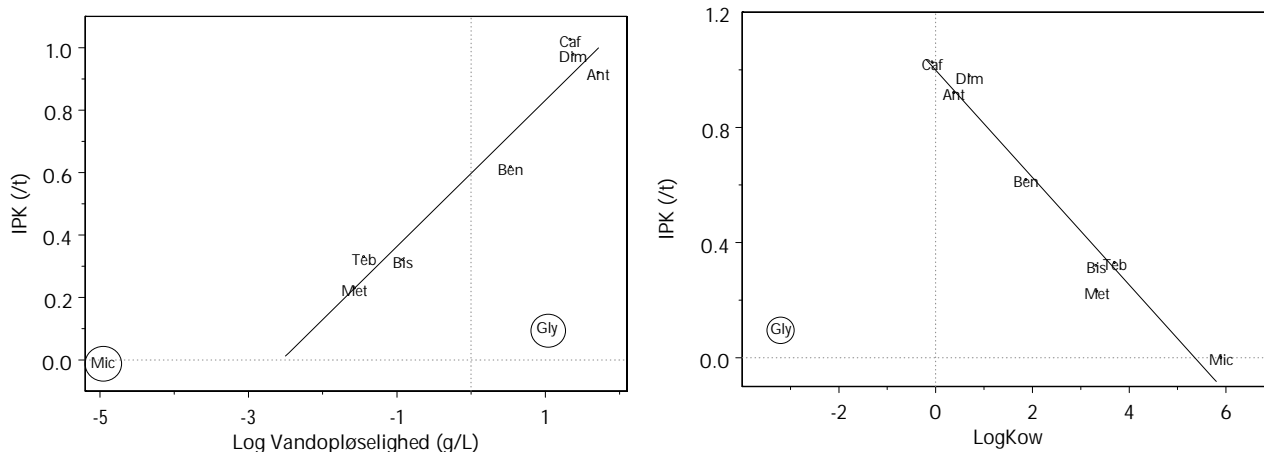
Indenfor gruppen af modelstoffer findes eksempler på stoffer, der ikke transporteres over huden (f.eks. antipyrin og miconazol), mens benzoesyre nærmest uhindret transporteres igennem huden. Koffein og bisphenol A har den højeste hudoptagelse næstefter benzoesyre, mens de resterende stoffer (dimethoat, glyphosat, methiocarb og tebuconazol) har et ensartet mønster for absorption over huden. De målte og beregnede hud parametre er: penetrationskoefficienten  $K_p$  (udtrykker den hastighed, hvormed et givet stof kan transporteres over huden ( $\mu\text{m}/\text{time}$ )), den maksimale penetrationshastighed, lag-time (beskriver tiden fra eksponering til gennembrud af huden, og stoffet dermed kan måles i plasma), relativ mængde stof fundet i huden (huddeponering), relativ absorberet mængde, og den samlede absorberede mængde inkl. mængden fundet i huden. Disse penetrationsmål er sat i relation til en række fysisk-kemiske karakteristika for modelstofferne. Der findes en lineær sammenhæng mellem stoffernes molvægt og henholdsvis lag-time og huddeponering, således at der ved stigende molekylvægt ses øget lag-time samt stigende mængde stof deponeret i huden (se figur 1). Herudover ses indenfor et bredt opløselighedsområde en sammenhæng mellem penetrationshastigheden og  $\log K_{ow}$ .



**Figur 1.** Til venstre ses en lineær regression af forholdet mellem lag-time og modelstofferne molekylvægt med ligningen  $Y = 0,0845x - 6,6483$  ( $r^2 = 0,4467$ ). Der er ikke målt en lag-time for Antipyrin og Miconazol, hvorfor deres værdi er sat til > 48 timer – disse to stoffer falder derfor udenfor tendensen og er udeladt af regressionen. Til højre ses lineær regression af forholdet mellem koncentration fundet i huden (epidermis + dermis) og modelstofferne molekylvægt beskrevet ved ligningen  $Y = 0,2493x - 36,294$  ( $r^2 = 0,8527$ ). Dimethoat og miconazol synes at have en lavere mængde stof deponeret i huden i forhold til hvad tendensen i dette plot indikerer, hvorfor de er udeladt af regressionen. [Gly: Glyphosat, Caf: Caffein; Ant: Antipyrin; Dim: Dimethoat; Ben: Benzoesyre; Bis: Bisphenol A; Teb: Tebuconazol; Met: Methiocarb; Mic: Miconazol]

### Transport over moderkagen

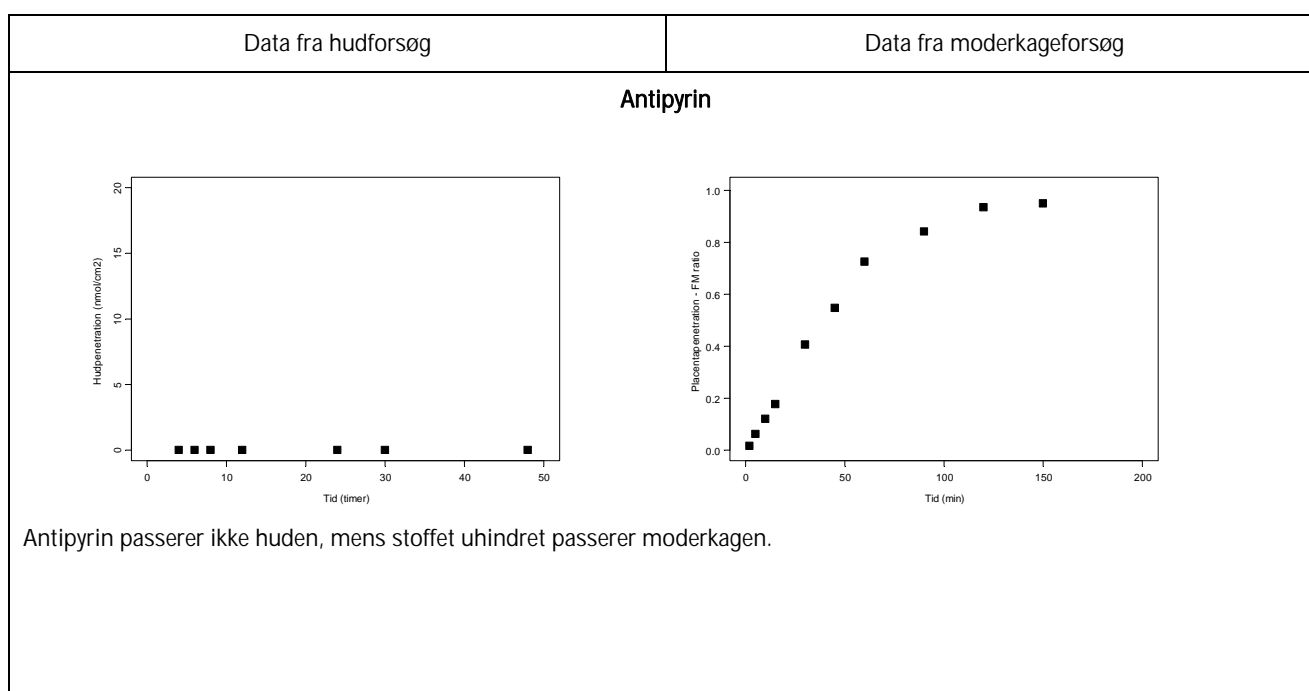
Til undersøgelse af transporten over moderkagen er benyttet et dobbelt recirkulerende perfusionssystem, hvor koncentrationerne af stof på maternelle ( $C_M$ ) og føtale ( $C_F$ ) side af moderkagen er målt i et lukket *ex vivo* system. Forholdet mellem  $C_F$  og  $C_M$  (FM-ratio) stiger lineært med tiden de første 30-60 minutter af forsøgene. Derefter flader kurven oftest af, idet udvekslingen af stof mellem den maternelle og føtale side nærmer sig en ligevægt, hvorved FM-ratioen nærmer sig en konstant værdi. Den initiale hældning af FM-ratioen som funktion af tiden kaldes den indikative permeabilitets koefficient (IPK). Denne parameter er et udtryk for transporthastigheden over moderkagen. I løbet af 2½ timers forsøg passerer modelstofferne med undtagelse af Miconazol moderkagen med IPK-værdier mellem 0,11 og 1,03. Som ved hudoptagelsesdata er penetrationsmålene sat i forhold til stoffernes fysisk-kemiske parametre. Følgende korrelationer blev fundet; jo højere lipofilitet ( $\log K_{ow}$ ) desto lavere permeabilitetskoefficient (IPK), og jo højere vandopløselighed desto højere IPK (se figur 2).



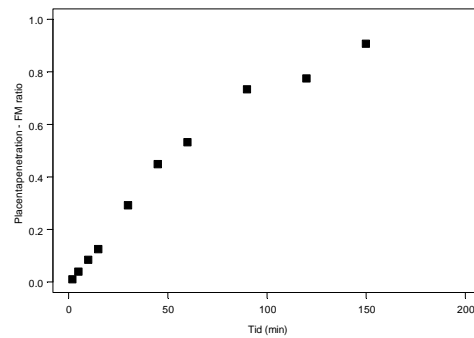
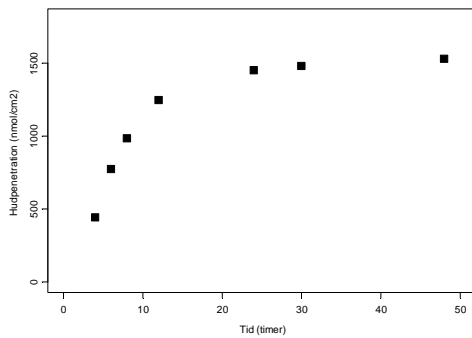
**Figur 2.** Til venstre ses en lineær sammenhæng mellem IPK og logKow for 8 af de 9 modelstoffer udtrykt ved regressionsligningen  $Y = -0,1864 + 0,9987$  ( $r^2 = 0,9537$ ). Glyphosat falder udenfor den lineære sammenhæng og er udeladt af regressionen. Til højre ses en lineær sammenhæng mellem IPK og log(Vandopløselighed) for 7 af de 9 modelstoffer udtrykt ved regressionsligningen  $y = 0,2347x + 0,5985$  ( $r^2 = 0,9389$ ). Glyphosat falder udenfor den lineære tendens og er derfor udeladt af regressionen. Miconazol passer tilsyneladende fint i den lineære regression, men da IPK ikke kan være negativ er miconazol ikke medtaget i regressionen. [Gly: Glyphosat, Caf: Caffein; Ant: Antipyrin; Dim: Dimethoat; Ben: Benzoesyre; Bis: Bisphenol A; Met: Methiocarb; Teb: Tebuconazol; Mic: Miconazol].

### Sammenligning af modelstoffernes passage over henholdsvis hud og moderkage

Der er ikke en entydig sammenhæng mellem hudoptagelse og passage af moderkagen gældende for alle 9 modelstoffer. Når dette er sagt viser resultaterne imidlertid også områder, hvor der tydeligt kan ses sammenhænge mellem hudoptagelse og transport af stoffer over moderkagen (figur 3). For både hud og moderkage er vandopløselighed, lipofilitet samt størrelse af betydning. Transporten over de to barrierer er sammenlignelig i en grad, der på sigt er lovende for en kvalitativ overførsel af viden mellem de to membranmodeller.

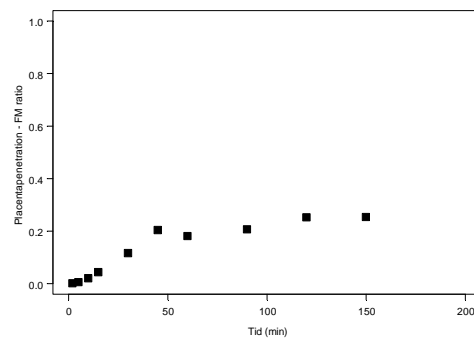
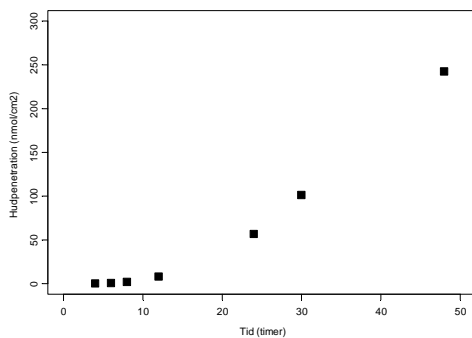


### Benzoesyre



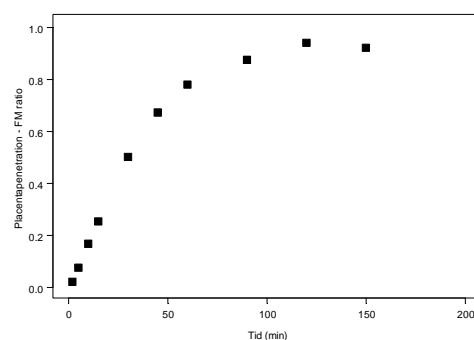
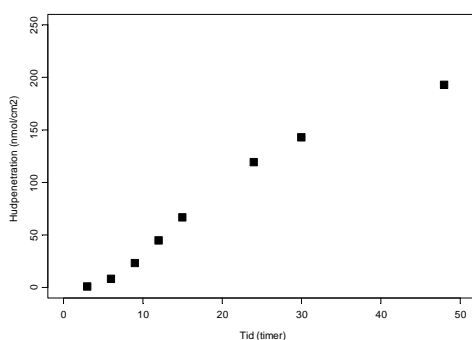
Benzoesyre optages meget hurtigt over huden uden lag-time. Transport over moderkagen går lidt langsommere, men stoffet når over forsøgsperioden 150 minutter op på samme transport som antipyrin.

### Bisphenol A



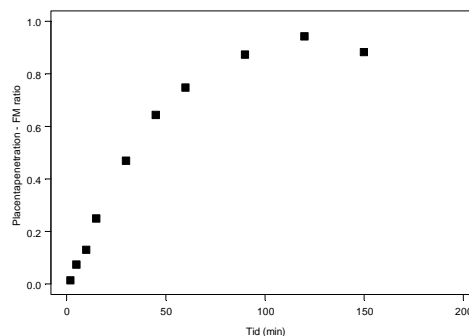
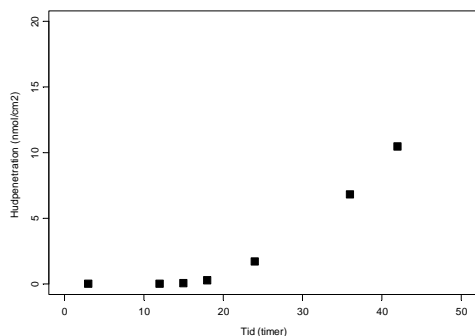
Bisphenol A transporteres over huden, men en betydelig lag-time ses (17 timer). Bisphenol A transporteres også over moderkagen, men transporten går betydelig langsommere end for f.eks. antipyrin.

### Caffein



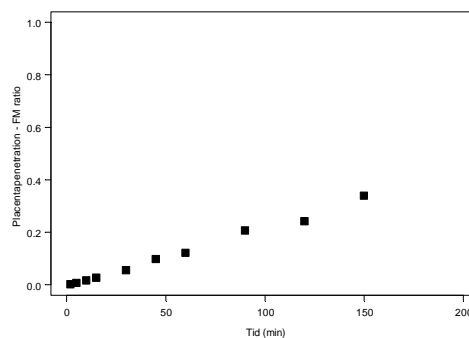
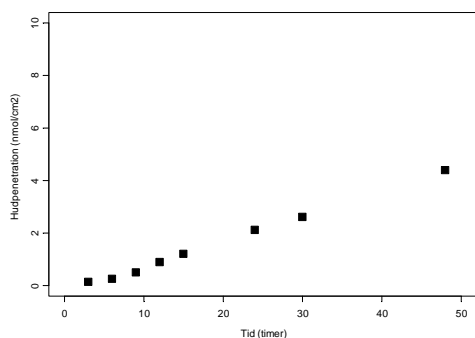
Caffein optages relativt hurtigt over både hud og moderkage. Transporten over moderkagen ser ud til at gå hurtigere end transporten over huden.

### Dimethoat



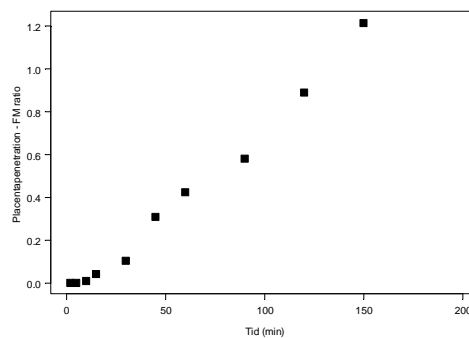
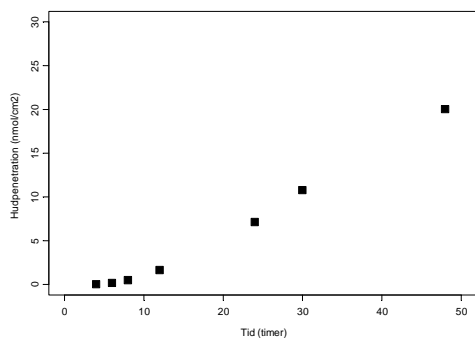
For dimethoat ses en betydelig lag-time over huden før der sker gennembrud. Derimod ses en hurtig transport over moderkagen. Der var dog stor spredning på moderkage-data

### Glyphosat



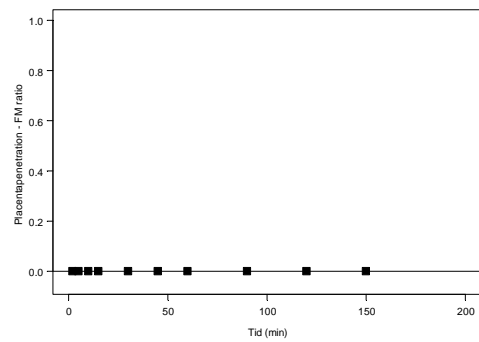
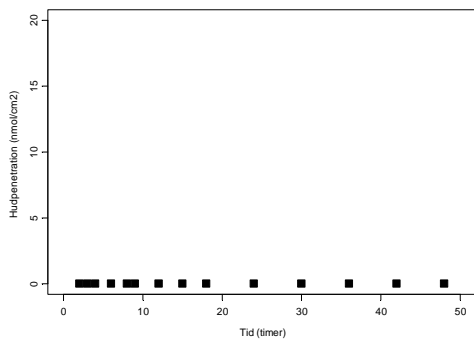
Glyphosat optages i nogen grad over både huden og moderkage.

### Methiocarb



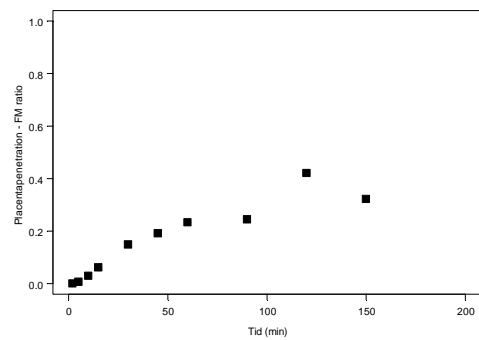
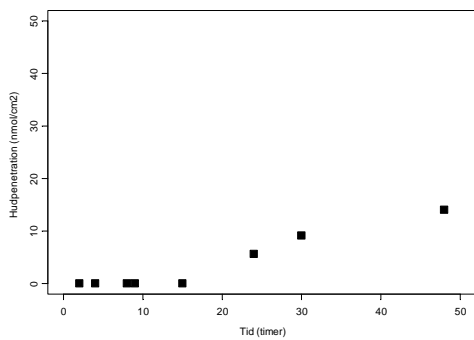
Methiocarb transporteres over både hud og moderkage. Ved transport over huden ses en lag-time på 12 timer. Der er også en svag tendens til en lag-time ved transport over moderkagen. Methiocarb når op på en høj FM-ratio (højere end antipyrin). Dog er den høje FM ratio > 1 i dette tilfælde ikke udtryk for en stor transport over moderkagen idet kun en meget lille koncentration af stoffet blev målt på den føtale side. Det formodes derimod at stoffet ophobes i moderkagens væv.

### Miconazol



Miconazol optages ikke over huden – dog findes en lille mængde deponeret i huden. Miconazol passerer heller ikke over moderkagen. Der blev observeret en ophobning af miconazol i moderkagens væv

### Tebuconazol



Tebuconazol transporteres over både hud og moderkage. Ved transport over huden ses en lag-time på 14 timer. Der er også en svag tendens til en lag-time ved transport over moderkagen og transporten over moderkagen foregår langsomt.

**Figur 3.** Transport over hud og moderkage for de 9 modelstoffer illustreret som hhv. nmol stof/cm<sup>2</sup> hud og FM ratio (CF/CM), der beskriver forholdet mellem stofkoncentrationerne på den føtale og maternelle side af moderkagen. Forsøgsperioderne var hhv. 48 timer for hudstudierne og 150 min for moderkageperfusionsstudierne.