

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EDITA ROZINA

**SOČASNO DOLOČANJE PERMEABILNOSTI RAZLIČNIH
SPOJIN SKOZI KOŽO PRAŠIČJEGA UHLJA IZ VODNE IN
OLJNE DONORSKE RAZTOPINE**

CONCURRENT DETERMINATION OF PERMEABILITY OF
DIFFERENT COMPOUNDS THROUGH PORCINE EAR SKIN
IN VITRO FROM AQUEOUS OR OILY DONOR SOLUTION

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2017

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Simona Žaklja in somentorstvom doc. dr. Mirjam Gosenca Matjaž.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Simona Žaklja in somentorice doc. dr. Mirjam Gosenca Matjaž.

Edita Rozina

Ljubljana, 2017

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Matjaž Jeras

Članica diplomske komisije: doc. dr. Alenka Zvonar Pobirk

VSEBINA

KAZALO VSEBINE

VSEBINA.....	2
KAZALO VSEBINE	2
KAZALO SLIK	5
KAZALO PREGLEDNIC	7
POVZETEK	8
SEZNAM OKRAJŠAV	9
1. UVOD	10
1.1 PERMEABILNOST	10
1.2 MODELNE SPOJINE	10
1.2.1 Kofein.....	10
1.2.2 Diklofenak.....	11
1.2.3 Imidaklopid	11
1.2.4 Parabeni	12
1.2.5 Homosalat.....	12
1.2.6 Gentamicin	12
1.2.7 Oksibenzon.....	13
1.3 SISTEMI ZA DOLOČANJE PERMEABILNOSTI SKOZI KOŽO	13
1.3.1 <i>In-vitro metode</i> - difuzijske celice	13
1.3.1.1 Difuzijske celice.....	14
1.3.1.2 Statične difuzijske celice.....	14
1.3.1.3 Pretočne celice.....	15
1.3.1.4 <i>Saarbrücken difuzijski modeli (SB-M)</i>	15
1.3.2 Ostale <i>in-vitro</i> metode.....	16
1.3.3 <i>In-vivo</i> metode	16

1.3.4 Mikroskopske tehnike	17
1.3.5 Permeabilnostni testi PAMPA	17
2. NAMEN DELA.....	19
3. MATERIALI IN METODE	20
3.1 SPOJINE.....	20
3.2 APARATURE IN LABORATORIJSKI PRIBOR.....	20
3.3 PRIPRAVA PUFROV IN RAZTOPIN STANDARDOV ZA RAZVOJ ANALIZNE METODE.....	21
3.3.1 Priprava PBS	21
3.3.2 Fosfatni pufer	21
3.3.3 Kofein.....	21
3.3.4 Diklofenak.....	21
3.3.5 Imidaklopid	22
3.3.6 Gentamicin	22
3.3.7 Homosalat.....	22
3.3.8 Oksibenzon.....	22
3.3.9 Metilparaben.....	22
3.3.10 Propilparaben	23
3.4 POSTOPKI IN METODE	23
3.4.1 Razvoj analiznih metod.....	23
3.4.2 Priprava raztopine spojin v Miglyolu 812 in raztopine spojin v PBS-ju	24
3.4.3 Izdelava umeritvene premice	24
3.4.4 Priprava kože	26
3.4.5 Sestava Franzove difuzijske celice	26
3.4.6 Eksperimentalno delo.....	26
3.4.7 Izdelava umeritvene krivulje za <i>para</i> -hidroksibenzojsko kislino	27
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	29

4.1 ANALIZNA METODA	29
4.2 Določanje permeabilnosti več spojin hkrati, ter uporaba PBS-ja za akceptorski medij. 30	
4.2.1 Kofein	30
4.2.2 Diklofenak.....	31
4.2.3 Imidaklopid.....	32
4.2.4 Metilparaben	33
4.2.5 Propilparaben	34
4.2.6 Oksibenzon	35
4.3 Določanje permeabilnosti več spojin hkrati in vpliv dodatka Poloxamera 188 v akceptorski medij.....	37
4.3.1 Kofein	37
4.3.2 Diklofenak.....	38
4.3.3 Imidaklopid.....	39
4.3.4 Metilparaben	40
4.3.5 Propilparaben	41
4.3.6 Oksibenzon	42
4.4 METABOLIZEM MP IN PP.....	45
4.5 RAZPRAVA.....	48
5. SKLEP.....	51
6. LITERATURA	52

KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Franzove difuzijske celice- donorski in akceptorski del</i>	15
<i>Slika 2: Mikrotiterski plošči za test PAMP</i>	18
<i>Slika 3: Vzorec kože po opravljenem eksperimentalnem delu</i>	26
<i>Slika 4: Permeabilnost kofeina v prvem poskusu (trikotnik-povprečje množin vzorcev raztopljenih v Miglyolu 812 s standardno deviacijo-SD (prikazali smo samo pozitivno vrednost SD), kvadrat-povprečje množin vzorcev raztopljenih v PBS-ju s standardno deviacijo- SD (prikazali smo samo pozitivno vrednost SD)).....</i>	30
<i>Slika 5: Permeabilnost diklofenaka v prvem poskusu (povprečje množin vzorcev raztopljenih v PBS-ju s standardnim odklonom- SD)</i>	31
<i>Slika 6: Permeabilnost imidakloprida v prvem poskusu (povprečje množin vzorcev raztopljenih v PBS-ju s standardni odklon- SD)</i>	32
<i>Slika 7: Permeabilnost metilparabena v prvem poskusu (trikotnik-povprečje množin vzorcev raztopljenih v Miglyolu 812 s standardnim odklonom (vrednosti SD so tako nizke, da se na grafu ne vidijo), kvadrat-povprečje množin vzorcev raztopljenih v PBS-ju s standardnim odklonom-SD (prikazali smo samo pozitivno vrednost SD))</i>	33
<i>Slika 8: Permeabilnost propilparabena v prvem poskusu (povprečje množin vzorcev raztopljenih v Miglyolu 812 s standardnim odklonom-SD (prikazane so samo pozitivne vrednosti SD))</i>	34
<i>Slika 9: Permeabilnost oksibenzona v prvem poskusu (povprečje množin vzorcev raztopljenih v Miglyolu 812 s standardnim odklonom-SD).....</i>	35
<i>Slika 10: Stolpčni diagram povprečnih vrednosti Papp (nm/s) s standardnim odklonom spojin v prvem poskusu, stolpci v rumeni barvi, predstavljajo donorske raztopine pripravljene v Miglyolu 812, stolpci modre barve pa v PBS-ju (rezultati so predstavljeni v logaritemski skali)</i>	36
<i>Slika 11: Permeabilnost kofeina v drugem poskusu, pri dodatku Poloksamera 188 v akceptorsko raztopino (trikotnik - povprečje množin vzorcev raztopljenih v Miglyolu 812 s standardnim odklonom, kvadrat - povprečje vzorcev raztopljenih v PBS-ju s standardnim odklonom-SD).....</i>	37
<i>Slika 12: Permeabilnost diklofenaka v drugem poskusu, pri dodatku polimera v akceptorsko raztopino (povprečje vzorcev raztopljenih v PBS-ju s standardnim odklonom).....</i>	38

<i>Slika 13: Permeabilnost imidakloprida v drugem poskusu, pri dodatku polimera v akceptorsko raztopino (povprečje vzorcev raztopljenih v PBS-ju s standardnim odklonom-SD).....</i>	<i>39</i>
<i>Slika 14: Permeabilnost metilparabena v drugem poskusu, pri dodatku polimera v akceptorsko raztopino (povprečje vzorcev raztopljenih v PBS-ju s standardnim odklonom)..</i>	<i>40</i>
<i>Slika 15: Permeabilnost propilparabena v drugem poskusu, pri dodatku polimera v akceptorsko raztopino (povprečje vzorcev raztopljenih v miglyolu 812 s standardnim odklonom (prikazali smo samo pozitivne vrednosti SD)).....</i>	<i>41</i>
<i>Slika 16: Permeabilnost propilparaben v drugem poskusu, pri dodatku polimera v akceptorsko raztopino (povprečje vzorcev raztopljenih v miglyolu 812 s standardnim odklonom (prikazali smo samo pozitivne vrednosti)).....</i>	<i>42</i>
<i>Slika 17: Stolpčni diagram povprečnih vrednosti Papp (nm/s) s SD spojin v drugem poskusu, stolpci v rumeni barvi, predstavljajo spojine raztopljene v miglyolu 812, stolpci modre barve pa spojine raztopljene v PBS-ju (rezultati so predstavljeni v logaritemski skali).....</i>	<i>44</i>
<i>Slika 18: Celokupna permeabilnost metilparabena, vzorec iz prve difuzijske celice v drugem poskusu (krog- permeabilnost metilparabena, križ-permeabilnost p-HBk, trikotnik-celokupna permeabilnost).....</i>	<i>46</i>
<i>Slika 19: Celokupna permeabilnost prpilparabena, vzorec iz druge difuzijske celice v drugem poskusu (krog- permeabilnost propilparabena, križ-permeabilnost p-HBk, trikotnik-celokupna permeabilnost).....</i>	<i>47</i>

KAZALO PREGLEDNIC

<i>Preglednica I: : Preglednica redčenja kalibracijskih raztopin za pripravo umeritvene krivulje</i>	25
<i>Preglednica II: Analizne metode- razmerje med komponento A in komponento B</i>	29
<i>Preglednica III: Povprečna vrednost in standardni odklon Papp (nm/s) spojin v prvem poskusu (donorska raztopina Miglyol 812)</i>	35
<i>Preglednica IV: Povprečna vrednost in standardni odklon Papp (nm/s) spojin v prvem poskusu (donorska raztopina PBS)</i>	36
<i>Preglednica V: Povprečna vrednost in standardna deviacija Papp (nm/s) spojin v drugem poskusu (spojine raztopljene v Miglyolu 812)</i>	43
<i>Preglednica VI: Povprečna vrednost in standardna deviacija Papp (nm/s) spojin v drugem poskusu (spojine raztopljene v PBS)</i>	43
<i>Preglednica VII: Vpliv poloksamera na permeabilnost spojin</i>	45

POVZETEK

Koža je največji človekov organ, katerega ena izmed glavnih funkcij je obramba telesa pred zunanjimi dejavniki. Ta s svojo specifično zgradbo predstavlja bariero, zaradi katere je koža selektivno prepustna za vodo, ione in druge snovi. Za določanje prepustnosti kože in permeabilnosti spojin, ki jih naneseemo nanjo, poznamo številne različne metode, tako *in vivo*, kot tudi *in vitro*. Zelo pogosto *in vitro* uporabljena metoda je uporaba Franzevih difuzijskih celic, kjer skozi izbrano membrano, vstavljeno med donorski in akceptorski del, določamo permeabilnostne lastnosti eni sami oz. kombinaciji spojin.

Za detekcijo in analizo spojin s HPLC smo se najprej posvetili razvoju analizne metode, primerne za sočasno določanje vseh preiskovanih spojin v vzorcu. Druga dva kriterija sta bila sorazmerno hitra ter enostavna metoda. Za razvoj smo standarde spojin različno razredčili ter jih med sabo kombinirali. Končni rezultat sta bili dve kombinaciji spojin, v dveh različnih topilih (Miglyol 812 in PBS- fosfatni pufer s soljo), ki smo ju uporabili kot donorski raztopini v nadaljnjem poskusu.

Poskus permeabilnosti smo izvedli na Franzevih difuzijskih celicah. Ker smo želeli določiti, kako določene spojine prehajajo kožo, smo kot bariero uporabili vzorec kože prašičjega uhlja. Pri spojinah kofein in metilparaben, ki se raztapljata v obeh topilih, smo poleg same permeabilnosti opazovali, kako izbira donorskega medija vpliva na permeacijo spojine. V drugem delu poskusa smo kot primer uporabe sočasnega določanja permeabilnosti skupini različnih spojin želeli ugotoviti morebitni vpliv dodatka Poloxamera 188 v akceptorski medij. Poloxamer 188 je namreč polimerni solubilizator, katerega vloga je izboljšanje *sink* pogojev za slabo topne spojine.

Rezultati eksperimentalnega dela so pokazali, da sprememba akceptorskega medija bistveno ne vpliva na permeabilnost slabo topnih spojin, kar je dobro s stališča primerljivosti različno izvedenih poskusov. Se je pa izkazalo, da je za permeabilnost spojin zelo pomembno, iz kakšnega donorskega medija spojina prehaja v kožo. Tako kofein kot tudi metilparaben sta bolje prehajala bariero, ko sta bila raztopljena v PBS.

SEZNAM OKRAJŠAV

ACN	acetonitril
AS	aritmetična sredina
BP	butilparaben
COX	ciklooksigenaza
DHT	dihidrotestosteron
EP	etilparaben
FC	Franzeve difuzijske celice
GC	plinska kromatografija
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
MP	metilparaben
<i>p</i> -HBk	<i>para</i> -hidroksibenzojska kislina
PP	propilparaben
Papp	permeabilnostni koeficient
PBS	fosfatni pufer s soljo
RSD	relativni standardni odklon
SB-M	»Saarbrücken difuzijski model«
SCCP	Znanstveni odbor za potrošniške proizvode
SEM	standardna napaka
SEM	vrstična elektronska mikroskopija
SD	standardna deviacija
STIM	vrstična transmisijska ionska mikroskopija
TEM	transmisijska elektronska mikroskopija
UHPLC	tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti

1. UVOD

1.1 PERMEABILNOST

Permeabilnost je termin, s katerim opisujemo lastnost biološke bariere, da omogoča oz. onemogoča prehod neke spojine skozi njo. Klasično biološko bariero predstavlja koža. Kožo sestavljajo tri plasti: podkožje oz. subkutis, usnjica oz. dermis ter povrhnjica oz. epidermis. Povrhnjica je najzunanjši del kože brez veziva in žil. Sestavlja ga večplastni epitelij, katerega najzunanjši del se imenuje rožena plast (*stratum corneum*). Ta s svojo specifično zgradbo predstavlja bariero, zaradi katere je koža selektivno propustna za vodo, ione in druge snovi. Ob uporabi kože kot biološke bariere je pogosto uporabljen termin dermalna absorpcija. Ta opisuje difuzijo učinkovin skozi kožo ter zajema tri procese:

- **penetracijo**, o njej govorimo, ko učinkovina vstopa v določene plasti kože (največkrat je to rožena plast);
- **permeacijo**, ki opisuje prehod učinkovine med strukturno in funkcionalno različnimi plastmi;
- ter **absorpcijo**, do katere pride, ko spojina preide v krvožilni in limfni sistem [1].

1.2 MODELNE SPOJINE

V nadaljevanju so predstavljene in na kratko opisane spojine z različnimi permeabilnostnimi lastnostmi. Po pregledu literature smo izbrali spojine, za katere je dokazana dobra permeabilnost skozi kožo (kofein in diklofenak), ter spojine, za katere naj bi veljala slabša permeabilnost oz. naj ne bi prehajale kože (parabeni, UV-filtri ...).

1.2.1 Kofein

Kofein je metilksantinski alkaloid z molekulsko maso 194,19 g/mol. Deluje kot blag stimulans centralnega živčnega sistema, kamor se transportira preko krvi po absorpciji v želodcu in tankem črevesu [2]. Čeprav so sistemski učinki kofeina na organizem dobro poznani, pa njegovi učinki na koži še niso popolnoma razjasnjeni. Kljub temu je kofein zelo pogosta sestavina v izdelkih proti celulitu. Deluje na več načinov: vpliva na sekrecijo kateholamina, ki aktivira adrenergične receptorje β , s tem poveča koncentracijo cAMP v celicah ter aktivira hormonsko občutljive lipaze HSL in proces lipolize. Poleg tega kofein blokira adrenergične receptorje α in s tem preprečuje pretirano nalaganje maščobe ter

pospešuje proces lipolize; aktivira HSL, kar vodi do degradacije trigliceridov v procesu lipolize ... Dodajajo pa ga tudi izdelkom za sončenje, saj naj bi povečal zaščitni učinek zoper UV-sevanje ter s tem zmanjšal nastanek radikalov in nastanek kožnega raka. Kofein naj bi vplival tudi na rast las zaradi zaviranja aktivnosti 5- α -reduktaze. To je encim, ki testosteron spremeni v dihidrotestosteron (DHT), slednji pa je odgovoren za izpadanje las pri moških (androgena alopecija). Na DHT so najbolj občutljivi lasni folikli, skrajša se anagena faza, večina las je zato v telogeni fazi. To se opazi s povečanim izpadanjem las [3].

Rezultati številnih študij so pokazali, da kofein dobro prehaja skozi kožno bariero, zato se pogosto uporablja kot modelna spojina v študijah penetracije, permeacije in absorpcije v kožo.

1.2.2 Diklofenak

Diklofenak je derivat benzenocetne kisline, njegova molekulska masa je 296,148 g/mol. Pri sobni temperaturi se nahaja v obliki belega prahu. Dobro se raztaplja v vodi. Diklofenak veže in kelira obe obliki ciklooksigenaze (COX-1 in COX-2) ter s tem blokira pretvorbo arahidonske kisline do proznetnih prostagladinov. Zaradi inhibicije COX-2 je diklofenak učinkovit pri lajšanju bolečin in vnetij. Diklofenak se uporablja v več različnih farmacevtskih oblikah, odvisno od namena uporabe. Eden od namenov je tudi njegova transdermalna uporaba, zaradi katere smo spojino uporabili kot standard za visoko permeabilnost skozi kožo [4].

1.2.3 Imidakloprid

Imidakloprid je neonikotinoid v obliki brezbarvnih kristalov z molekulsko maso 255,661 g/mol. Topen je v vodi. Deluje na centralni živčni sistem žuželk tako, da posega v prenos dražljajev ter s tem povzroči zamašitev nikotinergične nevronske poti. Z zaviranjem nikotinskih receptorjev preprečuje acetilholin posredovane impulze med živci, paralizira insekta in končno smrt. Imidakloprid se uporablja predvsem v poljedelstvu v obliki injekcij, ki jih vbrizgajo v tla ali drevesa, nanašajo ga na rastline, v farmaciji pa se uporablja kot antiparazitno sredstvo v zdravljenju ektoparazitnih okužb [5]. Imidakloprid smo uporabili kot spojino, ki se v veterini uporablja v pripravkih za na kožo, vendar naj bi delovala le na koži, torej naj ne bi oz., ki naj bi slabo prehajala kožno bariero.

1.2.4 Parabeni

Kemijsko so parabeni parahidroksibenzoati oz. estri parahidroksi benzojske kisline. So protimikrobne substance, ki se dodajajo kot konzervansi kozmetičnim izdelkom, zdravilom in včasih tudi hrani. Najpogosteje uporabljeni parabeni so: metilparaben (MP), etilparaben (EP), propilparaben (PP) in butilparaben (BP). Njihova topnost v vodi z daljšanjem verige pada. Delujejo tako, da ovirajo membranski transport ter zmanjšajo sintezo DNA in RNA. Parabene lahko uporabljamo kot samostojne konzervanse ali pa v kombinaciji z drugimi snovmi. Od tega je odvisna tudi njihova maksimalna koncentracija, ki jo dovoljuje Uredba o kozmetičnih izdelkih 1223/2009. Za posamezne estre je ta vrednost 0,4-% (kot kislina) (w/w), celokupna pri kombinaciji le-teh pa 0,8-% (kot kislina) (w/w) [6–8].

1.2.5 Homosalat

Kemijsko je homosalat ester salicilne kisline in 3,3,5-trimetilcikloheksanola. Je prozorna, rahlo rumena tekočina z molekulsko maso 262,349 g/mol. V vodi se ne raztaplja [9]. Homosalat je organski UV-filtr, uporabljen v kozmetičnih izdelkih, najpogosteje v sončnih kremah z namenom, da zaščiti kožo pred škodljivimi vplivi sončnih žarkov. Deluje tako, da absorbira UV-žarke. V številnih študijah so dokazali, da sproščajo nekateri UV-filtri vključno s homosalatom endokrine signale, ki povzročijo inhibicijo endogenih hormonov. Klasificirajo jih kot endokrine motilce (ECD – endocrine disruptors chemicals). Te snovi so potencialno nevarne za človeka in živali, saj vplivajo na njihovo reproduktivnost, povzročajo epigenetske spremembe, ki se prenašajo na naslednje generacije [10].

Izvedene so bile študije vrednotenja penetracije homosalata skozi kožo. Rezultati so pokazali, da homosalat v manjših koncentracijah prehaja bariero, vendar pa so za študije uporabili visoke koncentracije testne spojine. Zato so predpisane maksimalne koncentracije homosalata v končni formulaciji. In sicer v ZDA in Avstraliji 15 %, v Evropski uniji, Koreji ter na Japonskem 10 % [11, 12].

1.2.6 Gentamicin

Gentamicin je kompleks tesno povezanih aminoglikozidov z molekulsko maso 477,6 g/mol. Ima obliko belega amorfnega prahu. Dobro se raztaplja v vodi, piridinu ter dimetilformamidu, delno pa se raztaplja tudi v metanolu, acetonu in etanolu. Gentamicin so odkrili leta 1963, in sicer so ga izolirali iz bakterije *Micromonospora purpurea* [13]. Uporablja se za zdravljenje bakterijskih okužb pri živalih in ljudeh, ker zavira rast bakterij tako, da ireverzibilno veže 30S podenote bakterijskih ribosomov ter s tem moti sintezo proteinov. Z gentamicinom zdravimo

okužbe kosti, meningitis, endokarditis, vnetne bolezni medenice, pljučnice, okužbe sečil in sepso. Aktiven je proti gramnegativnim bakterijam, kot so *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia*, ter proti bakterijam *Staphylococcus*, ki so grampozitivne bakterije. Učinkovina se lahko dostavlja v obliki injekcije v mišico ali pa se nanaša dermalno na opekline in mesta infekcije zunaj očesa. Dermalno se uporablja v kombinaciji z betametazonom, predvsem za lajšanje vnetnih znakov dermatoz, ki se odzivajo na kortikosteroide. Te bolezni so atopični dermatitis, psoriza, kontaktni dermatitis, seboroični dermatitis ...[14]. Uporaba gentamicina lahko povzroči pojav alergijskih reakcij, deluje pa lahko tudi nefrotoksično in ototoksično (povzroča težave z ravnotežjem in okvaro sluha). Da do teh učinkov ne pride, se pred uporabo izvedejo laboratorijska testiranja (merijo, kakšno je delovanje ledvic ter raven zdravilnih učinkovin v krvnem obtoku), s katerim določimo ustrezen odmerek [15,16].

1.2.7 Oksibenzon

Oksibenzon, poznan tudi kot benzofenon-3, je derivat benzofenona. Njegova molekulska masa znaša 228,25 g/mol, je bele do rahlo rumene barve. Najpogosteje je oksibenzon uporabljen kot organski UV-filter, deluje tako, da absorbira žarke UVB in UVA II ter s tem ščiti produkt, po uporabi pa tudi kožo pred škodljivimi vplivi le-teh [17]. Spojina se pogosto uporablja v sočnih kremah, saj deluje v zelo širokem UV-spektru. Izdelki, ki vsebujejo oksibenzon, se ne smejo uporabljati v nosečnosti in pri otrocih, mlajših od 6 mesecev, saj naj bi v določenih študijah dokazali estrogene učinke oksibenzona na podganah (Schlumpf et al 2001). Znanstveni komite za potrošniške produkte (SCCP – The Scientific Committee on Consumer Products) je zato uvedel maksimalno koncentracijo spojine, ki je še dovoljena v končnih produktih, in znaša 6 % [18].

1.3 SISTEMI ZA DOLOČANJE PERMEABILNOSTI SKOZI KOŽO

1.3.1 In vitro metode difuzijske celice

Določanje permeabilnosti spojin z uporabo difuzijskih celic je ena najpogosteje uporabljenih metod. Temelji na prehodu spojin skozi membrano v rezervoar s tekočino (akceptorski medij), lahko se uporablja tako »neživa« kot tudi »živa« koža. Če uporabimo »živo« kožo, lahko poleg permeacije določamo še metabolično aktivnost kože. Permeacijo snovi ter perkutano absorpcijo največkrat omejuje rožena plast, ki pa jo sestavljajo odmrle kožne celice, zato lahko za raziskave uporabljamo »neživo« kožo, saj njene lastnosti tudi po odstranitvi iz telesa ostanejo enake.

In vitro metode so hitre, dokaj enostavne in ponovljive, poleg tega so stroški manjši, zato se pogosto uporabljajo v raziskovalne namene.

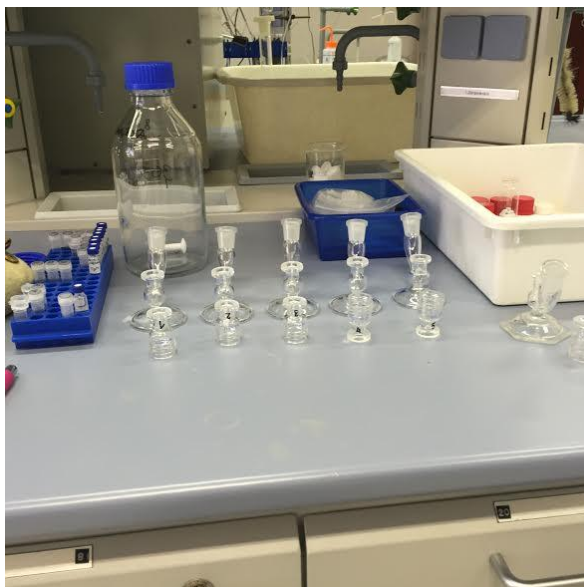
Za analizo rezultatov se v večini primerov uporablja HPLC (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti), v nekaterih primerih GC (plinska kromatografija). Če pa želimo detektirati spojine v spodnjih plasteh povrhnjice ali v usnjici, pa vzorec kože po eksperimentu zamrznemo, nato ga razrežemo s kriomikrotomom ter spojine določimo po ekstrakciji.

1.3.1.1 *Difuzijske celice*

Poznamo več vrst difuzijskih celic. Glede na akceptorsko tekočino ločimo statične in pretočne celice, glede na to, v kakšnem položaju je med testom membrana- koža, pa vertikalne in horizontalne celice. V vseh primerih je koža oziroma umetna membrana vstavljena med donorsko in akceptorsko komoro. Količina snovi, ki preide iz enega v drug del, je določena kot funkcija časa. Akceptorske komore obsegajo volumen od 0,5 mL do 10 mL, površina-izpostavljene membrane (skozi katero vrednotimo absorbcijo), pa je velika od 0,2 cm² do 2 cm². Pri izbiri celic upoštevamo, da bo transport snovi odvisen samo od lastnosti membrane in snovi. Vertikalne celice uporabimo za študije, kjer vrednotimo formulacije poltrdne konsistence, poleg tega omogočajo posnemanje *in vivo* pogojev. Donorska komora je namreč lahko zaprta, s tem zagotovimo okluzivne pogoje, lahko pa je tudi odprta, v tem primeru lahko pride do izhlapevanja določenih spojin. Celice v horizontalnih sistemih so običajno enake velikosti, ni pa nujno. Oboje, vertikalne in horizontalne celice so lahko tako statične kot tudi pretočne [19].

1.3.1.2 *Statične difuzijske celice*

Statične oziroma Franzeve difuzijske celice (slika 1) so zelo široko uporabljen sistem. Razvili so jih leta 1975. Sestavljata jih donorska in akceptorska komora, med kateri vstavimo kožo, tako da je usnjica obrnjena proti akceptorski tekočini, povrhnjica pa je v stiku z donorskim delom, kamor naneseemo formulacijo. Akceptorsko tekočino neprestano meša magnetno mešalo, zato lahko ročno odvzemamo vzorce, katerih volumen nadomestimo s svežim akceptorskim medijem. So enostavne, relativno poceni, uporabljajo pa se lahko tudi kot pretočna oblika celic. Za to obliko celic je ključnega pomena zagotovitev *sink* pogojev. Koncentracija spojine na akceptorski strani mora biti zanemarljiva v primerjavi z nasičeno koncentracijo (volumen medija mora biti od 5 do 10-krat večji, kot je volumen potreben za nasičeno raztopino spojine) [19, 20].



Slika 1: Franzeve difuzijske celice – donorski in akceptorski del

1.3.1.3 Pretočne celice

Za te celice je značilna konstantna zamenjava akceptorske tekočine, s katero želimo posnemati *in vivo* pogoje. Sistem sta razvila Brounagh in Stewart. Uporabimo jih predvsem, ko je spojina zelo slabo topna v akceptorskem mediju. S pomočjo črpalke se akceptorski medij neprestano menja (pretok 1,5 mL/h) ter s tem zagotavlja *sink* pogoje. Pretok je odvisen od volumna akceptorske komore in od topnosti spojine. Ravno zaradi neprestanega menjavanja medija pa lahko z uporabo teh celic dobro posnemamo fiziološke pogoje in jih tako uporabimo za študije metabolizma.

V večini *in vitro* študij za določanje absorpcije skozi kožo pa ni bilo opaznih večjih razlik v rezultatih v primeru uporabe statičnih ali pretočnih celic [20].

1.3.1.4 »Saarbrücken difuzijski modeli« (SB-M)

Ti difuzijski modeli se uporabljajo za študije penetracije spojine v različne sloje kože. Za razliko od Franzevih celic, kjer običajno preučujemo, ali spojina preide skozi kožo, nas pri SB-M zanima, katere sloje bo spojina prešla. SB-M sestavljajo teflonski bloki, med katere vstavimo kožo. Roženo plast kože na določene intervale odstranjujemo s *tape-strippingom*, nato pa preostalo kožo razrežemo s kriomikrotomom ter za analizo pripravimo z ekstrakcijo. Tako dobimo natančno mesto v koži, kamor penetrira spojina [20].

1.3.2 Ostale *in vitro* metode in membrane za *in-vitro* testiranje dermalne absorpcije

To so metode, ki se običajno uporabljajo v kombinaciji z difuzijskimi celicami ali *in vivo* metodami (npr. *tape-strip* metoda). Njihova prednost je, da lahko uporabimo posamezne plasti kože, kjer nato opazujemo permeacijo in obnašanje snovi.

1.3.2.1 Umetna koža oz. rekonstruirani kožni modeli

To so človeški koži podobne umetne membrane, ki izkazujejo tako lipofilne kot hidrofilne lastnosti ter s tem posnemajo roženo plast v koži. Sestavljeni so iz različnih slojev, eden med njimi je tudi rekonstruirana povrhnjica, ki se goji kot tkivna kultura in uporablja kot alternativa živalskim tkivom. »Živi« koži podobni modeli so po smernicah primerni za študije dermalne absorpcije, vendar pa zaradi razlik v bariernih funkcijah rezultati ne korelirajo z *in vivo* ali *in vitro* študijami [19].

1.3.2.2 *Tape-strip* metoda

Tape-strip metoda je zelo pogosta tehnika, uporabljena za testiranje kozmetičnih izdelkov. Z uporabo adhezivnih trakov postopoma odstranjujemo roženo plast. S to tehniko testiramo predvsem količino preiskovane snovi v roženi plasti, lahko pa jo uporabimo tudi v druge namene [19]. *Tape-stripping* se uporablja v primeru *in vivo* kot tudi *in vitro* metod.

1.3.3 *In vivo* metode

Prednost teh metod je uporaba fiziološko in metabolično intaktnih sistemov. Študije izvajajo na živalih, predvsem so to glodavci, ter na človeških prostovoljcih. Te študije se uporabljajo predvsem v farmaciji, vendar veljajo za etično sporne, zato se jih poslužujejo le, ko so nujno potrebne in ni na voljo ustreznih alternativnih metod [19].

1.3.3.1 Študije na živalih

Najpogostejše uporabljena žival za testiranje je podgana. Prednost uporabe teh živali je njihova hitra reprodukcija, vendar pa je permeabilnost podganje kože večja od človeške. Bolj primerljive lastnosti imajo opice in prašiči (v laboratoriju se uporabljajo pritlikavi prašiči), vendar pa so za te potrebni visoki stroški (študije na primatih so prav tako prepovedane). Pogosto uporabljene pa so še gole (neporaščene) podgane, (gole) miši in zajci. Pri študijah na živalih je potrebno paziti, da ne pride do peroralnega vnosa spojine in da ne pride spojina v stik s kletko. Pomembno je tudi, da se živali počutijo lagodno, da ne pride do raznih stresnih dejavnikov. Pri teh študijah uporabljamo 3 načine za vzorčenja spojin, in sicer odvzem in

določitev spojine v krvi ali iztrebkih, lahko merijo količino spojine z biopsijo kože ali pa spojino merijo v vseh tkivih [19].

1.3.3.2 Študije na človeških prostovoljcih

Prednost teh študij so točni, reprezentativni rezultati. Študije so strogo, regulativno nadzorovane, saj so etično sporne. Običajno se izvajajo potem, ko so bile prvotno že izvedene druge študije (*in vitro*, študije na živalih). Dermalna absorpcija je prav tako različno merjena: meritve v plazmi in izločkih tape-stripping, rožene plasti, mikrodializa in radiografija. Vsak način vzorčenja in analize ima svoje prednosti in slabosti, zato se velikokrat poslužujejo kombinacij [19].

1.3.4 Mikroskopske tehnike

Mikroskopske tehnike se uporabljajo za vizualizacijo lokacije delcev oz. aktivnih spojin po opravljenih *in vitro* oziroma *in vivo* izvedenih študijah. S to metodo lahko opazujemo pot, ki jo je opravila določena spojina. Mikroskopske tehnike, ki jih uporabljamo, so SEM (vrstična elektronska mikroskopija), TEM (transmisijska elektronska mikroskopija), CLSM (confocal laser scanning microscopy) in STIM (vrstična transmisijska ionska mikroskopija) [20].

1.3.5 Permeabilnostni testi PAMPA

PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) je eden od novejših testov za vrednotenje pasivnega prehoda spojin skozi različne membrane. Z uporabo različnih vrst umetnih membran, ki temeljijo na tekoči lipidni zmesi, imobilizirani v filtrih na formatu mikrotitrskih plošč s 96 luknjami (slika 1), lahko posnemamo lastnosti različnih barier v organizmu (črevesne, krvno-možganske bariere). Z uporabo določenih sestav lipida v membrani pa lahko deloma posnemamo tudi zgornje plasti kože. Uporabimo lahko različne spojine v različnih kombinacijah, odvisno od tega, kaj natančno želimo preiskovati. Kombinacijo silikonov in izopropil miristata uporabljamo za načrtovanje permeabilnosti človeške kože, predvsem prepustnosti skozi roženo plast. Če pa uporabimo različne analoge ceramidov, ki so podobni tistim v koži, pa lahko testiramo barierne lastnosti kože. Problem te metode je, da je korelacija z *in vivo* situacijo šibkejša kot pri Franzevih difuzijskih celicah ter da so tudi rezultati variabilnejši. Vendar se kljub temu ta metoda uporablja predvsem v začetnih študijah permeabilnosti, saj je dokaj enostavna, primerna za avtomatizacijo in poceni. Po testu PAMPA se uporabljajo različne metode za detekcijo spojin, in sicer UV-VIS-detekcija, tekočinske kromatografije, sklopljene z masno spektroskopijo (LC-MS),

kjer se najpogosteje uporablja UHPLC (tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti) z MS/MS detekcijo [21].



Slika 2: Mikrotiterski plošči za test PAMP

2. NAMEN DELA

Glavni namen diplomskega dela je vzpostavitev analiznih postopkov za sočasno merjenje večjega števila spojin in izvedba poskusa s sočasnim prehajanjem teh spojin skozi kožo v Franzevih difuzijskih celicah.

Spojine bomo izbrali na osnovi pregleda literature, in sicer bomo uporabili spojine, za katere je dokazano, da relativno dobro prehajajo dermalno bariero. Te bomo nato uporabili kot referenčne spojine, s katerimi bomo primerjali permeabilnostne vrednosti drugih izbranih spojin, tudi tistih, katerih dermalna absorpcija je slabša oz. celo nezaželjena. Z uporabo Franzevih difuzijskih celic bomo sočasno določali njihove permeabilnostne lastnosti. Po prvem izboru na osnovi literaturnih virov bomo primernost modelnih spojin preverili še z vidika raztapljanja v donorskem in akceptorskem mediju ter primernosti za sočasno analizo s HPLC.

Za detekcijo in analizo spojin bomo uporabili HPLC (tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti) z UV-VIS-detekcijo, zato bo potreben predhodni razvoj analizne metode. Ta bo morala biti hitra in enostavna, predvsem pa bo morala omogočati sočasno določanje več izbranih spojin.

S tem, ko bomo v enem samem poskusu uporabili večje število spojin, bomo lahko na osnovi dobljenih rezultatov med seboj primerjali in vrednotili vpliv različnih eksperimentalnih pristopov pri delu s Franzevim celicami in mnogo hitreje preverili smiselnost različnih modifikacij in izboljšav.

Kot primer meritve vpliva modifikacije poskusa s Franzevim celicami bomo preverili, ali se ob dodatku solubilizatorja Poloxamera 188 v akceptorski medij v Franzevih celicah spremeni permeabilnost izbranih modelnih spojin.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 SPOJINE

- Kofein: Fluka Chemie GmbH, Švica
- Diklofenak: Sigma Aldrich, Nemčija
- Imidaklopid: Sigma Aldrich, Nemčija
- Metilparaben: Sigma Aldrich, Nemčija
- Propilparaben: Sigma Aldrich, Nemčija
- Oksibenzon: Sigma Aldrich, Nemčija
- Homosalat: Sigma Aldrich, Nemčija
- Gentamicinijev sulfat: Sigma-Aldrich Co., St. Louis, ZDA
- *Para*-hidroksibenzojska kislina: Sigma Aldrich, Nemčija
- Etanol: GRAM-MOL d. o. o., Hrvaška
- Ultra prečiščena voda za HPLC
- Prečiščena voda
- Fosforjeva (V) kislina: Merck KGaA, Nemčija
- Amoniak: Sigma-Aldrich Co., St. Louis, ZDA
- Acetonitril: Sigma Aldrich, Nemčija
- Dinatrijev hidrogen fosfat: Merck KGaA, Nemčija
- Kalijev dihidrogen fosfat: Merck KGaA, Nemčija
- Natrijav klorid: Merck KGaA, Nemčija
- Klorovodikova kislina 1M: Merck KGaA, Nemčija
- Metanol: Sigma Aldrich, Nemčija
- Miglyol 812: Ph Eur, Sasol, Nemčija
- Formična kislina: Ph Eur, Merck KGaA, Nemčija

3.2 APARATURE IN LABORATORIJSKI PRIBOR

- Avtomatska pipeta Eppendorf Research 1000
- pH meter: pH 330i, WTW, Nemčija
- Sonis 4, Iskra pio d. o. o., Slovenija
- Tehtnica XP 205, Mettler Toledo, Švica
- Q-pod: MilliQ, Merck KGaA, Nemčija

- Agilent Chemstation, Agilent Technologies, Nemčija
- Agilent 1100 series series (razplinjevalec, binarna črpalka, termostatirani avtomatski vzorčevalnik za mikrotitrne plošče, termostat za kolono, UV-VIS detektor z nizom diod), Agilent Technologies, Nemčija
- Mikrotitrna ploščica s 96 vdolbinicami, Agilent Technologies, ZDA
- Magnetno mešalo, IKA RCT basic
- Magnetno mešalo IKA RET control/t
- Kolona: Zorbax 3,5 μ m, Eclipse, XDB, C18; 4,6 x 75 mm
- Ultrazvok: Iskra PIO d. o. o., Slovenija
- Pribor za pripravo tkiva: skalpel, gaze, škarjice, pinceta

3.3 PRIPRAVA PUFROV IN RAZTOPIN STANDARDOV ZA RAZVOJ ANALIZNE METODE

3.3.1 Priprava PBS

Za pripravo PBS smo uporabili 1,190 g dinatrijevega hidrogenfosfata dodekahidrata ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$), 0,095 g kalijevega dihidrogenfosfata (KH_2PO_4) in 4,000 g natrijevega klorida (NaCl). Vse skupaj smo kvantitativno prenesli v bučko in dopolnili s prečiščeno vodo do 500 mL. Nato smo izmerili pH, ki je moral biti 7,4. Tako pripravljen pufer smo shranjevali v hladilniku.

3.3.2 Fosfatni pufer

Za fosfatni pufer za mobilno fazo smo 1 L ultra čiste vode najprej dodali 2,5 mL ortofosforne kisline. Nato smo ob sočasnem merjenju pH postopoma dodajali 25-% raztopino amoniaka do končne pH-vrednosti $3,0 \pm 0,1$.

3.3.3 Kofein

Pripravili smo 10-mM raztopino kofeina. 1,94 mg standarda kofeina smo raztopili v 1 mL prečiščene vode. Nato smo 10-mM raztopino razredčili do 10- μ M raztopine kofeina. Redčili smo postopoma, tako da smo najprej dobili 1-mM raztopino, nato 100- μ M raztopino in na koncu 10- μ M raztopino kofeina.

3.3.4 Diklofenak

Pripravili smo 20-mM raztopino diklofenaka. 6,36 mg standarda diklofenaka smo raztopili v 1 mL prečiščene vode. Nato smo 20-mM raztopino razredčili do 10- μ M raztopine diklofenaka.

Redčili smo postopoma, tako da smo najprej dobili 1-mM raztopino, nato 100- μ M raztopino in na koncu 10- μ M raztopino diklofenaka.

3.3.5 Imidakloprid

Pripravili smo 2-mM raztopino imidakloprida. 5,11 mg standarda imidakloprida smo raztopili v 10 mL prečiščene vode. Nato smo 2-mM raztopino razredčili do 10- μ M raztopine imidakloprida. Redčili smo postopoma, tako da smo najprej dobili 1-mM raztopino, nato 100- μ M raztopino in na koncu 10- μ M raztopino imidakloprida.

3.3.6 Gentamicin

Pripravili smo 20-mM raztopino gentamicina. 11,50 mg standarda gentamicina smo raztopili v 1 mL prečiščene vode. Nato smo 20-mM raztopino razredčili do 10 μ M raztopine gentamicina. Redčili smo postopoma, tako da smo najprej dobili 1-mM raztopino, nato 100 - μ M raztopino in na koncu 10- μ M raztopino gentamicina.

3.3.7 Homosalat

Homosalat v visokih koncentracijah, kot jih potrebujemo za osnovne raztopine, ni topen v vodi, zato smo kot topilo uporabili absolutni etanol. Za pripravo 20-mM raztopine smo uporabili 7,00 mg standarda homoslata in 1,34 mL absolutnega etanola. Homosalat smo prav tako redčili do 10- μ M koncentracije. Za to smo uporabili prečiščeno vodo. Postopek redčenja je bil enak kot pri ostalih spojinah.

3.3.8 Oksibenzon

Oksibenzon prav tako ni dovolj topen v vodi, zato smo kot topilo osnovne raztopine uporabili absolutni etanol. V 0,93 mL absolutnega etanola smo raztopili 4,76 mg, da smo dobili 20-mM raztopino oksibenzona. Razredčili smo ga prav tako kot ostale spojine s prečiščeno vodo do 10- μ M raztopine oksibenzona.

3.3.9 Metilparaben

Metilparaben je spojina, ki je topna tako v hidrofilnih topilih kot tudi v lipofilnih topilih. Mi smo metilparaben raztopili v prečiščeni vodi. Tako smo 4,35 mg spojine raztopili v 1,43 mL vode, da smo dobili 20-mM raztopino, ki smo jo postopoma razredčili do 10- μ L. Najprej do 1-mM raztopine, nato do 100- μ M raztopine in na koncu do 10- μ M raztopine MP.

3.3.10 Propilparaben

Propilparaben pa je bolj lipofilen konzervans, zato smo ga morali raztopiti v absolutnem etanolu. V 0,95 mL etanola smo za 20-mM raztopino raztopili 3,43 mg propilparabena. Nato smo 20-mM raztopino postopoma redčili do 10- μ M koncentracije. Najprej do 1-mM raztopine, nato do 100- μ M raztopine in na koncu do 10- μ M raztopine PP. Za redčenje smo uporabili prečiščeno vodo.

3.4 POSTOPKI IN METODE

3.4.1 Razvoj analiznih metod

Preden smo se lotili eksperimenta s kožo, je bilo potrebno razviti analizne metode za HPLC, saj smo s tem analizirali vzorce in detektirali posamezne spojine v njih. Eden od ciljev razvoja je bil, da so te metode hitre, enostavne, predvsem pa, da merijo večje število spojin naenkrat. Za detekcijo smo uporabili kolono ZORBAX 3,5 μ m, Eclipse, XDB, C18, 4,6 x 75 mm. Za vse metode je veljalo, da je temperatura kolone 50 °C, pretok pa je bil od 1,5 mL/min ali 2,0 mL/min.

Za razvoj metod smo uporabili redčitve standardov, ki smo jih vnaprej pripravili. Začeli smo tako, da smo najprej z analizno metodo detektirali posamezno spojino, ugotovili njen retencijski čas in optimalno valovno dolžino za detekcijo. Nato pa smo spojine združili in metodo prilagodili za sočasne meritve vseh spojin iz iste injicirane raztopine. Na začetku smo uporabili kot mobilno fazo fosfatni pufer in organski modifikator acetonitril (ACN). Uporaba fosfatnega pufra je omogočala nadzor nad pH-vrednostjo, ki je potreben, da je oblika vrhov šibkih kislin in baz ustrezna, obenem pa je v tej mobilni fazi možno spremljati absorbanco spojin od 190 nm navzgor. Metodo smo nastavili tako, da se je s časom povečeval odstotek ACN v mobilni fazi. Ko smo prišli do homosalata, pa je nastal problem s fosfatnim pufrom. Zaradi nevarnosti obarjanja pufra namreč nismo smeli uporabiti dovolj visokih koncentracij ACN, da bi se spojina eluirala, zato smo namesto pufra uporabili kar ultra čisto vodo. Tako smo omogočili tudi elucijo močno nepolarnih spojin in izmerili njihove UV-spektre ter tako določili valovno dolžino za detekcijo. Vendar pa tudi takšna mobilna faza ni bila ustrezna. Resda smo pridobili vrhove UV-filtrov, ko pa smo želeli analizirati kombinacijo spojin, so bile oblike vrhov bolj polarnih spojin (diklofenak, kofein, paraben) neprimerne, retencijski časi pa preblizu skupaj, zaradi česar je bila ločljivost preslaba. Zato smo ultra čisto vodo zamenjali z 0,1-% formično kislino, ki se je izkazala za ustrezno, saj smo na tej stopnji že vedeli, da delamo le s spojinami, ki dobro absorbirajo svetlobo nad 240 nm.

Med razvojem analizne metode smo iz različnih razlogov izključili dve spojini, gentamicin in homosalat. S HPLC-tehniko nismo dobili ustreznih vrhov v kromatogramu. Gentamicin je zelo polaren in bi ga na isti koloni le težko analizirali sočasno z ostalimi spojinami, poleg tega pa zaradi nizke valovne dolžine absorpcijskega maksimuma detekcija v mobilni fazi s formično kislino ne bi bila možna. Rezultati s homosalatom so predvsem kazali na veliko verjetnost obarjanja in/ali vezave na laboratorijske materiale, kar pa tudi ni primerno za kombinacijo spojin, ki naj bi bila splošno uporabna v različnih eksperimentih. Vsaki posamezni spojini smo še z gradientno metodo določili retencijski čas, ki je bil ključnega pomena, da smo nato z njim poleg UV-spektra prepoznavali to spojino v kromatogramih in določali njeno koncentracijo. Na koncu smo uporabili metodo, ki je v najkrajšem času detektirala vse spojine iz našega nabora za posamično donorsko raztopino.

3.4.2 Priprava raztopine spojin v Miglyolu 812 in raztopine spojin v PBS

Spojine smo na kožo nanašali v obliki raztopin. Kot hidrofilni medij smo uporabili PBS, kot lipofilni medij pa Miglyol 812. V primeru spojine, topne v obeh medijih, smo lahko primerjali, kako na permeabilnost vpliva donorski medij.

Pripravili smo dve donorski raztopini. Pri prvi donorski raztopini smo v Miglyolu 812 raztopili 10 mM kofeina, 20 mM metilparabena, 20 mM propilparabena in 20 mM oksibenzona. Spojine smo dodajali postopoma ter mešali z magnetnim mešalom, da so se raztopile. Kofein se je najdlje raztapljal, zato smo ga dodali prvega.

Pri drugi donorski raztopini smo v PBS raztopili 20 mM kofeina, 20 mM diklofenaka, 2 mM imidakloprida in 20 mM metilparabena. Tako kot pri prvi smo tudi tukaj spojine dodajali postopoma ter vse skupaj mešali z magnetnim mešalom. Pri tej raztopini pa je nastal problem. Zmes namreč ni stabilna, če jo pripravimo vnaprej (že po nekaj urah se pojavijo spremembe). Prišlo je do obarjanja belih kristalčkov. Nismo se ukvarjali z raziskovanjem vzroka, vendar smo raztopino pripravili pred poskusom, kar se je obneslo.

3.4.3 Izdelava umeritvene premice

Za določanje količine snovi v vzorcih smo morali izdelati umeritvene krivulje za posamezne spojine, da bomo lahko iz njih razbrali koncentracije.

Za kofein, imidaklopid, metilparaben in diklofenak smo uporabili kar njihovo donorsko raztopino v PBS (raztopino 2). To smo redčili po naslednjem postopku (preglednica I):

Preglednica I: Preglednica redčenja kalibracijskih raztopin za pripravo umeritvene krivulje

	Kalibracijske raztopine (Kal. r.)									
Redč. r.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Don. razt.	50 μL									
Kal. r. 1		500 μL	200 μL	100 μL						
Kal. r. 4					500 μL	200 μL	100 μL			
Kal. r. 7								500 μL	200 μL	100 μL
PBS	950 μL	500 μL	800 μL	900 μL	500 μL	800 μL	900 μL	500 μL	800 μL	900 μL
FR	20	40	100	200	400	1000	2000	4000	10000	20000

Nato smo po 250 μL vzorcev prenesli iz epic na mikrotitersko ploščico. Paziti smo morali, da je HPLC-meritve izvajal od najbolj razredčenih vzorcev do najmanj razredčenih, saj smo tako zmanjšali morebitni vpliv navzkrižnega prenosa.

Propilparabena in oksibenzona ne moremo neposredno raztopiti v PBS, zato smo oba najprej raztopili v metanolu in ju šele nato razredčili v PBS. Zato smo 3,60 mg propilparabena oz. 4,56 mg oksibenzona raztopili v 1 mL 100-% metanola (MeOH), tako da smo dobili 20-mM osnovni raztopini. Nato smo vzeli po 50 μL vsake raztopine ter ju redčili z 950 μL MeOH. Dobili smo 1-mM raztopino PP in 1-mM raztopino oksibenzona v 100-% MeOH. Ti dve smo nadalje še 5-krat redčili s prečiščeno vodo (200 μL raztopine + 800 μL H₂O), rezultat sta bili 200- μM raztopini v 20-% MeOH. Nato smo ju še 10-krat razredčili z 20-% MeOH (100 μL raztopine + 900 μL 20-% MeOH). Tako smo prišli do 20- μM raztopin v 20-% MeOH, ki smo jo nadalje razredčili s PBS. Postopek redčenja je bil enak kot pri hidrofilnih spojinah (vzorci od 5 do 10). Razredčene kalibracijske raztopine smo prav tako prestavili na mikrotitersko ploščo, s katere smo vzorčili za HPLC-injiciranje.

3.4.4 Priprava kože

V poskusih smo uporabili kožo zamrznjenih prašičjih uhljev živali, ki so bile usmrčene v prehrambene namene. Uhelj (zamrznjen največ 1 mesec) smo najprej odmrznili ter dobro, vendar precizno, očistili s prečiščeno vodo. S škarjicami smo postrigli dlake, nato pa s skalpelom previdno ločili kožo od hrustanca ter pazili, da kože ne poškodujemo. Pozorni smo bili tudi na to, da smo odstranili vso podkožno maščobo, ki bi lahko motila difuzijo v akceptorski medij. Ustrezne velike kose kože (slika 3) smo nato vstavili med donorski in akceptorski del Franzeve difuzijske celice.



Slika 3: Vzorec kože po opravljenem eksperimentalnem delu

3.4.5 Sestava Franzeve difuzijske celice

Dan pred izvedbo poskusa smo pripravili Franzeve difuzijske celice tako, da smo jih najprej razvrstili in označili z zaporednimi številkami. Akceptorski del Franzeve celice (FC) smo s pomočjo avtomatske pipete napolnili s svežim medijem PBS (tako smo zagotovili enak volumen medija tekom celotnega eksperimenta). Nanj smo položili vzorec kože in nato še donorski del FC, ki smo ga s prižemo dobro fiksirali na akceptorski del FC. Mesto, namenjeno vzorčenju, smo nato zaprli z obrušnim zamaškom, da smo preprečili izhlapevanje medija. Celice smo postavili v vodne kopeli s temperaturo vode 37 °C (s tem zagotovimo temperaturo 32 °C na površini kože) ter jih pustili čez noč, da se je koža hidrirala. Tako med poskusom zagotovimo ponovljivo stanje kože (ustrezno hidratirano), ki je podobno stanju *in vivo*.

3.4.6 Eksperimentalno delo

Naše eksperimentalno delo je bilo sestavljeno iz dveh poskusov, ki sta temeljila na razliki v uporabi dveh različnih akceptorskih medijev. V prvem delu smo kot akceptorski medij v

Franzevih difuzijskih celicah uporabili samo PBS, v drugem pa smo PBS dodali polimer Poloxamer 188.

3.4.6.1 Določanje permeabilnosti več spojin hkrati ter uporaba PBS za akceptorski medij

Za prvi poskus smo uporabili 12 Franzevih difuzijskih celic: v primeru šestih smo kot donorski medij uporabili raztopino spojin v Miglyolu 812, pri drugih pa raztopino spojin v PBS.

Poskus smo začeli tako, da smo celicam, ki smo jih pustili stati čez noč, zamenjali akceptorski medij (tako smo odstranili komponente kože, ki so tekom hidratacije skozi noč prehajale v akceptorski medij). Na kožo smo odpipetirali po 1 mL donorske raztopine ter vse skupaj potopili v vodno kopel. Predpostavili smo, da imamo opravka s t. i. neskončnim odmerkom, se pravi, da je koncentracija testne spojine dovolj velika, da med poskusom ne pride do odstopanj. Temperatura vodne kopeli je bila 37 °C, hitrost mešanja pa smo nastavili na 800 rpm. V primeru, ko smo kot donorsko raztopino uporabili PBS, smo donorski del pokrili z zamaškom, da ni prišlo do izhlapevanja. Po 30 minutah smo začeli s prvim vzorčenjem. Z avtomatsko pipeto smo iz akceptorskega dela odpipetirali po 250 uL vzorca in ga prenesli na mikrotitersko ploščo. Odvzeti volumen medija smo nadomestili s svežim PBS. Ta postopek smo ponovili za vse celice. Vzorce na mikrotiterski plošči smo nato pokrili s silikonskim tesnilom, da ne bi prišlo do kakršnega koli onesnaženja ali izhlapevanja vzorca.

Postopek vzorčenja smo nato ponovili po 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 urah in na koncu še po 24 urah. Poskus smo zaključili z analizo vzorcev s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).

3.4.6.2 Določanje permeabilnosti več spojin hkrati in vpliv dodatka Poloxamera 188 v akceptorski medij

Drugi del poskusa se ni bistveno razlikoval od prvega. PBS, ki smo ga uporabili za akceptorski medij v FC, smo dodali Poloxamer 188. Poleg tega v raztopini, kjer je bilo topilo PBS, nismo raztopili MP.

Uporabili smo 6 Franzevih celic namesto 12. Postopek priprave in detekcije pa je potekal enako, kot je zapisano v poglavju 3.4.7.1.

3.4.7 Izdelava umeritvene krivulje za para-hidroksibenzojsko kislino

Že po prvem poskusu smo na kromatogramu opazili vrh, katerega retencijski čas ni ustrezal nobeni od spojin iz donorske raztopine, medtem ko je bil UV-spekter zelo podoben spektrom

uporabljenih parabenov. Zato smo sklepali, da gre za *para*-hidroksibenzojsko kislino, ki je po vsej verjetnosti posledica metabolizma metil- in propilparabena v koži. Da smo lahko izračunali koncentracijo spojine v akceptorskem mediju, smo morali tudi za p-HBk izdelati umeritveno krivuljo.

V ta namen smo uporabili standard *para*-hidroksibenzojske kisline, kot medij za redčenje smo uporabili PBS in redčili po enakem postopku, kot smo redčili hidrofilne spojine (preglednica I). Redčitve spojine smo z razvito analizno metodo pomerili na HPLC.

Na ta način smo tako lahko spremljali, koliko metil- oziroma propilparabena gre skozi kožo v nespremenjeni obliki in koliko ga hidrolizira v kislino.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 ANALIZNA METODA

Cilj naše naloge je bil razviti gradientno metodo, ki bo v najkrajšem času in z zadovoljivo občutljivostjo zaznala vse modelne spojine, uporabljene v eni donorski raztopini. Ker smo uporabili dve različni donorski raztopini, v katerih smo raztapljali modelne spojine, smo za vsako razvili po eno metodo. Za obe analizni metodi smo uporabili kolono ZORBAX Eclipse, XDB, C18, 3,5 μm , 4,6 x 75 mm. Prav tako je za obe metodi veljalo, da je volumen injiciranja 100 μL , pretok 2,00 mL/min, temperatura kolone pa 50 °C. Komponenti A in B sta bili prav tako v obeh metodah enaki. Za komponento A smo uporabili 0,1-% formično kislino, za komponento B pa acetonitril, vendar pa je bila razlika v njunem razmerju, ki se je s časom spreminjalo (preglednica II).

Preglednica II: Analizne metode – razmerje med komponento A in komponento B

Miglyol 812 kot donorski medij (analizirane spojine: kofein, MP, PP, oksibenzon)		
ČAS	Delež komponente A	Delež komponente B
1 min	90	10
12 min	30	70
14,5 min	5	95
PBS kot donorski medij (analizirane spojine: kofein, diklofenak, imidakloprid, MP)		
1 min	90	10
10,5 min	40	60
14 min	5	95

Da smo lahko pomerili kromatograme vseh spojin, smo morali uporabiti različne valovne dolžine, pri katerih so se snemali kromatogrami. V primeru Miglyola 812 smo uporabili 256 nm, kjer so absorpcijski maksimumi pHBk, MP in PP, 272 nm, kjer absorbira kofein, ter 320 nm za oksibenzon. Pri metodi, kjer pa je bila donorska raztopina PBS, smo pri 256 nm posneli kromatogram za kvantifikacijo pHBk in MP, pri 272 nm za kofein in pri 284 nm za diklofenak.

Da smo lahko pomerili kromatograme vseh spojin, smo morali dodati določene valovne dolžine, pri katerih so se izvajale meritve. V primeru Miglyola 812 smo pod A dodali 256 nm, kjer so absorpcijski maksimumi pHBk, MP in PP, 272 nm, kjer absorbira kofein, ter 320 nm za oksibenzon. Pri metodi, kjer pa je bila donorska raztopina PBS, smo dodali valovno dolžino 256 nm za pHBk in MP, 272 nm za kofein in 284 nm, kjer absorbira diklofenak.

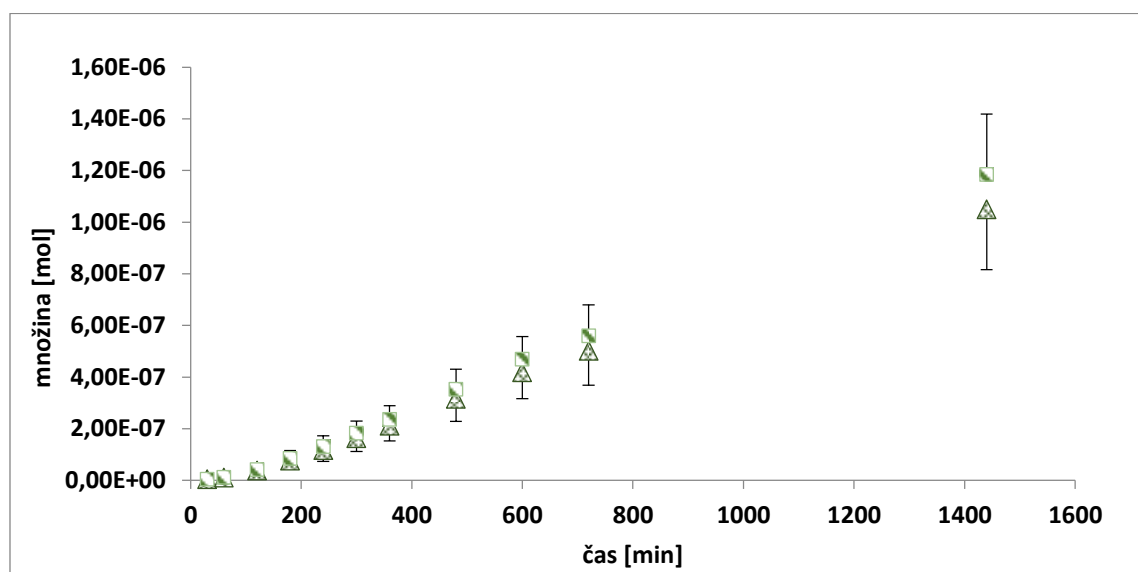
Dodali smo še »post time« (čas, ki ga potrebuje sistem, da se povrne v začetne pogoje gradientne analize), ki je znašal 2,5 min.

4.2 Določanje permeabilnosti več spojin hkrati ter uporaba PBS za akceptorski medij

4.2.1 Kofein

V vzorcih akceptorskega medija iz prvega dela poskusa smo detektirali sorazmerno visoke koncentracije spojine, s čimer smo potrdili dobro permeabilnost kofeina. Iz tega lahko sklepamo, da je kofein spojina, ki dobro prehaja kožo. Kofein smo zato lahko v nadaljevanju uporabili kot modelno spojino za oceno dobre permeabilnosti skozi kožo. Poleg tega je kofein topen v obeh topilih, v PBS in Miglyolu 812, zato je lahko opazovali vpliv donorskega medija na permeabilnost spojine, kjer smo ugotovili, da kofein bolje prehaja kožo, ko za donorski medij uporabimo PBS.

Rezultati, povprečje množin spojine v odvisnosti od časa ter standardna deviacija, so prikazani na sliki 4.



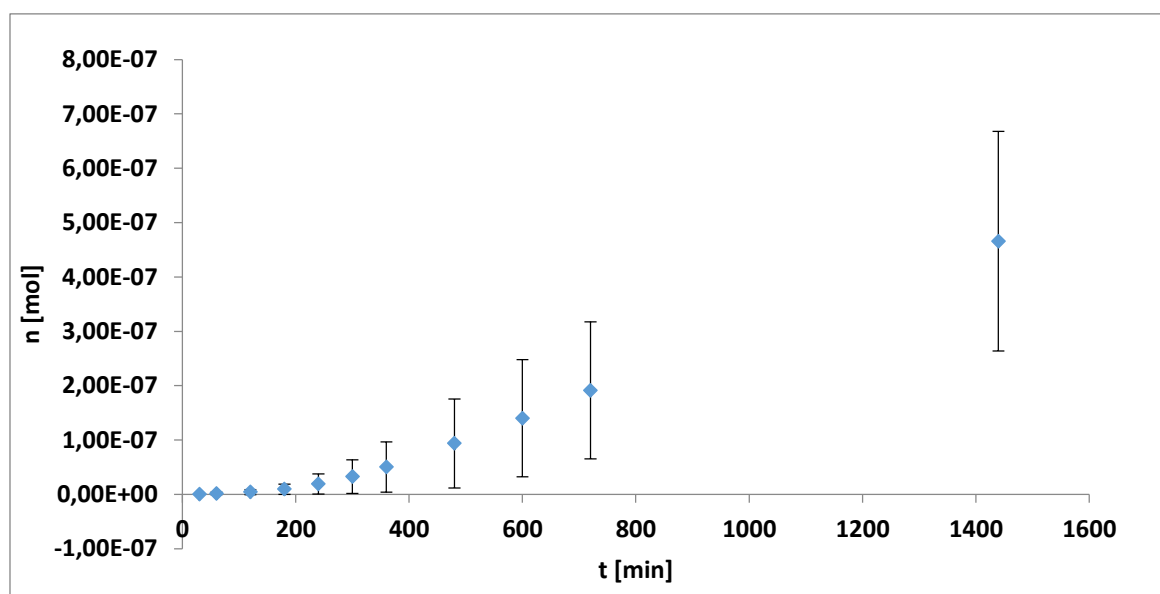
Slika 4: Permeabilnost kofeina v prvem poskusu (trikotnik – povprečje množin vzorcev, raztopljenih v Miglyolu 812 s standardno deviacijo – SD)prikazali smo samo pozitivno

vrednost SD], kvadrat – povprečje množin vzorcev, raztopljenih v PBS, s standardno deviacijo – SD [prikazali smo samo pozitivno vrednost SD])

4.2.2 Diklofenak

Diklofenak smo zaradi njegove hidrofilnosti lahko raztopili le v PBS, zato vpliva donorskega medija pri tej spojini nismo opazovali. Visoka koncentracija spojine v akceptorskem mediju potrjuje dobro permeabilnost spojine.

Rezultati, povprečje množin spojine v odvisnosti od časa, ter standardni odklon so prikazani na sliki 5.

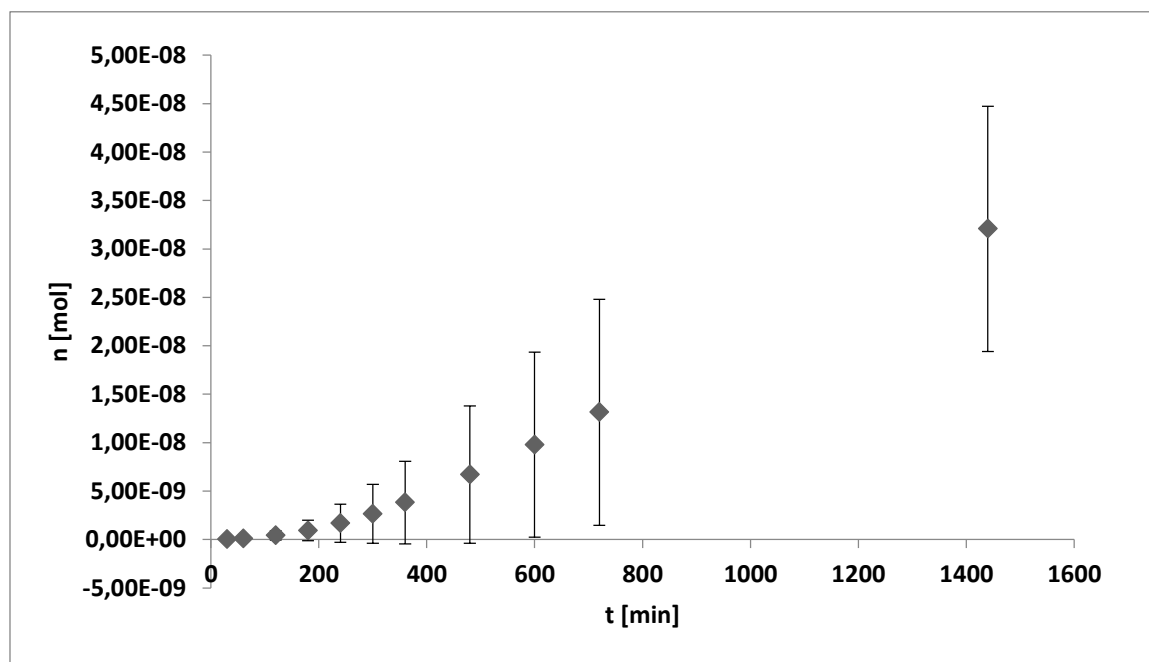


Slika 5: Permeabilnost diklofenaka v prvem poskusu (povprečje množin vzorcev, raztopljenih v PBS, s standardnim odklonom – SD)

4.2.3 Imidakloprid

Imidakloprid smo, enako kot diklofenak, lahko raztopili v PBS. Povprečje množin spojine, ki je prešla v akceptorski medij, je od kofeina in diklofenaka odstopalo le za en velikostni razred, kar dokazuje, da spojina dobro prehaja v kožo.

Rezultati, povprečje množin spojine v odvisnosti od časa ter standardni odklon, so prikazani na sliki 6.

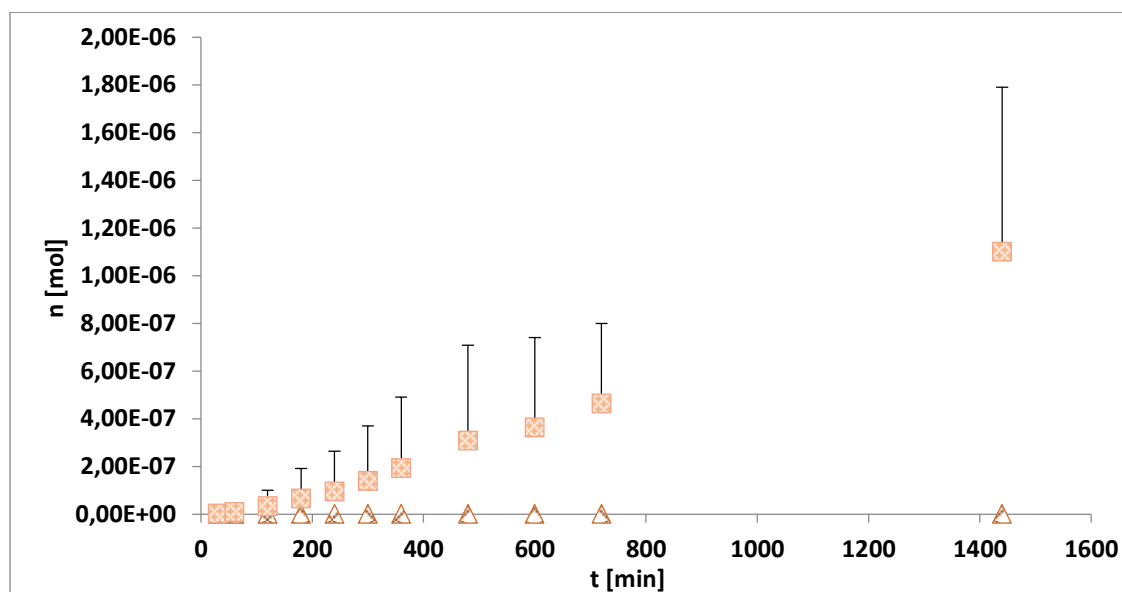


Slika 6: Permeabilnost imidakloprida v prvem poskusu (povprečje množin vzorcev, raztopljenih v PBS s standardnim odklonom – SD)

4.2.4 Metilparaben

MP smo, enako kot kofein, lahko raztopili v obeh donorskih medijih. Iz rezultatov je razvidno, da je spojina raztopljena v PBS (vodnem mediju), dobro prehajala kožo. Ko smo kot donorski medij uporabili lipofilen Miglyol 812, pa je bila permeabilnost zelo nizka. Vendar pa smo v obeh primerih v vzorcih detektirali še *p*-HBk, metabolit parabenov, ki je vplivala na končne rezultate (opisano v poglavju 4.4).

Rezultati, povprečje množin spojine v odvisnosti od časa ter standardni odklon, so prikazani na sliki 7.

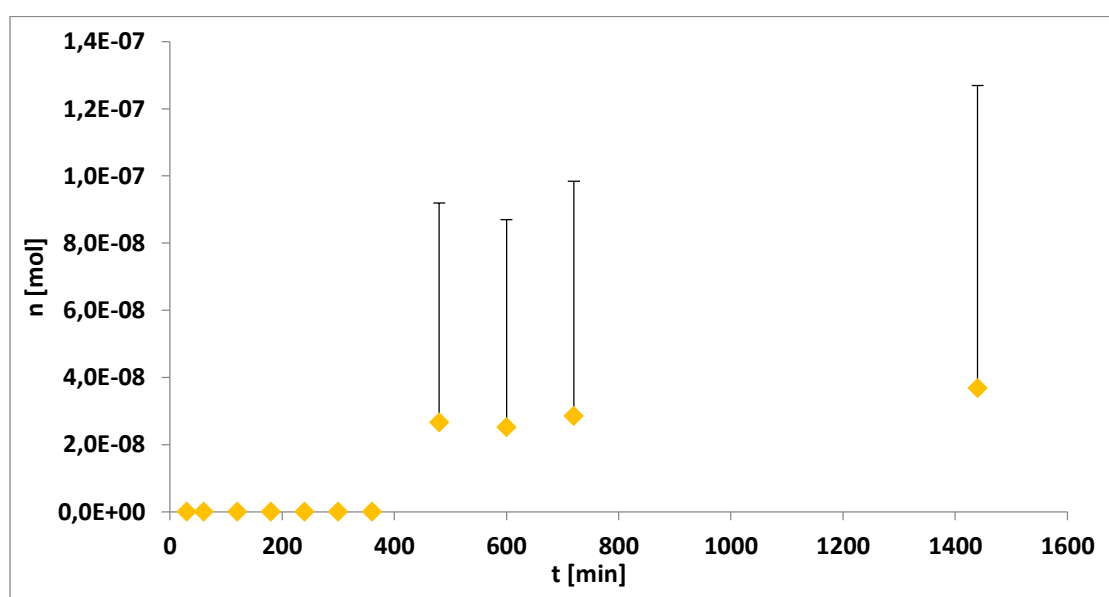


Slika 7: Permeabilnost metilparabena v prvem poskusu (trikotnik – povprečje množin vzorcev, raztopljenih v Miglyolu 812, s standardnim odklonom [vrednosti SD so tako nizke, da se na grafu ne vidijo], kvadrat – povprečje množin vzorcev, raztopljenih v PBS, s standardnim odklonom – SD [prikazali smo samo pozitivno vrednost SD])

4.2.5 Propilparaben

PP ima za dva C-atoma daljšo verigo od MP, zato je netopen v vodnih topilih. Raztopili smo ga v Miglyolu 812, kjer pa je bila njegova permeabilnost v kožo zelo nizka. Koncentracija spojine v akceptorskem mediju ni naraščala linearno s časom. Do 360. minute (6 ur) je bila permeabilnost enaka 0, pri 480. minuti (8 ur) pa se je koncentracija spojine znatno povečala. Predvidevamo, da je vzrok metabolizem v *p*-HBk (poglavje 4.4) ali pa je prišlo do navzkrižnega prenosa preiskovane spojine v akceptorsko raztopino.

Rezultati, povprečje množin spojine v odvisnosti od časa ter standardni odklon, so prikazani na sliki 8.

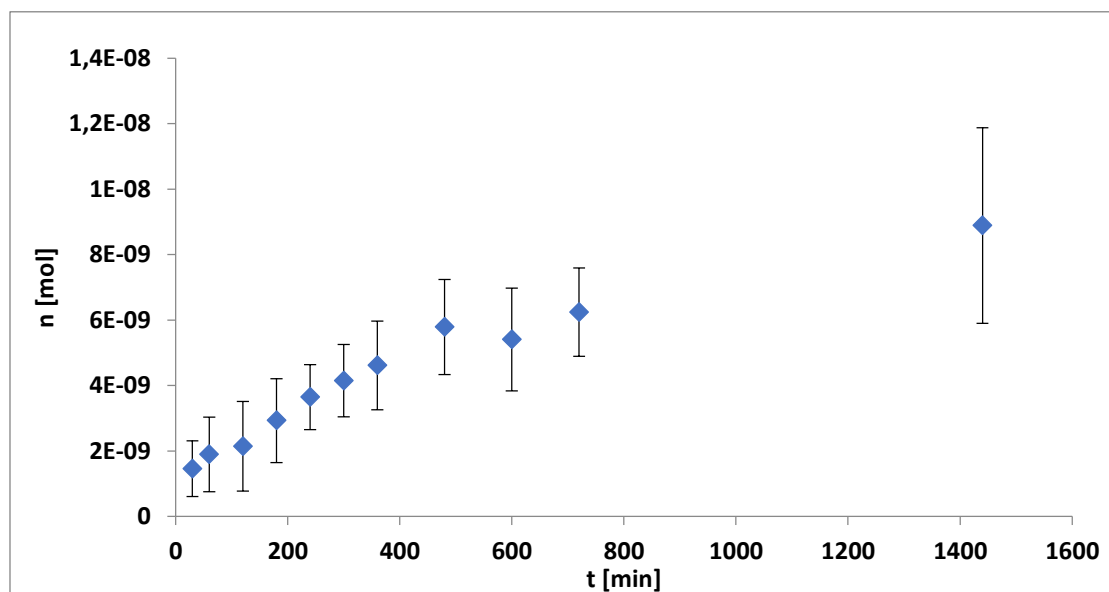


Slika 8: Permeabilnost propilparabena v prvem poskusu (povprečje množin vzorcev, raztopljenih v Miglyolu 812, s standardnim odklonom – SD [prikazane so samo pozitivne vrednosti SD])

4.2.6 Oksibenzon

Za oksibenzon smo kot donorski medij uporabili Miglyol 812. Izkazalo se je, da je oksibenzon zelo slabo permeabilna spojina, njegove koncentracije v akceptorskem mediju so bile zelo nizke (kar za tri velikostne razrede nižje od kofeina), komaj nad mejo kvantifikacije.

Rezultati, povprečje množin spojine v odvisnosti od časa ter standardni odklon, so prikazani na sliki 9.



Slika 9: Permeabilnost oksibenzona v prvem poskusu (povprečje množin vzorcev, raztopljenih v Miglyolu 812, s standardnim odklonom – SD)

V preglednici III so predstavljene povprečne permeabilnostne vrednosti ter standardna deviacija spojin, raztopljenih, v Miglyolu 812, kjer smo kot akceptorski medij uporabili PBS. Za PP meritve med seboj preveč odstopajo, zato povprečje Papp ne bi bilo relevantno.

Preglednica III: Povprečna vrednost in standardni odklon Papp (nm/s) spojin v prvem poskusu (donorska raztopina Miglyol 812)

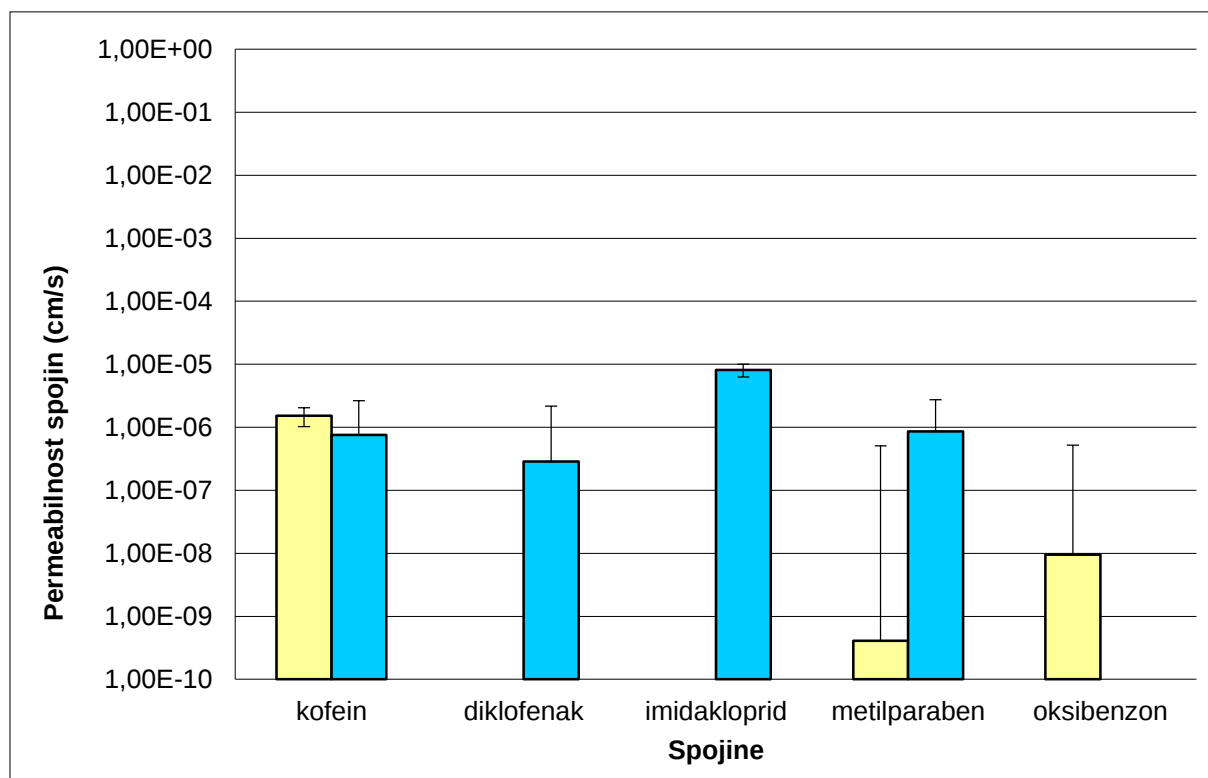
	Spojine		
	kofein	metilparaben	oksibenzon
Povprečna vrednost [nm/s]	15,34	0,004	0,095
Standardni odklon [nm/s]	3,67	0,002	0,01

V preglednici IV so predstavljene povprečne permeabilnostne vrednosti in standardna deviacija spojin, raztopljenih v PBS, kjer smo kot akceptorski medij uporabili PBS.

Preglednica IV: Povprečna vrednost in standardni odklon Papp (nm/s) spojin v prvem poskusu (donorska raztopina PBS)

	Spojine			
	kofein	diklofenak	imidakloprid	metilparaben
Povprečna vrednost [nm/s]	7,52	2,86	2,04	8,60
Standardni odklon [nm/s]	1,58	1,91	1,77	7,16

Na sliki 10 je predstavljen stolpčni diagram povprečnih vrednosti Papp spojin v obeh donorskih raztopinah. Iz grafa razberemo, da je kofein najbolj permeabilen (ne glede na to, v katerem mediju se nahaja) od izbranih preiskovanih spojin.



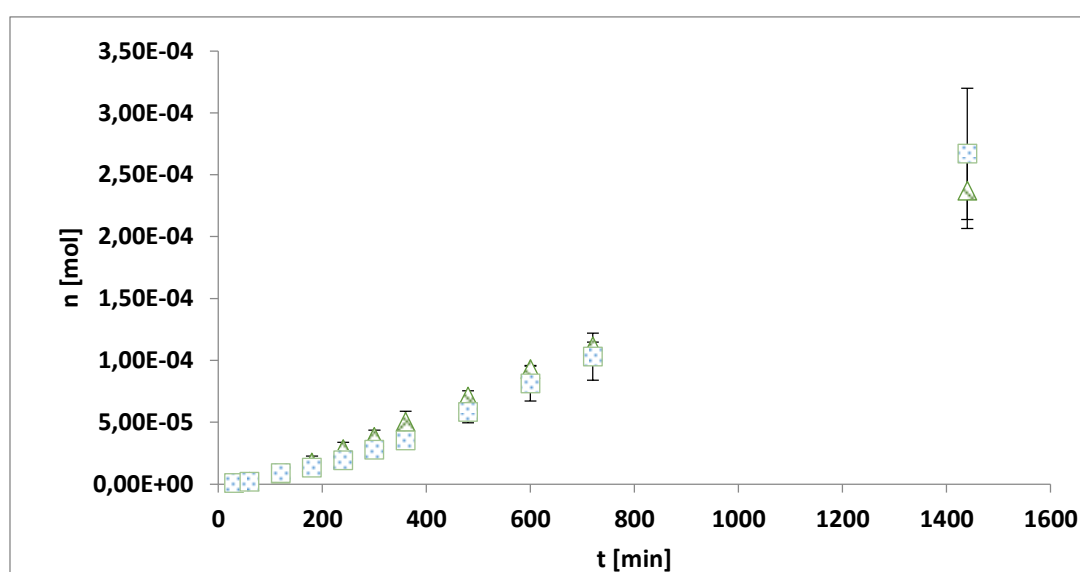
Slika 10: Stolpčni diagram povprečnih vrednosti Papp (nm/s) s standardnim odklonom spojin v prvem poskusu, stolpci v rumeni barvi predstavljajo donorske raztopine, pripravljene v Miglyolu 812, stolpci modre barve pa v PBS (rezultati so predstavljeni v logaritemski skali)

4.3 Določanje permeabilnosti več spojin hkrati in vpliv dodatka Poloxamera 188 v akceptorski medij

4.3.1 Kofein

Po dodatku Poloxamera 188 v akceptorski medij se je opazno (za en velikostni razred) permeabilnost spremenila le pri kofeinu, raztopljenem v PBS. Pri kofeinu, raztopljenem v Miglyolu 812, večjih sprememb nismo opazili.

Na sliki 11 je prikazano povprečje množin kofeina v akceptorskem mediju v odvisnosti od časa.

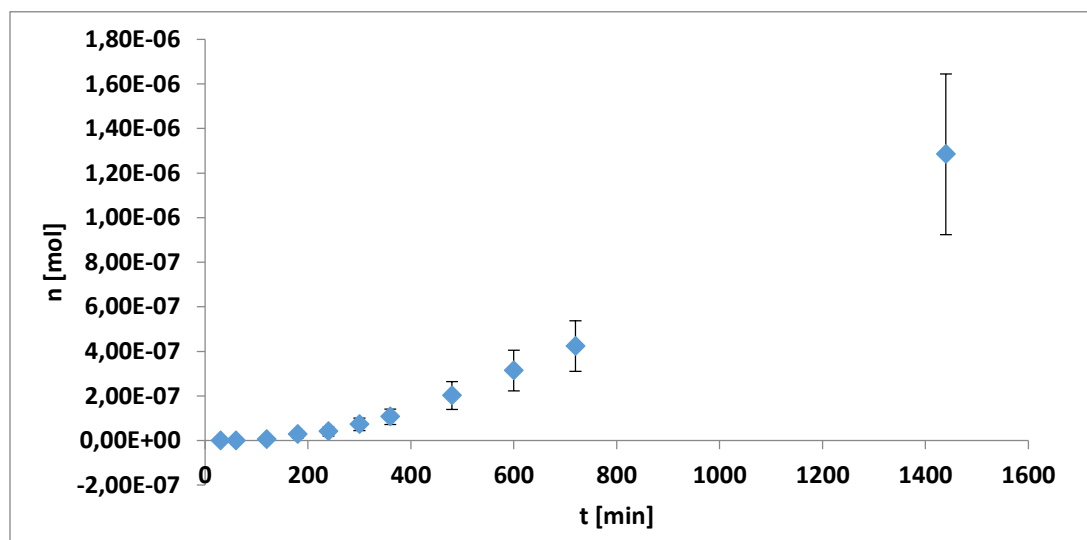


Slika 11: Permeabilnost kofeina v drugem poskusu pri dodatku Poloksamera 188 v akceptorsko raztopino (trikotnik – povprečje množin vzorcev, raztopljenih v Miglyolu 812 s standardnim odklonom, kvadrat – povprečje vzorcev, raztopljenih v PBS, s standardnim odklonom – SD)

4.3.2 Diklofenak

Po dodatku Poloxamera 188 se permeabilnost diklofenaka ni bistveno povečala, iz česar sklepamo, da dodatek Poloxamera 188 v akceptorski medij ne vpliva na njegovo permeabilnost skozi kožo.

Na sliki 12 je prikazano povprečje množin diklofenaka v akceptorskem mediju v odvisnosti od časa.

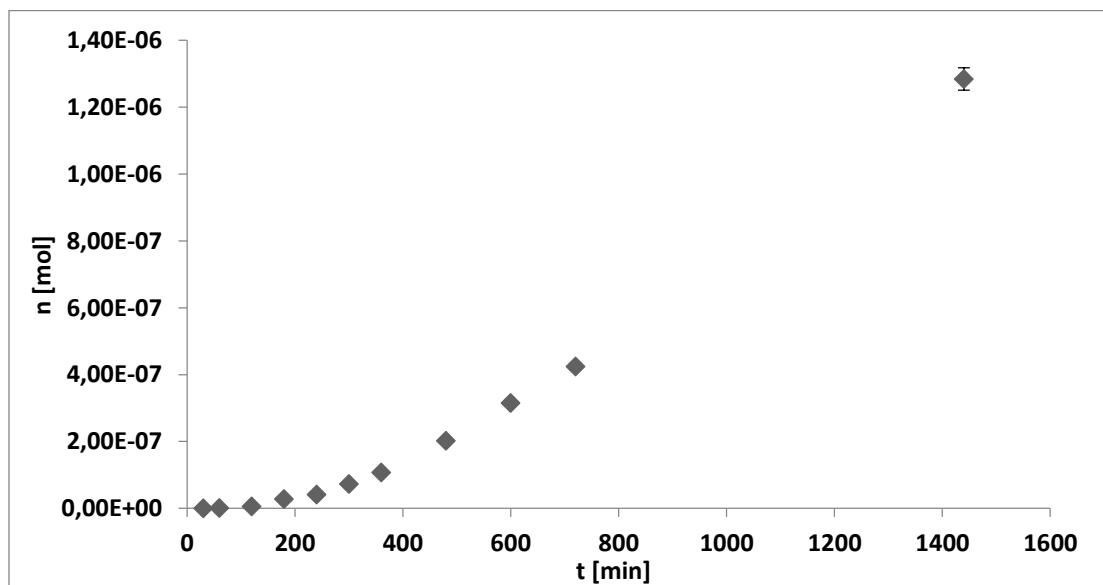


Slika 12: Permeabilnost diklofenaka v drugem poskusu pri dodatku polimera v akceptorsko raztopino (povprečje vzorcev, raztopljenih v PBS, s standardnim odklonom)

4.3.3 Imidakloprid

Enako kot pri diklofenaku tudi na imidakloprid Poloxamer 188 ni bistveno vplival. Permeabilnostne vrednosti so ostale v istem velikostnem razredu.

Na sliki 13 je prikazano povprečje množin imidakloprida v akceptorskem mediju v odvisnosti od časa.

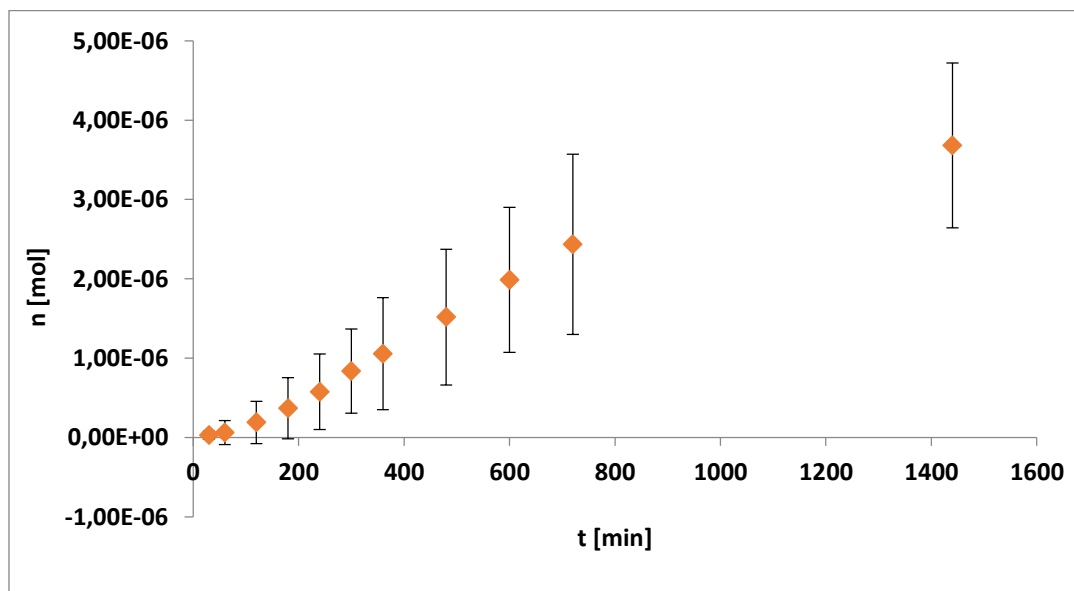


Slika 13: Permeabilnost imidakloprida v drugem poskusu pri dodatku polimera v akceptorsko raztopino (povprečje vzorcev, raztopljenih v PBS, s standardnim odklonom)

4.3.4 Metilparaben

MP smo v drugem delu poskusa raztopili le v PBS. Pri tej spojini pa je Poloxamer 188 vplival na permeabilnost, tako da se je ob dodatku v akceptorski medij njegova permeabilnost povečala za en velikostni razred (enako kot pri kofeinu).

Na sliki 14 je prikazano povprečje množin MP v akceptorskem mediju v odvisnosti od časa.

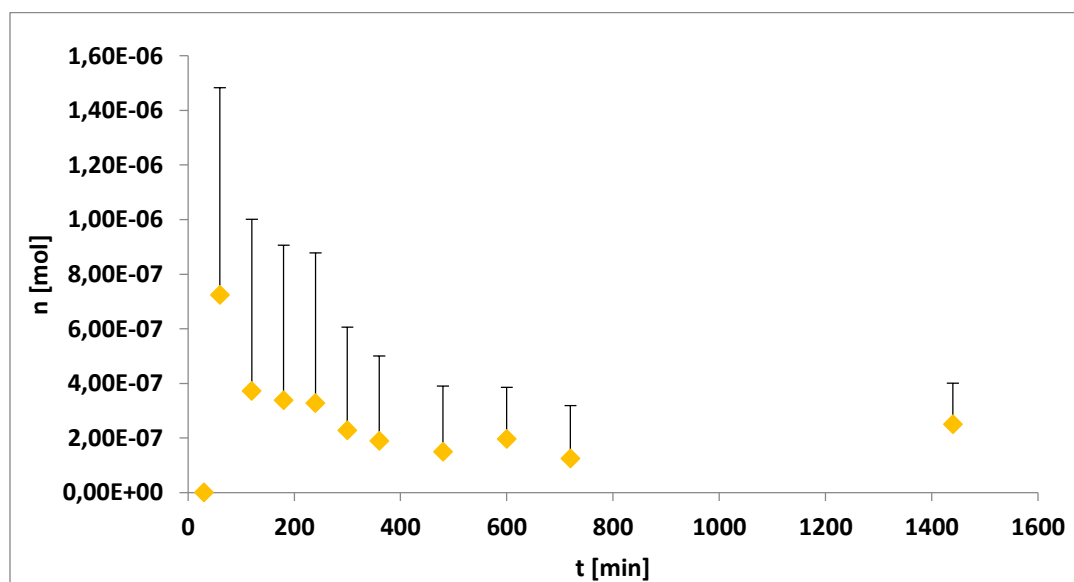


Slika 14: Permeabilnost metilparabena v drugem poskusu pri dodatku polimera v akceptorsko raztopino (povprečje vzorcev, raztopljenih v PBS, s standardnim odklonom)

4.3.5 Propilparaben

Za PP enako kot v prvem delu poskusa ne moremo določiti Papp, saj so vrednosti zelo nizke. V intervalu pri 300 min pride do velikega odstopanja, sklepamo, da je prišlo do onesnaženja vzorca in posledično do napačne meritve.

Na sliki 15 je prikazano povprečje množin PP v akceptorskem mediju v odvisnosti od časa.

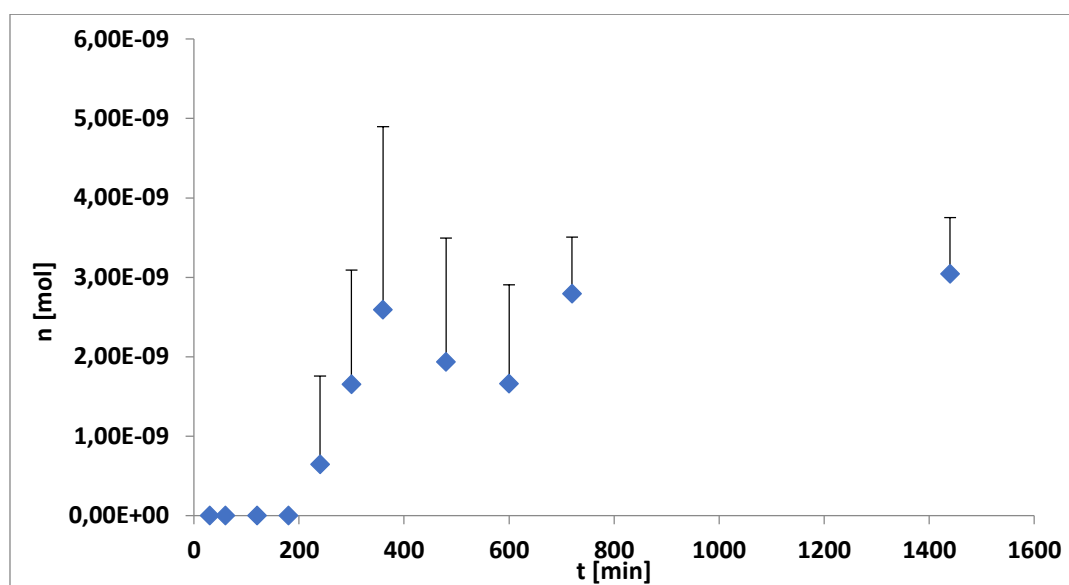


Slika 15: Permeabilnost propilparabena v drugem poskusu pri dodatku polimera v akceptorsko raztopino (povprečje vzorcev, raztopljenih v Miglyolu 812, s standardnim odklonom [prikazali smo samo pozitivne vrednosti SD])

4.3.6 Oksibenzon

Pri oksibenzonu smo v drugem delu poskusa zaznali še nižje koncentracije spojine v vzorcih iz akceptorskega medija kot v prvem delu. Vendar pa ne moremo trditi, da je to posledica dodatka Poloxamera 188, saj so v obeh primerih vrednosti zelo nizke (komaj nad mejo kvantifikacije). Prav tako je v intervalu 300 min prišlo do velikega odstopanja, ki je po vsej verjetnosti posledica onesnaženega vzorca.

Na sliki 16 je prikazano povprečje množin oksibenzona v akceptorskem mediju v odvisnosti od časa.



Slika 16: Permeabilnost propilparabena v drugem poskusu pri dodatku polimera v akceptorsko raztopino (povprečje vzorcev, raztopljenih v Miglyolu 812, s standardnim odklonom [prikazali smo samo pozitivne vrednosti])

V preglednici V so predstavljene povprečne permeabilnostne vrednosti ter standardna deviacija spojin, raztopljenih v Miglyolu 812, kjer smo kot akceptorski medij uporabili PBS z dodatkom Poloxamera 188. Povprečna vrednost Papp za PP prav tako ni relevantna, saj meritve med sabo preveč odstopajo.

Preglednica V: Povprečna vrednost in standardna deviacija Papp (nm/s) spojin v drugem poskusu (spojine, raztopljene v Miglyolu 812)

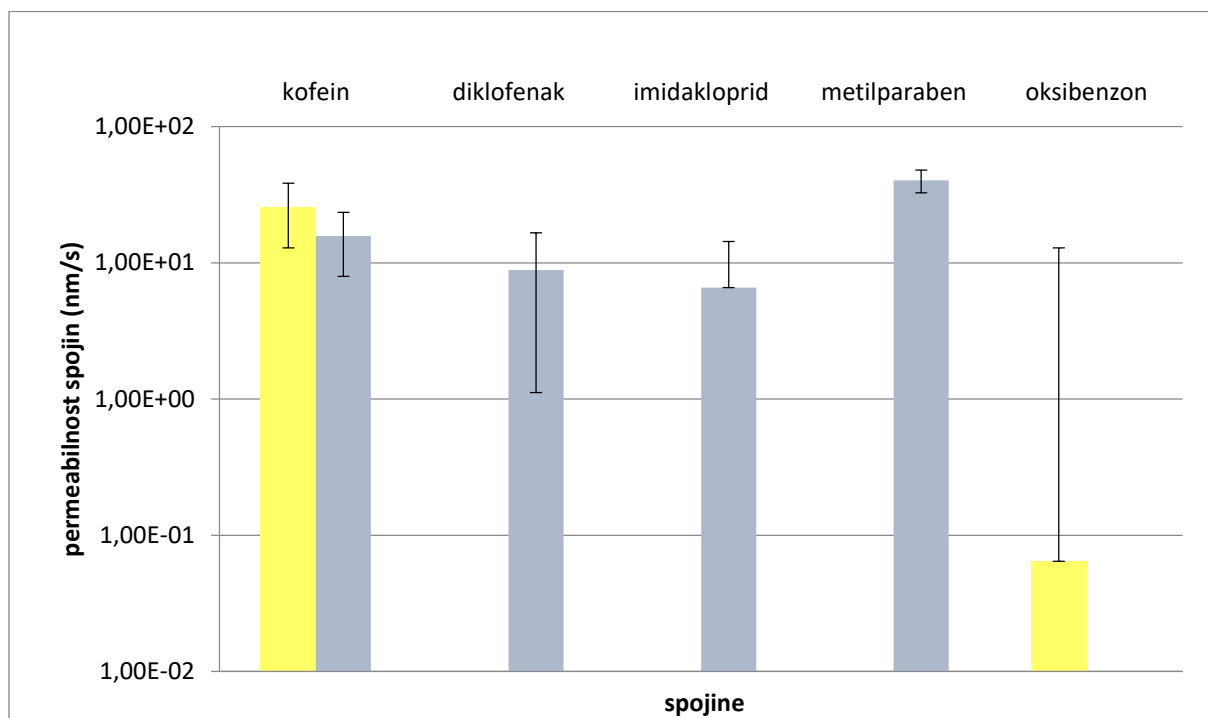
	Spojine	
	kofein	oksibenzon
Povprečna vrednost [nm/s]	25,64	0,06
Standardna deviacija [nm/s]	3,2	0,05

V preglednici VI so predstavljene povprečne permeabilnostne vrednosti in standardna deviacija spojin, raztopljenih v PBS, kjer smo kot akceptorski medij uporabili PBS z dodatkom Poloxamera 188.

Preglednica VI: Povprečna vrednost in standardna deviacija Papp (nm/s) spojin v drugem poskusu (spojine, raztopljene v PBS)

	Spojine			
	kofein	diklofenak	imidaklopid	MP
Povprečna vrednost [nm/s]	15,67	8,84	6,58	40,29
Standardna deviacija [nm/s]	1,72	4,67	1,02	24,18

Na sliki 17 je predstavljen stolpčni diagram povprečnih vrednosti Papp spojin iz obeh donorskih raztopin.



Slika 17: Stolpčni diagram povprečnih vrednosti Papp (nm/s) s SD spojin v drugem poskusu, stolpci v rumeni barvi predstavljajo spojine, raztopljene v miglyolu 812, stolpci modre barve pa spojine, raztopljene v PBS (rezultati so predstavljeni v logaritemski skali)

V preglednici VII smo primerjali rezultate prvega in drugega dela poskusa (akceptorski medij s in brez Poloxamera 188). Primerjali smo povprečne vrednosti Papp (AS), standardno deviacijo (SD) in relativno standardno deviacijo (RSD). Rezultate smo nato še statistično ovrednotili, in sicer najprej s F-testom za primerjavo varianc ter nato še s Studentovim t-testom za primerjavo srednjih vrednosti (predpostavili smo normalno porazdelitev).

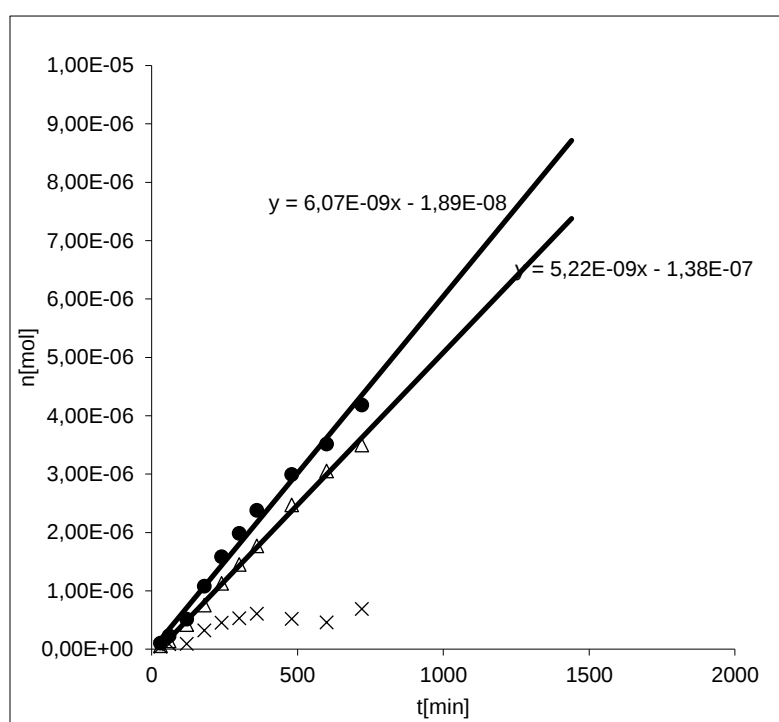
Preglednica VII: Vpliv poloksamera na permeabilnost spojin

Kofein iz myg					
	AS [nm/s]	SD [nm/s]	RSD	p(F-test)	P(t-test)
1.p	15,34	3,67	24	0,988614	0,004541
2.p	25,65	3,25	13		
Kofein iz PBS					
1.p	7,52	1,58	21	0,757951	0,000192
2.p	15,68	1,72	11		
Diklofenak					
1.p	2,86	1,91	67	0,095939	0,025007
2.p	8,84	4,67	53		
Imidaklopid					
1.p	2,04	1,77	87	0,533992	0,005073
2.p	6,58	1,02	16		
Metilparaben iz PBS					
1.p	8,60	7,16	83	0,110963	0,146129
2.p	15,68	1,72	11		
Propilparaben					
1.p	0,76	1,85	245		
2.p	/-neg. vrednost	0,05	/-neg. vrednost		
Oksibenzon					
1.p	0,095	0,01	13		
2.p	/-premalo za kvantifikacijo				

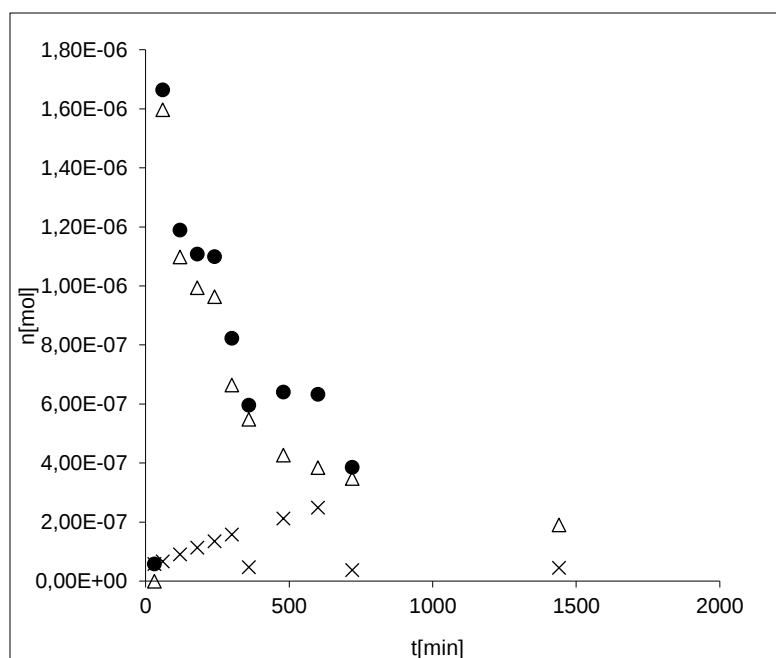
4.4 METABOLIZEM MP IN PP

Že v okviru prvega poskusa smo v kromatogramih opazili dodatni vrh, ki ni ustrezal nobeni od preiskovanih spojin, valovna dolžina absorpcijskega maksimuma neznane spojine pa je ustrezala valovni dolžini *para*-hidroksibenzojske kisline, ki je metabolit parabenov. Prišli smo do sklepa, da je očitno tekom poskusa prišlo do pretvorbe (hidrolize) MP in PP, zato samo omejen del teh spojin preide bariero v nespremenjeni obliki, drugi del pa kot *p*-HBk. Ker smo skušali ugotoviti, kolikšen del posamezne spojine, metabolizirane in nemetabolizirane, preide bariero, smo drugi poskus načrtovali tako, da smo MP raztopili samo v hidrofilni donorski

raztopini, PP pa v lipofilni donorski raztopini. Izmerili in izračunali smo množino in permeabilnostni koeficient nemetabolizirane spojine ter nato še množino in permeabilnostni koeficient *p*-HBk. Nato smo množini obeh oblik sešteli, da bi dobili celokupno permeabilnost spojine, upoštevaje tudi tisto, ki je med difuzijo zapadla še metabolizmu. Rezulate smo predstavili v obliki grafa (slika 18,19), vendar rezultati niso bili linearni v primeru vseh ponovitev. Predvidevamo, da je med poskusom poleg metabolizma prišlo še do drugih interakcij s tkivom, ki so vplivale na končno koncentracijo spojine. Kvantitativna ocena metabolizma parabenov v koži v Franzevi difuzijski celici torej ni bila možna.



Slika 18: Celokupna permeabilnost metilparabena, vzorec iz prve difuzijske celice v drugem poskusu (trikotnik – permeabilnost metilparabena, križ – permeabilnost *p*-HBk, krog – celokupna permeabilnost)



Slika 19: Celokupna permeabilnost propilparabena, vzorec iz druge difuzijske celice v drugem poskusu (trikotnik – permeabilnost propilparabena, križ – permeabilnost p-HBk, krog – celokupna permeabilnost)

4.5 RAZPRAVA

Na slikah od 4 do 9 je predstavljena permeabilnost izbranih spojin v odvisnosti od časa skozi kožno bariero v Franzevih difuzijskih celic (natančneje, rezultati so podani kot povprečje množin posamezne spojine v vzorcih iz akceptorskega medija v odvisnosti od časa). Ob primerjanju Papp posameznih spojin smo za kofein določili največjo permeabilnost (povprečna vrednost Papp v Miglyolu 812 = 15,34 nm/s, povprečna vrednost Papp v PBS pa = 7,52 nm/s), prav tako sta dobro permeabilni spojini tudi diklofenak (povprečna vrednost Papp = 2,86 nm/s) in imidaklopid (povprečna vrednost Papp = 2,04 nm/s).

Upošteva te podatke se postavlja vprašanje o primernosti uporabe kofeina kot kozmetično aktivne spojine v kozmetičnih izdelkih, saj po Uredbi 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta o kozmetičnih izdelkih kozmetično aktivne spojine lahko delujejo le na zunanje dele človeškega telesa (povrhnjico, lasišče, nohte, ustnice in zunanje spolne organe), zobe in na sluznico ustne votline [22]. Torej bi te izdelke morali uvrščati med zdravila, vendar v Zakonu o zdravilih – ZZdr2 velja, da je zdravilo vsaka snov ali kombinacija snovi, ki so predstavljene z lastnostmi za zdravljenje ali preprečevanje bolezni pri ljudeh ali živalih [23], zato je njihova umestitev med te prav tako sporna.

Za oksibenzon lahko na podlagi rezultatov (slika 9) zaključimo, da je zelo slabo permeabilna spojina, povprečna vrednost Papp znaša komaj 0,09 nm/s. Metilparaben smo prav tako kot kofein raztopili tako v PBS kot tudi v Miglyolu 812, vendar smo dobili zelo različne rezultate (slika 8). MP, raztopljen v PBS, dobro prehaja bariero, povprečna vrednost Papp pa je 8,60 nm/s. Pri isti spojini, raztopljeni v Miglyolu 812, so bile permeabilnostne vrednosti zanemarljivo nizke, povprečna vrednost Papp je bila 0,004 nm/s. Iz tega sklepamo, da je spojina, raztopljena v PBS, veliko bolj permeabilna. Pri propilparabenu smo prav tako praviloma dobili zanemarljivo nizke koncentracije v akceptorskem mediju (slika 9). Ker pa smo po opravljenem poskusu ugotovili, da se nam v vzorcih pojavi tudi vrh *p*-HBk, smo sklepali, da pride do metabolizma MP in PP v koži, saj je *p*-HBk znan metabolit parabenov. To bi vsekakor lahko razložilo deloma neuspešne meritve permeabilnosti parabenov. Drugi poskus smo zato načrtovali tako, da smo MP raztopili samo v PBS, PP pa v Miglyolu 812. Tako smo želeli priti do posameznih vrednosti MP, PP, MP + *p*-HBk in PP + *p*-HBk v akceptorskem mediju. Vendar pa dobljeni rezultati žal še vedno ne omogočajo dobre kvantitativne ocene permeabilnosti parabenov. Pri MP je v grafu (slika 19) še opazna določena linearnost, vendar je to predvsem posledica visokih vrednosti nemetabolizirane

oblike, medtem ko so vrednosti pri PP (slika 20) popolnoma »neurejene«. Se pravi, da med poskusom ni prišlo zgolj do metabolizma v *p*-HBk, ampak so morali na končni rezultat vplivati še drugi dejavniki.

V drugem delu poskusa (slike od 11 do 16) smo želeli prikazati permeabilnost spojin po dodatku Poloxamera 188. Za ta poskus smo zmanjšali število difuzijskih celic, saj je bila ponovljivost v prvem poskusu ustrezna in smo lahko prešli na minimalno število paralelk. Rezultate iz drugega poskusa smo nato primerjali z rezultati iz prvega (preglednica VII). Če primerjamo povprečja navideznih permeabilnostnih koeficientov posameznih spojin, dodatek Poloxamer 188 vpliva le na permeabilnost kofeina, raztopljenega v PBS, in MP, raztopljenega v PBS (v Miglyolu 812 MP v drugem delu nismo raztopili). V obeh primerih se rezultati razlikujejo za en velikostni razred, permeabilnost se je po dodatku Poloxamera 188 v akceptorsko raztopino povečala (KOFEIN: iz povprečne $P_{app} = 7,52 \text{ nm/s}$ se poveča na povprečno $P_{app} = 15,6 \text{ nm/s}$, MP: iz povprečne $P_{app} = 8,60 \text{ nm/s}$ pa na povprečno $P_{app} = 40,29 \text{ nm/s}$). Permeabilnost pa se sicer poveča tudi pri ostalih spojinah (v primeru oksibenzona celo zmanjša), vendar so te razlike zanemarljivo majhne. Rezultati v primeru PP niso zanesljivi, saj koncentracija spojine v akceptorskem mediju zelo niha. Rezultate smo tudi statistično obdelali. Ker imamo opravka z majhnim številom reprezentativnih vzorcev, smo predpostavili normalno porazdeljevanje in uporabili Studentov t-test za primerjavo srednjih vrednosti ter predhodno še F-test za primerjavo varianc. Za parameter smo vzeli 5-% tveganje, torej je moralo veljati $p < 0,05$, da so bili rezultati statistično značilni. Razlike v permeabilnosti spojin, ko se je razlikoval akceptorski medij, so bile statistično značilne za kofein, raztopljen v Miglyolu ($p = 0,0045$), kofein, raztopljen v PBS ($p = 0,0002$), ter diklofenak ($p = 0,0250$). Za imidakloprid ($p = 0,5340$) in MP ($p = 0,1461$) pa razlike v permeabilnosti (glede na prisotnost solubilizatorja v akceptorskem mediju) niso statistično značilne. V primeru oksibenzona rezultatov nismo mogli statistično obdelati (koncentracije spojine so bile prenizke za kvantifikacijo), kar pa pravzaprav pomeni, da je oksibenzon lahko dober označevalec, ki skozi nepoškodovano kožo v tovrstnih poskusih ne sme prehajati v merljivih količinah.

V okviru naloge smo dokazali, da se lahko z ustrezno analizno metodo pomeri permeabilnost več različnim spojinam istočasno. Vendar pa moramo pri kombiniranju spojin vseeno upoštevati določene lastnosti spojin (kot v našem primeru hidrofilnost oz. lipofilnost). Tako smo uporabili dve različni kombinaciji spojin v dveh različnih medijih (ena so bile lipofilne

spojine, raztopljene v Miglyolu 812, druga pa hidrofilne spojine, raztopljene v PBS), za katere pa smo lahko uporabili podobno analizno metodo.

Dobljene permeabilnostne vrednosti so bile v skladu s pričakovanji upoštevaje literaturne podatke oz. predhodne diplomske naloge [23]. Nekoliko je odstopala zgolj visoka permeabilnost imidakloprida, saj naj bi se le-ta uporabljal v dermalnih farmacevtskih oblikah kot učinkovina, ki deluje na koži, ter naj ne bi prehajal v kožo.

5. SKLEP

Pri združevanju spojin, ki jim želimo sočasno določiti permeabilnost, moramo upoštevati določene lastnosti. Predvsem je pomembno, v kakšnih topilih so spojine topne. V okviru naloge smo spojine, izbrane po pregledu literature, ločili na dve skupini: na lipidotopne in vodotopne. Lipidotopne spojine: kofein, parabene in oksibenzon smo raztopili v olju Miglyol 812. Vodotopne spojine: kofein, metilparaben, diklofenak in imidakloprid pa v izotoničnem fosfatnem pufru PBS. Kofein in metiparaben sta bila topna v obeh izbranih topilih, zato smo lahko primerjali tudi vpliv donorskega medija na prehod spojin v kožo.

Eden od glavnih ciljev je bil razvoj analizne metode za sočasno kvantifikacijo izbranih spojin s HPLC. Razvili smo dve podobni metodi za vsako skupino posebej. Metodi sta dokaj hitri in enostavni, torej primerni za veliko število vzorcev, predvsem pa je možna sočasna določitev vseh preiskovanih spojin in dodatno še glavnega metabolita parabenov (*p*-HBk) v akceptorskih raztopinah.

Zadovoljivost in ponovljivost rezultatov smo najprej dokazali z uporabo večjega števila Franzevih celic pri enakih eksperimentalnih pogojih. Uporabo sočasnega določanja permeabilnosti znani skupini spojin smo demonstrirali na modifikaciji poskusa s Franzevim celicami. Natančneje, z dodatkom Poloksamera 188, ki ima vlogo solubilizatorja, smo modificirali akceptorski medij tako, da smo izboljšali *sink* pogoje za slabo topne spojine ter opazovali, kakšen bo vpliv modifikacije na permeabilnost znanih spojin. Po izvedenem eksperimentalnem delu smo prišli do zaključka, da na permeabilnost in na kvantifikacijo s HPLC dodatek Poloksamera 188 v akceptorski medij bistveno ne vpliva, kar je odlično z vidika primerljivosti rezultatov, pridobljenih v akceptorskem mediju, prirejenem za določanje permeabilnosti nizko topnih spojin. Po drugi strani pa rezultati kažejo, da na permeabilnost bistveno vpliva donorska raztopina oz. točneje topilo, v katerem so spojine raztopljene.

6. LITERATURA

1. Gosenca M, Gašperlin M: *Membrane za in vitro testiranje dermalne absorpcije*. Farm Vestn 2009; 60: 8–13
2. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/caffeine>, dne 28. 9. 2016
3. Herman A, Herman A P: *Caffeine's Mechanisms of Action and Its Cosmetic use*. Skin Pharmacol Physiol 2013; 26(1): 8–14
4. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/diclofenac>, dne 11. 10. 2016
5. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Imidacloprid#section=Canonical-SMILES>, dne 12. 10. 2016
6. Hussein S E, Muret P, Berard M, Makki S, Humbert P: *Assesment of principal parabens used in cosmetics after their passage trough human epidermis-dermis layers (ex-vivo study)*. Exp Dermatol 2007; 16 (10): 830–836
7. Uredba (es) št. 1223/2009 evropskega parlamenta in sveta o kozmetičnih izdelkih. 2009, Uradni list Evropske unije, 2009, L 342/ 194
8. <http://www.fda.gov/Cosmetics/ProductsIngredients/Ingredients/ucm128042.htm>, dne 13. 10. 2016
9. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Homosalate#section=Clinical-Trials>, dne 15. 3. 2017
10. Urek S Y, Bilgin M, Ufuk Halli B: *Toxicological Profile of Homosalate as Cosmetic Ingredients*. Glob. j. pathol. microbiol. 2013; 1: 7-11
11. http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_097.pdf, dne 13. 10. 2016
12. Tae Hwan Kim, Beom Soo Shin, Kyu-Bong Kim, Seung Woo Shin, Su Hyun Seok, Min Kyu Kim,un Jung Kim, Dojung Kim, Min Gi Kim, Eun-Seok Park, Ju-Young Kim, Sun Dong Yoo: *Percutaneous Absorbtion, Disposition, and Exposure Assessment of Homosalate, a UV Filtering Agent, in Rats*. J Toxicol Env Heal A (2014); 77(4): 202–213
13. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/gentamicin#section=Top>, dne 13. 10. 2016
14. http://www.msd.si/asset/pdf/Prescription/Diprogenta_mazilo_SPC.pdf, dne 12. 1. 2017

15. <http://www.webmd.com/drugs/2/drug-1496/gentamicin-injection/details>, dne 13. 10. 2016
16. Scholar E M, Pratt W B: *The Antimicrobial Drugs Second Edition*, Oxford University Press, New York, 2000; 149–150
17. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/oxybenzone#section=Analytic-Laboratory-Methods>, dne 4. 1. 2017
18. http://www.dermalinstitute.com/us/library/66_article_Shedding_Light_on_Sun_Safety_Part_Two.html, dne 4. 1. 2017
19. Kielhorn D J, Melching-Kollmuß S, Mangelsdorf I. *Environmental Health Criteria* 235- *Dermal absorption*, World health organization (WHO), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2016;38–66
20. Beek R, Gutters S, Pohlman A: *Nanocosmetics and nanomedicines (new approaches for skin care)*, Springer, Nemčija 2011; 4–11
21. Markovic B D , Vladimirov S M , Cudina O A, Odovic J V in Karljickovic-Rajic K D: *A PAMPA Assay as Fast Predictive Model of Passive Human Skin Permeability of New Synthesized Corticosteroid C-21 Esters*. *Molecules* 2012; 17: 480–491
22. <http://www.pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=URED6502>, dne 17. 4. 2016
23. <http://www.pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=ZAKO6295>, dne 17. 4. 2016
24. Gačnik A: *Diplomsko delo - Odvisnost permeabilnostnih lastnosti kože prašiča v Franzovih celicah od časa shranjevanja kože*, Ljubljana, 2016