

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KARIN VERONIKA TRILER

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KARIN VERONIKA TRILER

**VPLIV PRIPRAVE KOŽE NA PERMEABILNOSTNE LASTNOSTI V
FRANZOVIH DIFUZIJSKIH CELICAH**

**EFFECTS OF SKIN PREPARATION ON PERMEABILITY PROPERTIES IN
FRANZ DIFFUSION CELLS**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2017

Diplomsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Simona Žaklja.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju za neprestano dostopnost, potrpežljivost, usmeritve in pomoč. Zahvala gre tudi strokovni sodelavki dipl. ing. Kem. Nevenki Lilik za vse uporabne nasvete pri laboratorijskem delu in pomoč pri iskanju kemikalij. Zahvaljujem se tudi mami in očetu, ki me ves čas študija podpirata in verjameta vame.

V teoriji se teorija in praksa ne razlikujeta, v praksi pa se.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo, kot zaključno delo univerzitetnega programa kozmetologija, samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Simona Žaklja.

Lastnoročni podpis:

Ljubljana, september 2017

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Aleš Obreza

Mentor: izr. prof. dr. Simon Žakelj

Član diplomske komisije: doc. dr. Ilija Ilić

VSEBINA:

POVZETEK	III
SEZNAM OKRAJŠAV.....	IV
1. UVOD	1
1.1. Koža.....	1
1.2. Prehod snovi in absorpcija.....	1
1.3. Franzova difuzijska celica	2
1.4. Vrste membran	3
1.5. Zamrzovanje in shranjevanje kože	4
1.6. Modelne spojine	4
1.7. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti.....	7
2. NAMEN DELA.....	8
3. MATERIALI IN METODE	9
3.1. Materiali.....	9
Modelne spojine	9
Raztopine in kemikalije.....	9
3.2. Priprava raztopin.....	10
MOBILNA FAZA.....	10
PREVERJANJE TOPNOSTI.....	10
FOSFATNI PUFER	11
DONORSKA RAZTOPINA	12
3.3. Razvoj analizne metode.....	12
3.4. Umeritvena krivulja.....	13
3.5. Potek poskusa	13
PRIPRAVA IN ZAMRZOVANJE TKIVA.....	13
FRANZOVE CELICE.....	14
PREDINKUBACIJA.....	14
IZVEDBA POSKUSA	14
PERMEABILNOST.....	15

OBDELAVA REZULTATOV	18
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	18
4.1. HPLC metoda	18
4.2. Umeritvena krivulja	19
4.3. Permeabilnost spojin.....	19
Kofein.....	20
Minoksidil	21
Imidaklopid	22
Metilparaben.....	23
PHBA	24
Diklofenak.....	25
Primerjava P_{app}	26
Smiselnost vzorčenja pri 24-urnem poskusu.....	27
5. SKLEP.....	30
6. LITERATURA.....	31
7. PRILOGE.....	34
7.1. Podatki o Franzovih celicah	34
7.2. Postopek redčenja vzorcev za izdelavo umeritvene premice	34
7.3. Podatki za izračun permeabilnostnih koeficientov za kofein	34
7.4. Podatki za izračun permeabilnostnih koeficientov za minoksidil	35
7.5. Podatki za izračun permeabilnostnih koeficientov za imidaklopid.....	35
7.6. Podatki za izračun permeabilnostnih koeficientov za metilparaben	35
7.7. Podatki za izračun permeabilnostnih koeficientov za diklofenak	35

POVZETEK

Da lahko koža opravlja svojo nalogo, mora imeti dobro barierno funkcijo, ki mora biti za testiranje dermalne absorpcije po odmrznitvi karseda ohranjena. Med procesom zamrzovanja pride do nepopravljive reorganizacije lipidov in tvorbe različno velikih vodnih kristalov. Smernice za izvajanje testiranj dermalne absorpcije s Franzovimi difuzijskimi celicami se dilemi zamrzovanja tkiva izognejo tako, da ne opredelijo točnih zahtev v povezavi z zamrzovanjem in shranjevanjem tkiva, ampak namesto tega zahtevajo dokaz ohranjenosti kožne bariere. Za preverbo ohranjenosti kožne integritete se lahko uporabi modelne spojine.

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, ali in v kolikšni meri predpriprava (ločitev kože od hrustanca pred zamrzovanjem) in način zamrzovanja kože s prašičjega uhlja vplivata na njeno integriteto in posledično tudi na permeabilnostne koeficiente modelnih spojin v Franzovih difuzijskih celicah. Predvidevali smo, da zamrzovanje s tekočim dušikom povzroči nastanek manjših vodnih kristalov in s tem manjše poškodbe kože zaradi shranjevanja. S kožo, z uhlja zamrznjenega pri -20°C , smo primerjali različne načine zamrzovanja in predpriprave, in sicer 1) kožo z uhlja zamrznjenega s tekočim dušikom, 2) predhodno preparirano kožo, zamrznjeno pri -20°C in 3) predhodno preparirano kožo, zamrznjeno s tekočim dušikom. Za modelne spojine smo uporabili diklofenak, imidaklopid, kofein, metilparaben in minoksidil, za katere smo pričakovali različne permeabilnostne lastnosti. Z namenom zmanjšanja števila poskusov s Franzovimi celicami, smo v donorsko raztopino hkrati vključili vse preiskovane spojine. Preverili smo topnost modelnih spojin, razvili HPLC metodo in pridobili enačbe umeritvenih premic. Vzorčili smo v trinajstih časovnih točkah v okviru 24 urnega poskusa.

V okviru diplomskega dela smo ugotovili, da primerjava s kožo, zamrznjene pri -20°C in kože, zamrznjene s tekočim dušikom ni pokazala statistično značilnih razlik. Pri obeh predhodno prepariranih kožah pa smo zaznali statistično značilne razlike v permeabilnostnih koeficientih, ki so večji v primerjavi s kožo z uhlja zamrznjenega pri -20°C . Ugotovili smo tudi, da ni statistično značilnih razlik, če bi poskus z izbranimi modelnimi spojinami namesto 24 ur izvajali le 11 ur. S tem bi zagotovili boljši nadzor nad sistemom difuzijskih celic. Uporaba metilparabena kot modelne spojine je neprimerna, saj se večina te spojine v koži metabolizira, kar vodi do neponovljivih rezultatov.

Ključne besede: prašičja koža, zamrzovanje, Franzova difuzijska celica, HPLC, permeabilnost

SEZNAM OKRAJŠAV

ACN	acetonitril
ECVAM	Evropski center za validacijo alternativnih metod
EDETOX	Ocene in predvidevanja dermalne absorpcije toksičnih spojin
FC	Franzova difuzijska celica
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
J_{ss}	fluks linearne faze; <i>angl. steady state flux</i>
K_d	konstanta difuzije
P_{app}	navidezni permeabilnostni koeficient; <i>angl. apparent permeability coefficient</i>
OECD	Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj
PBS	fosfatni pufer
PHBA	p-hidroksibenzojska kislina
SC	rožena plast; <i>angl. stratum corneum</i>
SCCP	Znanstveni komite za potrošniške proizvode
TEWL	transepidermalna izguba vode
U.S. EPA	Ameriška agencija za varstvo okolja
WHO/IPCS	Svetovna zdravstvena organizacija - mednarodni program za kemijsko varnost

1. UVOD

1.1. Koža

Koža je naš največji in najtežji organ, ki nam dobro služi pri zaznavanju okolja, izmenjavi snovi in zaščiti. Opišemo jo lahko tudi kot anizotropen in nelinearen viskoelastičen material iz različnih vrst celic in izvenceličnih spojin. Je heterogen material; na površini lipofilen, z večanjem globine plasti pa hidrofilen. Koži lahko določimo 3 medseboj strukturno zelo različne plasti: povrhnjica, usnjica in podkožje. Nekatere najpomembnejše naloge opravlja povrhnjica, ki preprečuje izgubo vode, uravnava telesno temperaturo in nudi UV zaščito. Rožena plast predstavlja mrtvi del povrhnjice in ima sebi specifično zgradbo. Različnim molekulam in mikroorganizmom predstavlja močno, vendar selektivno prepreko, skozi katero imajo omejeno prehajanje v notranjost telesa. Sestavljajo jo mrtvi, s keratinom napolnjeni diferencirani keratinociti brez jedra (korneociti), obdani z lamelarno urejenimi intercelularnimi lipidi (holesterol, proste maščobne kisline in ceramidi). Lipidi predstavljajo protimikrobno, antioksidativno in predvsem permeabilnostno oviro. *In vivo* je struktura lipidov v ravnotežju med trdnim kristalnim (ortorombska ureditev) in gelskim ali tekoče kristalnim (heksagonalna ureditev) stanjem (1). Organizacijo rožene plasti lahko poenostavljeno opišemo s primerom opeke in malte, kjer so opeke korneociti zasidrani v malti lipidov.

1.2. Prehod snovi in absorpcija

Ozko gledano je glavna naloga kože razmejiti notranje in zunanje okolje, vendar je koža veliko več kot neprepustna plast na površini telesa. Izmenjava snovi skozi kožo poteka ves čas, čeprav mnogokrat nezavedno. *In vivo* študije veljajo za zlati standard testiranja, vendar je zaradi etičnih in praktičnih razlogov potrebno te študije tako na ljudeh, kot tudi na živalih, nadomestiti.

Barierna funkcija kože je predvsem odvisna od najvišje plasti epidermisa, rožene plasti (SC). Za pravilno vzpostavljeno bariero je pomembna ustrezna hidratacija kože, integriteta SC, hidro-lipofilen zaščitni plašč ter ustrezna urejenost in sestava intercelularnega lipidnega matriksa (1). Na permeabilnost snovi vplivajo fizikalno-kemijske lastnosti spojine (pKa, zmerna lipofilnost in majhna molekulska masa), vehikel in fiziološke spremenljivke kože (npr. poškodbe, kožne bolezni, anatomsko mesto in prekrvavljenost) (2). Vpliv na količino spojine, ki se absorbira *in vivo*, imajo tudi površina kože in čas izpostavitve testni snovi ter koncentracija. Barierno funkcijo kože se določa posredno z merjenjem dermalne absorpcije (*in vitro* ali *in vivo*), hidratacije, transepidermalno izgubo vode (TEWL), pH, luščenja kože in analize sebuma (3).

Najpomembnejši mehanizem prehoda snovi skozi kožo je pasivna difuzija, zato lahko za *in vitro* teste uporabimo tudi mrtvo kožo. Snovi lahko v telo vstopajo po transcelularni, intercelularni ali transfolikularni poti. Prehod snovi obsega tri procese: penetracija, permeacija in absorpcija. O penetraciji govorimo, ko učinkovina vstopa v posamezne plasti kože (npr. v roženo plast), permeacija opisuje prehod učinkovine med plastmi, ki so strukturno in funkcionalno različne, medtem ko se absorpcija nanaša na privzem učinkovine v krvožilni ali limfni sistem (4). Če se razmere s časom ne spreminjajo, opisuje permeabilnost difuzijski ali 1. Fickov zakon (5).

Smernice za določitev dermalne absorpcije podajajo različna združenja kot so OECD, WHO/IPCS in U.S. EPA, vendar pogoji in načini zamrzovanja niso natančno opredeljeni. Izmed vseh je največkrat citirana in uporabljena OECD smernica 428 (2004). Smernica ne opiše idealne *in vitro* metode, ampak nam prikaže vse možnosti in izbire izvedbe *in vitro* poskusa. Dilemi se izogne tako, da ne opiše točnih zahtev v povezavi z zamrzovanjem in shranjevanjem, ampak namesto tega zahteva dokaz ohranjenosti kožne barierne funkcije (6).

1.3. Franzova difuzijska celica

Franzove difuzijske celice se uporabljajo za *in vitro* študije kožne permeabilnosti, najpogosteje v fazi razvoja formulacij. Vertikalna celica je narejena iz stekla in je sestavljena iz donorskega dela (zgoraj), membrane (koža) in akceptorskega dela (spodaj). V donorski del nanese vzorec, ki je preiskovana spojina, raztopljena v fiziološkem pufru ali vgrajena v formulacijo. Akceptorski medij je največkrat fiziološki pufer (pH = 7,4) v katerem mora biti preiskovana spojina dobro topna. Da ne pride do prehitrega nasičenja akceptorske puferske raztopine in da imajo tudi zelo lipofilne spojine možnost prehajanja iz kože v akceptorski medij v t.i. *sink* pogojih, so mediju lahko dodana različna sotpila, površinsko aktivne snovi. Ti dodatki ne smejo vplivati na kožno integriteto (1, 3). *Sink* pogoji praviloma pomenijo, da koncentracija v akceptorskem mediju ne sme preseči 10 % nasičene topnosti. Pod takimi pogoji snov, ki je že prešla v akceptorski medij, zanemarljivo vpliva na prehajanje preostale količine spojine iz donorske raztopine (7). Pred začetkom izvajanja poskusa je poleg vizualne ocene tkiva, potrebna preverba ohranjenost kožne integritete z merjenjem TEWL, transepidermalne električne upornosti ali permeabilnostnega koeficienta modelne spojine (npr. kofein), pred ali po izvedenem poskusu (OECD 2004a) (8, 9). Celica z vpeto membrano je potopljena v vodno kopel, katere gladina sega pod zgornji rob akceptorskega dela. Kopel je lahko ogreta na 32 °C, kar ustreza temperaturi na površini kože ali pa z vodno kopeljo s 37 °C v koži vzpostavimo

temperaturni gradient. Poskus traja 24 ur med katerimi večkrat odvzamemo majhen volumen akceptorskega medija, ki ga nadomestimo s svežim medijem. Po poskusu lahko za boljšo zanesljivost ponovno preverimo integriteto kože, vendar je to smiselno storiti le pri kratkotrajnih testih, saj prekomerna hidratacija kože zmanjša njeno barierno sposobnost (9). Poleg sledenja različnim smernicam na ponovljivost rezultatov vpliva tudi izvedba poskusa glede na izvor kože, dolžino shranjevanja tkiva, sestavo medija, tehnike dela, metode dela, debeline kože, itd.

1.4. Vrste membran

Za določanje dermalne absorpcije nujno potrebujemo ustrezno membrano, ki v zadostni meri oponaša kožno bariero. Membrane, ki se uporabljajo, so lahko umetne (filtrske, polimerne) ali naravne (živalska ali človeška koža in rekonstruirani kožni modeli). Za vrednotenje dermalne absorpcije je najbolj primerna uporaba človeške kože, ki jo odstranijo pri plastičnih operacijah in amputacijah ali kadaverska koža (1). Alternativo človeški koži predstavljajo humani tkivni modeli, vendar je njihova uporaba omejena zaradi debelejši rožene plasti (odsotnost luščenja), odsotnosti dlak, žil, limfnih vodov, kožnih izvodil ter Langerhansovih celic, rahlo spremenjene sestave ceramidov in slabše barierne funkcije (10). Na trgu so dostopni modeli iz človeških keratinocitov in fibroblastov, kot na primer EpiSkin™, SkinEthic™, StrataTest®, T-Skin™ in EpiDerm™, ki so že ustrezne velikosti za uporabo v različnih difuzijskih celicah (0,38 cm² ali 1,07 cm²) (11). Velika prednost uporabe kožnih modelov je ponovljivost in lahka dostopnost.

V *in vitro* študijah dermalne absorpcije se najpogosteje uporablja živalsko kožo. Uporablja se kožo miši, podgan, zajcev, opic in prašičev, vendar ima vsak živalski model svoje prednosti in slabosti. Ugotovili so, da sta s človeško kožo najbolj primerljivi prašičja in opičja koža, uporaba slednje pa je prepovedana. Za *in vitro* testiranja s Franzovimi celicami se najpogosteje uporablja kožo prašičjih uhljev ali rilca saj so kože drugih živali dosti bolj permeabilne. Prašičja koža je v sestavi lipidov in encimov, pogostosti dlak, imunoreaktivnosti, epidermopoeze, debeline rožene plasti in dermisa ter strukture kožnih izvodil zelo podobna človeški. Od človeške se razlikuje predvsem z dvakrat debelejšimi dlakami in večinoma apokrinimi žlezami znojnicami. Podobni sta tudi struktura in debelina kolagenskih vlaken in žilnega spleta v dermisu ter vsebnost glikosfingolipidov in ceramidov v roženi plasti (1, 3). V študiji, ki sta jo Barbero in Frasch objavila leta 2009, je izpostavljeno dejstvo, da je znotrajvrstni koeficient variacije pri prašičih (21 %) manjši kot pri ljudeh (35 %), kar pomeni, da je za doseganje zadostne statistične moči potrebno manjše število poskusov (12).

1.5. Zamrzovanje in shranjevanje kože

Čeprav so *in vitro* poskusi s Franzovimi celicami že dodobra razviti, je shranjevanje kože pomemben, a zaenkrat še ne strogo predpisan postopek pri izvedbi poskusov. Zaradi omejene dostopnosti je potrebno biološka tkiva shraniti pri nizkih temperaturah, da omejimo razgrajevalne procese. Pri temperaturah pod -18°C se ustavi delovanje mikroorganizmov in večine encimov. Če izvajamo raziskave kožnega metabolizma, se lahko kožo 2 do 4 tedne ohrani viabilno pri 4°C . Z vsakim dnem je koža manj metabolno aktivna, vendar se fizične značilnosti, ki so odgovorne za bariero, ohranijo tudi dlje časa (13).

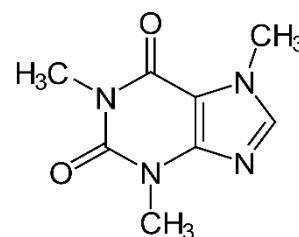
Zamrzovanje na koži povzroči fizikalne in tudi kemijske spremembe. Med procesom zamrzovanja pride do nepopravljive reorganizacije lipidov in tvorbe različno velikih vodnih kristalov (14). Ti kristali po odtajanju kože za seboj pustijo mikropoškodbe, preko katerih spojine lažje in hitreje potujejo v akceptorski medij. Tkivo lahko zamrznemo na različne načine in tudi različno hitro. Idealna metoda zamrzovanja je enostavna, hitra, cenovno ugodna in s čim manj vpliva na mikrostrukturo kože. Tkivo se najpogosteje shrani v zamrzovalni skrinji, kjer je zaradi počasnega ohlajanja omogočeno tvorjenje pravilnih in velikih kristalov ledu. Da bi se temu izognili, lahko tkivo hitro ohladimo s potopitvijo v tekoči dušik (-195°C). Takšna zamrznitev povzroči nastanek večjega števila majhnih vodnih kristalov in manj poškodb kože. Shranjevanje kože pri zelo nizkih temperaturah (pod -80°C) povzroči večje strukturne spremembe v roženi plasti, kar se kaže v večji perkutani penetraciji. Pri shranjevanju pri -80°C so vidne razlike v razporeditvi keratinocitov, celice so v spodnjih plasteh kože nabrekle in rožena plast se bolj lušči. Pri shranjevanju na -20°C pa so spremembe omejene le na zgornje plasti epidermisa (13). Združenji ECVAM in WHO/IPCS navajata, da je koža shranjena pri -20°C do enega leta, sprejemljiva za uporabo, združenje SCCP pa priporoča shranjevanje pri nižjih temperaturah. Penetracija spojin se večja z dolžino shranjevanja zamrznjene kože in z nižanjem temperature shranjevanja (6).

1.6. Modelne spojine

Za preverbo ohranjenosti integritete kože, pred ali po končanem poskusu s Franzovimi celicami, lahko uporabimo različne načine. Eden izmed načinov je uporaba modelnih spojin z ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi. Združenje OECD za modelne spojine predlaga kofein, benzojsko kislino in testosteron (3). Za lažjo detekcijo in obravnavo podatkov je zaželeno, da se spojina v koži ne metabolizira.

Kofein

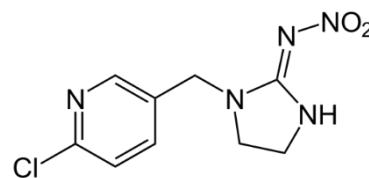
Glede na kemijsko zgradbo uvrščamo kofein med (trimetil)ksantinske alkaloidne (slika 1). Alkaloidi so velika skupina naravnih praviloma bazičnih sekundarnih metabolitov, z dušikom, vezanim v heterociklično strukturo. Večina alkaloidov je strupenih, saj tako ščitijo rastlino pred objedanjem. Kofein je antagonist adenozijskih receptorjev, periferni vazodilatator, antioksidant, zaviralec fosfodiesteraze (\uparrow cAMP) in spodbujevalec lipolize (15, 16). S strani OECD je priznana modelna spojina za preverjanje membranske integritete. V kozmetičnih izdelkih se uporablja za zmanjševanje obsega celulita, odpravljanje zabuhlosti podočnjakov, upočasnitev staranja kože in pospeševanje rasti las. Sistemski učinki kofeina so dobro poznani, vendar njegovi učinki na kožo pa še vedno niso v celoti pojasnjeni. Ima visoko biološko aktivnost, saj dobro prehaja v kožo. V prvih 20 minutah po nanosu šampona s kofeinom le ta večinoma prehaja transfolikularno, kar predstavlja pot hitre absorpcije, v daljšem časovnem obsegu pa je glavna pot prehoda skozi lipidni matriks (17).



Slika 1: Skeletna formula kofeina

Imidakloprid

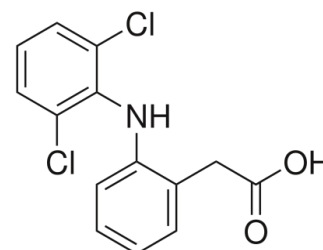
Imidakloprid (slika 2) je širokospektralen sistemski insekticid, ki na žuželke deluje nevrotoksično, hkrati pa je precej nestrupen za sesalce (18). Deluje agonistično na nikotinske acetilholinske receptorje v centralnem živčnem sistemu žuželk, na nas pa naj bi deloval podobno kot nikotin. Pri dolgotrajni izpostavitvi pri ljudeh ima slab vpliv na razvoj živčnega sistema, še posebej možganov (19). Od vstopa na trg leta 1992 je eden izmed najbolj uporabljenih insekticidov, predvsem v kmetijstvu in veterini.



Slika 2: Skeletna formula imidakloprida

Diklofenak

Je nesteroidna protivnetna zdravilna učinkovina, ki spada v skupino nesteroidnih antirevmatikov (NSAR) in deluje protivnetno, protibolečinsko in antipiretično (slika 3). Je neselektivni zaviralec encima ciklooksigenaza. V čisti obliki je v obliki praška brez vonja. Na našem trgu se pojavlja v zdravilih Voltaren, Olfen in Naklofen. Med najbolj znanimi neželenimi učinki so gastrointestinalne razjede, dvig krvnega tlaka in slab

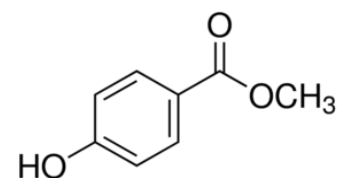


Slika 3: Skeletna formula diklofenaka

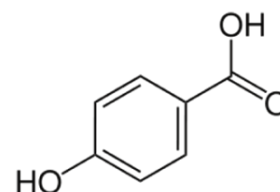
vpliv na srce ter na ledvice. Zaradi mnogih neželenih učinkov v prebavnem traktu je koža v primeru lokalnega delovanja alternativna pot prehoda. Dermalno se lahko nanese 1 % do 3 % glede na formulacijo (20).

Metilparaben in p-hidroksibenzojska kislina

Kemijsko je metilparaben (MP) ester hidroksibenzojske kisline (slika 4). V naravi se pojavljajo v nekaterih sadežih in zelenjavi, na primer v čaju in borovnicah. V čisti obliki je v obliki praška brez vonja in okusa. Parabeni so med najstarejšimi kozmetičnimi konzervansi in se uporabljajo že več kot 90 let. S toksikološkega vidika je MP splošno priznan za varnega (16, 21). Skozi kožo preide več metilparabena kot etilparabena ali propilparabena, zaradi krajše alkilne verige in posledične manjše lipofilnosti. Zaradi encimov (karboksilesteraze), ki ohranijo aktivnost tudi v predhodno zamrznjeni koži, se MP v koži hidrolizira v p-hidroksibenzojsko kislino (PHBA) (slika 5). Potrebno je upoštevati tudi dejstvo, da je presnova parabenov v nekaterih živalskih kožah obsežnejša kot v



Slika 4: Skeletna formula metilparabena

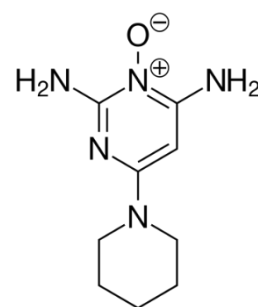


Slika 5: Skeletna formula PHBA

človeški (22). V kozmetičnih izdelkih so dovoljene koncentracije posameznega parabena do 0,4 % in mešanice parabenov do 0,8 %. PHBA se uporablja kot sredstvo za izboljšanje okusa, prepovedana pa je uporaba kot pesticid. Uporablja se tudi kot kemijski intermediat za izdelavo sintetičnih drog, zdravil, barvil in mehčal (23).

Minoksidil

Peroralno se ga uporablja kot zdravilo za zniževanje povišanega krvnega tlaka (periferni vazodilator), z ugodnim učinkom spodbujanja rasti las. Zaradi slednjega učinka se ga uporablja tudi lokalno na lasišču. Preko vpliva na od ATP odvisne kalijeve kanalčke povzroči hiperpolarizacijo celične membrane. Je predzdravilo, ki se s sulfotransferazami pretvori v aktivni metabolit minoksidil sulfat. Mehanizem spodbujanja rasti las še ni jasen, vendar predvidevajo, da je učinek povezan z njegovim vazodilatatornim delovanjem (24).



Slika 6: Skeletna formula minoksidila

1.7. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je kromatografska preparativna ali analizna metoda, ki temelji na ločevanju spojin zaradi različno dolgega zadrževanja na stacionarni fazi. Glede na mehanizem zadrževanja spojin ločimo: ionsko izmenjevalno, adsorpcijsko, gelsko izljučitveno, kiralno, afinitetno in porazdelitveno kromatografijo. Porazdelitvena kromatografija se deli na normalnofazno in reverznofazno, slednja pa je najpogosteje uporabljena, saj obsega približno 90 % vseh aplikacij HPLC. Na nepolaro stacionarno fazo iz alifatskih ali aromatskih substituentov vezanih na nosilec iz čistega SiO₂ se iz mobilne faze vežejo različne sestavine vzorca. Mobilna faza je sestavljena iz vode ali pufra in organskega modifikatorja (acetonitril, metanol, etanol). Čas zadrževanja je pri stalnih pogojih ločevanja popolnoma odvisen od fizikalno-kemijskih lastnosti preiskovane spojine. Snovi se med analizo različno dolgo zadržujejo na stacionarni fazi in se eluirajo ob zanje značilnih retencijskih časih, kar omogoča njihovo indentifikacijo. Eluirane spojine z mobilno fazo se po ločitvi zazna in določi z detektorjem. Eden izmed možnih detektorjev je UV-VIS detektor, ki je precej neobčutljiv na spremembe v sestavi mobilne faze med gradientno analizo (25).

2. NAMEN DELA

Pri poskusih s Franzovimi celicami v primerih, ko ne preučujemo metabolizma, ni potrebna uporaba sveže kože. Zaradi logističnih in praktičnih prednosti je uporaba zamrznjene kože primernejša. Različne smernice sicer podajo navodila za delo s Franzovimi difuzijskimi celicami, vendar ne obravnavajo pogojev shranjevanja kože.

Namen diplomske naloge je raziskati, ali in v kolikšni meri predpriprava in zamrzovanje kože s prašičjega uhlja vplivata na njeno integriteto in posledično tudi na permeabilnostne koeficiente modelnih spojin v Franzovih difuzijskih celicah. Primerjali bomo vpliv počasnega zamrzovanja pri -20°C in hitrega zamrzovanja s tekočim dušikom na kožno permeabilnost. Z namenom zmanjšanja prostora shranjevanja in zmanjšanja časa priprave kože po odtajanju, bomo preverili, ali obstajajo značilne razlike v permeabilnosti spojin pri koži, ločeni od hrustanca že pred zamrzovanjem (predpriprava). Za določitev permeabilnosti različno zamrznjenih kož bomo uporabili modelne spojine: kofein, minoksidil, imidaklopid, diklofenak in metilparaben. Ugotovili bomo, ali lahko poskus izvajamo manj kot 24 ur, saj preko noči nimamo nadzora nad celotnim sistemom.

Preveriti bomo morali topnost modelnih spojin pri različnih koncentracijah in na podlagi tega določiti donorske koncentracije spojin. Za zmanjšanje števila poskusov s Franzovimi celicami bomo v donorski raztopini sočasno uporabili vse modelne spojine. Razviti bo potrebno HPLC analizo metodo s katero bomo pridobili umeritvene premice, ki jih bomo uporabili za izračun fluksa linearne faze (J_{ss}) in navideznega permeabilnostnega koeficienta (P_{app}). Rezultate bomo nato statistično vrednotili.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

Modelne spojine	Proizvajalec
4-hidroksibenzojska kislina – PHBA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
diklofenak - diclofenac sodium salt	
imidakloprid - imidaclopride	
metilparaben – methyl 4-hydroxybenzoate	
kofein - caffeine anhydrous	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Švica
minoksidil – minoxidil	Farmalabor – Farmacisti associati, Italija

Raztopine in kemikalije	Proizvajalec
Fosfatni pufer	
HCl	Merck KGaA, Nemčija
NaOH	
NaCl	
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	
KH ₂ PO ₄	
0,1 % metanojska kislina – mobilna faza	
HCOOH	Merck KGaA, Nemčija
Organski modifikator	
Acetonitril (ACN)	Sigma-Aldrich, Nemčija

Naprave	Proizvajalec
Analizna tehtnica	Mettler Toledo-Delta range, Švica
Avtomatska pipeta	Eppendorf Research, Nemčija
Franzove celice	Šuluran medulin, Slovenija
HPLC	Agilent Technologies 1100 Series, Nemčija
HPLC kolona	XTerra MS, C18, 3,5 μm, 4,6 x 100 mm
Termostatirano mešalo	IKA RET Control/t, Keison International Ltd., VB
pH-meter	Mettler Toledo, Švica
Ultrazvočna kadička	Sonis 4, Iskra Pio d.o.o., Slovenija
Q-POD; Milli-Q	Merck KGaA, Nemčija

3.2.Priprava raztopin

MOBILNA FAZA

Za pripravo 0,1 % (v/v) raztopine metanojske kisline (pH = 2,7, pKa = 3,75) smo v 1 l ultra čiste vode primerne za HPLC analizo, dodali 1 mL metanojske kisline in dobro premešali.

PREVERJANJE TOPNOSTI

Za osnovo smo vzeli podatke o najboljši topnosti posameznih modelnih spojin v prečiščeni vodi, ki jih je v svoji diplomski nalogi z naslovom Sočasno določanje permeabilnosti različnih spojin skozi kožo prašičjega uhlja iz vodne in oljne donorske raztopine objavila Edita Rozina (26). Poleg izbranih štirih modelnih spojin (kofein, imidaklopid, metilparaben in diklofenak) iz prej omenjene diplomske naloge smo naboru spojin po pregledu literature dodali še spojino minoksidil.

Preverili smo, ali se pri določenih koncentracijah spojine v prečiščeni vodi raztopijo do bistrih raztopin. Raztopine, v katerih se je posamezna snov dobro raztopila, smo nato redčili do nekaj μM in jih pomerili s HPLC. S tem smo pridobili podatke o njihovih retencijskih časih, oblikah odzivov in njihovem morebitnem prekrivanju. Tako smo tudi dobili osnovo za spreminjanje parametrov pri razvoju HPLC metode. Temperatura v laboratoriju je bila približno 26°C. Podatke o molekulskih masah spojin smo pridobili iz podatkovne baze PubChem (27).

Kofein

Kofein ima molekulsko maso 194,194. Za pripravo 10 mM raztopine kofeina smo v 1,28 mL prečiščene vode raztopili 2,50 mg kofeina s pomočjo ultrazvočne kopeli. Nato smo osnovno raztopino trikrat redčili za faktor 10 do koncentracije 10 μM . Ker se je kofein pri koncentraciji 10 mM dolgo raztapljal in ker je bila njegova kvantifikacija v vzorcih iz poskusa ob predvideni dobri permeabilnosti zanesljiva, smo se odločili, da bomo uporabili nižjo, 5 mM donorsko raztopino kofeina.

Diklofenak

Njegova molekulska masa znaša 318,13. Pripravili smo 10 mM raztopino diklofenaka tako, da smo 2,96 mg raztopili v 1 mL prečiščene vode. Nato smo osnovno raztopino trikrat redčili za faktor 10 do koncentracije 10 μM .

Imidaklopid

Njegova molekulska masa znaša 255,66. Pripravili smo 2 mM osnovno raztopino tako, da smo 5,11 mg imidakloprida raztopili v 10 mL prečiščene vode. Osnovno raztopino standarda smo postopno redčili do raztopine s koncentracijo 10 μ M.

Metilparaben

Njegova molekulska masa znaša 152,15. Pripravili smo raztopino s koncentracijo 20 mM, vendar smo se zaradi počasnega raztapljanja odločili uporabiti pol manjšo koncentracijo. Pripravili smo 10 mM osnovno raztopino metilparabena tako, da smo 1,52 mg metilparabena raztopili v 1 mL prečiščene vode. Nato smo raztopino postopoma redčili do 10 μ M raztopine.

PHBA

Ima molekulska masa 138,12. Za izdelavo umeritvene krivulje moramo uporabiti enako koncentracijo, kot pri metilparabenu. Za pripravo 10 mM raztopine smo 6,9 mg PHBA raztopili v 5 mL prečiščene vode ter postavili v UZ kadičko. Nato smo raztopino postopoma redčili do 10 μ M raztopine.

Minoksidil

Njegova molekulska masa znaša 209,25 in topnost 2,20 g/L (30). Pripravili smo 10 mM raztopino tako, da smo zatehtali 10,46 mg minoksidila, ga kvantitativno prenesli v 5 mL bučko in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Zaradi nepopolnega raztapljanja smo se odločili, da bomo uporabljali 5 mM koncentracijo, ki se je izkazala za stabilno bistro. Tudi minoksidil smo za potrebe razvoja analizne metode postopoma redčili do 5 μ M raztopine.

FOSFATNI PUFER

Fosfatni pufer je hkrati topilo za modelne spojine v donorski raztopini in akceptorski medij v Franzovih celicah. Pripravili smo ga tako, da smo v 0,5 L merilno bučko kvantitativno prenesli 1,190 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$, 0,095 g KH_2PO_4 in 4,0 g NaCl in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo. Raztopini smo pomerili pH in ga zvišali ali znižali na 7,4 s pomočjo dodatka 1 M NaOH ali 1 M HCl.

DONORSKA RAZTOPINA

Z namenom zmanjšanja števila poskusov s Franzovimi celicami smo v donorsko raztopino vključili vse preiskovane spojine. Raztopina za nanos na kožo vsebuje 5 mM kofeina, 2 mM imidakloprida, 5 mM diklofenaka, 5 mM minoksidila in 10 mM metilparabena. V skladu s spodnjo preglednico (preglednica I) smo vsako spojino posebej zatehtali in nato kvantitativno prenesli v bučko ter dopolnili do oznake s fosfatnim pufrom. Za hitrejše raztapljanje smo bučko postavili v UZ-kadičko.

Preglednica I: Koncentracije in mase modelnih spojin v donorski raztopini

Spojina	c [mM]	m [mg]	V = 50 mL
kofein	5	4,85	
diklofenak	5	7,95	
imidaklopid	2	2,55	
metilparaben	10	7,60	
minoksidil	5	52,3	

3.3.Razvoj analizne metode

Pri sočasni analizi večjega števila zelo različno polarnih oz. nepolarnih spojin praviloma uporabimo gradientno elucijo, da je celoten čas analize krajši in da so odzivi spojin z daljšimi retencijskimi časi ožji. Tako se izboljša tudi občutljivost. Želimo doseči zadostno ločljivost odzivov spojin ob čim krajšem času analize. V HPLC sistemu lahko določimo pretok mobilne faze, temperaturo, tip kolone, sestavo mobilne faze, volumen injiciranja in valovno dolžino zaznave. Pri razvoju metode smo se oprli na analizno metodo, ki omogoča sočasno analizo večih modelnih spojin, v že prej omenjeni diplomski nalogi Edite Rozina (26). Pri gradientni analizi se s časom spreminjata delež šibkega (voda ali pufri) in močnega topila (organski modifikator). ACN (acetonitril) je nizkoviskozno, hlapno, zelo polarno organsko topilo, ki v UV območju slabo absorbira svetlobo, tako da ne ovira detekcije spojin. Začetna koncentracija ACN je bila najprej nastavljena na 10 % vendar se je kofein takoj izločil s topilom, zato smo začetno koncentracijo ACN zmanjšali na 5 %. Diklofenak se je eluiral zelo pozno, zato smo povišali naklon gradienta, da smo pridobili krajši retencijski čas in ožji ter višji kromatografski odziv.

3.4. Umeritvena krivulja

Donorski raztopini smo dodali raztopino PHBA in nato redčili po shematično prikazanem postopku v prilogi 7.2, da smo dobili 10 točk s koncentracijami od 1/50 do 1/50.000 glede na donorsko koncentracijo. Z umeritveno krivuljo smo preverili območje linearnosti analizne metode. Dobljene enačbe premic smo uporabili pri izračunih koncentracij v posamičnih vzorcih.

3.5. Potek poskusa

PRIPRAVA IN ZAMRZOVANJE TKIVA

Polovico tkiva smo zamrznili s postavitvijo v skrinjo na -20°C , drugo polovico pa smo hitro zamrznili s kratkotrajno izpostavitvijo tekočemu dušiku in šele nato shranili pri -20°C . Da bi preučili ali predhodna ločitev kože od hrustanca (preparacija) vpliva na permeabilnost, smo znotraj vsakega načina zamrzovanja polovico tkiva pripravili že pred zamrzovanjem. Uhlje in kožo z uhljev smo zamrznili 2 do 6 ur po usmrtni živali in odstranitvi uhljev. Za vsak poskus, oziroma za vsak naveden pogoj, smo zamrznili po dva uhlja (preglednica II).

Preglednica II: Način zamrzovanja z ali brez ločitve kože od hrustanca

Zamrzovanje	Brez priprave	Ločitev
-20°C	2x	2x
N_2	2x	2x

Tkivo smo začeli pripravljati na zamrzovanje tako, da smo najprej z zloženci osušili površino kože, nismo pa je dodatno močili. Če se je le dalo, smo ločili obe strani uhljev. Dva uhlja smo zamrznili tako, da smo ju postavili v skrinjo na -20°C (kontrola). Dva uhlja smo narezali na dele primernih velikosti, jih potopili v tekoči dušik in nato shranili v skrinji pri -20°C . Nato smo se lotili ločevanja kože od hrustanca (preparacija). Najprej smo karseda pazljivo pristigli dlake, da nas niso ovirale pri nadaljnjem delu. S skalpelom smo previdno in čim bolj enakomerno ločili kožo od hrustanca, tako da je čim manj maščevja ostalo na hrustancu. Maščevje vpliva na prehajanje hidrofilnih spojin v medij, hkrati pa lahko tudi zadržuje zelo lipofilne spojine, zato smo kožo s prekomerno debelino maščevja zavrgli. Kožo z dveh pripraviranih uhljev smo zamrznili na -20°C , kožo z drugih dveh pripraviranih uhljev pa smo zamrznili s pomočjo tekočega dušika in nato shranili na -20°C . Tkivo s posameznega uhlja smo shranili v svojo plastično vrečko in ga ustrezno označili.

FRANZOVE CELICE

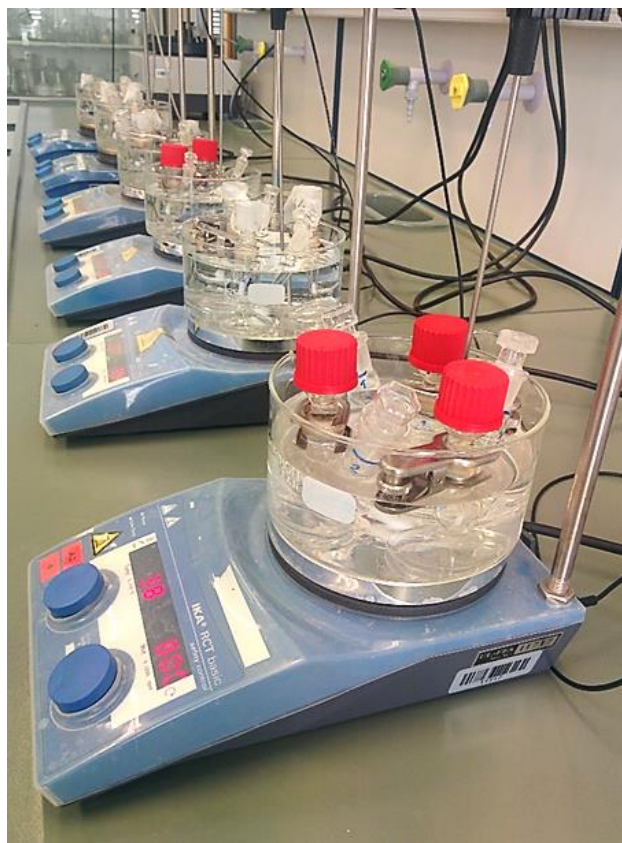
Franzove celice smo izbrali tako, da je brušeni del vratu donorskega dela čim bolj sovpadal z velikostjo brušenega dela vratu akceptorekega dela. Nato smo izmerili volumen akceptorskega dela in polmer odprtine na katero bo med poskusom vpeta koža. Za vsak tip priprave kože smo uporabili 4 Franzove celice. Celice s podobno višino vratu smo razvrstili v iste kristalizirke, tako da se gladina vode med poskusom ne dotika kože.

PREDINKUBACIJA

Predinkubacija tkiva, ki traja približno 12 – 18h, je potrebna, da se v koži vzpostavi temperaturni gradient, morebitne nečistoče preidejo v akceptorski medij in da se koža ponovno hidratira. Tkivo je bilo 5 tednov shranjeno pri -20°C , kar še ustreza OECD smernici 428 (2004). Tudi rezultati, objavljeni v diplomski nalogi z naslovom Odvisnost permeabilnostnih lastnosti kože prašiča v Franzovih difuzijskih celicah od časa shranjevanja kože (28), dokazujejo, da je uporaba nekaj tednov zamrznjene kože še ustrežna. Po vsaj 30 minutnem odtajanju smo kožo očistili z zložencem in prečiščeno vodo. Najprej smo se lotili dela s predhodno preparirano kožo, nato pa smo ločili še preostali del tkiva. Akceptorski del smo napolnili s fosfatnim pufrom, dodali magnetno mešalo in nato vpeli kožo tako, da na spodnji strani ni bilo zračnih mehurčkov. Preden smo kožo vpeli v celico, smo preverili tudi spodnjo stran kože, da je bila plast maščevja čim bolj enakomerna. Če se je med pripravo koža kakorkoli poškodovala, smo jo zavrgli. Celice smo čez noč pustili v vodni kopeli pri 37°C in mešanju s hitrostjo 800 min^{-1} .

IZVEDBA POSKUSA

Pod enakimi pogoji in sočasno smo izvedli vse štiri poskuse z različno zamrznjenimi kožami (slika 7). Na dan poskusa smo zamenjali akceptorski medij s svežim fosfatnim pufrom. Pri tem smo pazili, da pod površino kože niso ostali zračni mehurčki. V poskusu smo uporabili neskončni odmerek, tako da smo lahko donorsko raztopino v primeru slabega tesnjenja dodajali med poskusom. Donorski del smo dobro zatesnili, da donorska raztopina ni izhlapevala. Nanesli smo po 1 mL osnovne raztopine in vzorčili v trinajstih časovnih točkah: 0 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 9h, 11h in 24h. Odpipetirali smo po 250 μl vzorca in manjkajoči del nadomestili s svežim pufrom. Z nadomeščanjem pufrja ohranimo volumen akceptorskega medija, deloma pa to koristi tudi za ohranjanje *sink* pogojev. Med poskusom moramo ohranjati vodni nivo v kristalizirki, kar lahko zahteva občasno nadomeščanje izhlapele vode.



Slika 7: Postavitev poskusa

Po koncu poskusa smo vzorce zbrane v mikrotitrskih ploščicah pomerili z razvito HPLC metodo. Najprej smo pomerili vzorce redčitev iz uporabljene donorske raztopine za izdelavo umeritvenih krivulj in nato vzorce posameznih časovnih točk.

PERMEABILNOST

Difuzija je najpomembnejši mehanizem prehoda spojin skozi membrane. Količino snovi, ki je v nekem času prešla membrano, lahko v primeru končnega odmerka podamo kot delež absorbirane snovi (%). Omeniti je potrebno, da obstaja več načinov obdelave rezultatov *in vitro* dermalne absorpcije. Rezultate lahko podamo kot maksimalno absorpcijsko hitrost (*angl.* maximum absorption rate) in v primeru ravnotežnih pogojev, kot navidezni permeabilnostni koeficient (P_{app}). Za pridobitev P_{app} moramo uporabiti neskončni odmerek donorske raztopine in zadosten čas izvajanja poskusa, da se hitrost prehoda snovi ustali (*steady state*). Različne smernice si pri vprašanju, ali upoštevati tudi količino spojine, ki se je zadržala v različnih plasteh kože, niso enotne. To je predvsem opazno pri zelo lipofilnih spojinah, ki imajo večjo težnjo, da ostanejo v SC ali za spojine ki se v koži vežejo na različne proteine (29).

Prvi Fickov zakon

Pasiven prehod topljenca (difuzija) v nasprotni smeri koncentracijskega gradienta matematično opisuje difuzijski ali 1. Fickov zakon (*enačba 1*). Negativni predznak v enačbi določa, da difuzijski tok poteka v nasprotni smeri koncentracijskega gradienta, torej v smeri od večje koncentracije snovi k manjši. V ravnotežnem stanju se koncentracija snovi v posameznih plasteh membrane s časom ne spreminja. Pri takšnih pogojih je naklon koncentracijskega gradienta (dC/dx) konstanten ter koncentracijski profil linearen in neodvisen od časa (30).

Enačba 1

$$J = -D \frac{dc}{dx}$$

J ... fluks [$g/cm^2/h$]
D ... difuzijski koeficient [cm^2/h]
dc/dx ... koncentracijski gradient

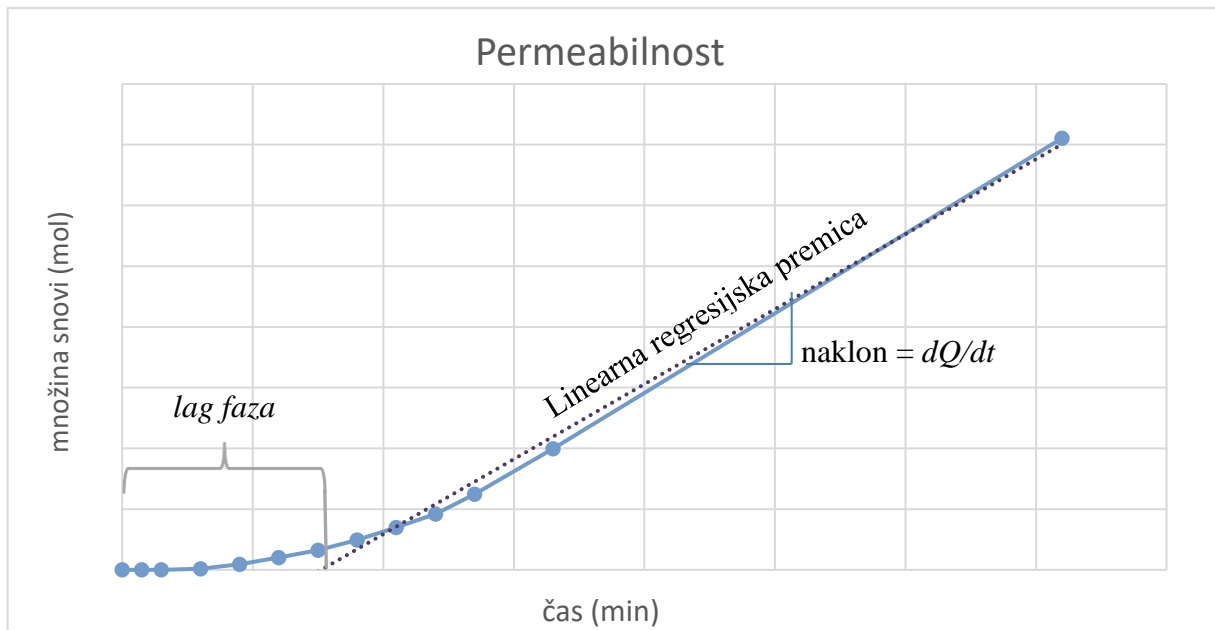
Če upoštevamo, da je donorska koncentracija mnogo večja od akceptorske koncentracije, lahko zapišemo enačbo konstante difuzije (k_d) (*enačba 2*) (31). Ta parameter lahko pridobimo tudi eksperimentalno z linearno regresijo t.i. *steady state* območja v grafu postopnega naraščanja množine snovi v odvisnosti od časa. Čeprav so pogoji med izvajanjem poskusa konstantni, se hitrost prehajanja snovi v začetnih stopnjah poskusa spreminja, v določeni točki pa se vzpostavi linearen odnos absorpcije v odvisnosti od časa.

Enačba 2

$$\frac{dQ}{dt} = k_d$$

dQ/dt ... količina penetrirane snovi v določeni časovni enoti
k_d ... konstanta difuzije [mol/h]

Območje, kjer se hitrost prehoda snovi s časom večja, imenujemo *lag faza* (slika 8). Obsega predel od izhodišča grafa do sečišča linearne regresijske premice z osjo x. V tej fazi v membrano vstopi več spojine, kakor izstopi. Predstavlja čas, ko v tkivu potekajo zapleteni procesi. Čas, ki je potreben za doseganje ravnotežnega stanja, je odvisen od večih dejavnikov, kot so živalska vrsta, debelina kože, akceptorski medij in sestava formulacije (32).



Slika 8: Primer naraščajoče množine snovi v odvisnosti od časa

Iz 1. Fickovega zakona so za izračun transdermalnega prehoda snovi izpeljani enačbi za navidezni permeabilnostni koeficient (P_{app}) in fluks linearne faze (J_{ss}).

Fluks linearne faze

Fluks linearne faze (J_{ss}) je količina snovi, ki prehaja membrano s konstantno hitrostjo. Za izračun J_{ss} (enačba 3) potrebujemo naklon linearne regresijske premice podatkov kumulativne množine snovi v akceptorskem mediju (k_d) in površino membrane v stiku z donorsko raztopino (A). Pomanjkljivost fluksa linearne faze je ta, da upošteva le količino spojine, ki je pripotovala v akceptorski medij.

Enačba 3

$$J_{ss} = \frac{k_d}{A}$$

J_{ss} ... fluks linearne faze [$\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{cm}^2)$]

k_d ... naklon linearne regresijske premice [mol/h]

A ... površina membrane [cm^2]

Navidezni permeabilnostni koeficient

Je eksperimentalno določen parameter, ki opisuje barierno sposobnost membrane. Ker poznamo donorsko koncentracijo spojine, lahko iz J_{ss} izračunamo permeabilnostni koeficient (enačba 4). Velja za ključni parameter za oceno dermalne absorpcije, saj se s spreminjanjem koncentracije in časa njegova vrednost ne spreminja in zato služi kot parameter za medlaboratorijsko primerjavo izvedbe poskusov. Velja za bolj zanesljivega za napoved dermalne absorpcije kot J_{ss} (33).

Enačba 4
$$P_{app} = \frac{J_{ss}}{c_d}$$

P_{app} ... navidezni permeabilnostni koeficient [cm/s]

J_{ss} ... fluks linearne faze [mol/(s·cm²)]

c_d ... koncentracija spojine v donor. mediju [mol/L]

OBDELAVA REZULTATOV

Z integracijo odzivov dobljenih kromatogramov smo dobili površine odzivov. Podatke smo nato uredili in obdelali s programom Microsoft Excel. Z uporabo umeritvenih premic ter izpeljav enačb 1. Fickovega zakona smo pridobili rezultate množine snovi, J_{ss} (enačba 3) in P_{app} (enačba 4). Za izračun J_{ss} smo za vsako Franzovo celico izbrali časovno območje, z zadovoljivim koeficientom determinacije (R^2). Iz naklona smo nato pridobili konstanto difuzije (K_d), ki smo jo uporabili v enačbi 3. Znotraj vsakega poskusa smo izračunali povprečno vrednost (PV), standardno deviacijo (SD) in relativni standardni odklon (RSD) rezultatov P_{app} . Ker imamo opravka z majhnim vzorcem ($n < 30$), smo uporabili F-test za testiranje enakosti varianc in t-test za neodvisne vzorce. Uporabili smo dvostranski t-test s 5 % tveganjem.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1.HPLC metoda

Po spreminjanju dejavnikov, ki vplivajo na ločbo spojin (kolona, naklon gradienta, mobilna faza in volumen injiciranja), se je kot najboljša izkazala metoda s kolono XTerra MS, C18, 3.5 μ m, 4.6 x 100 mm, z mobilno fazo iz 0,1 % metanojske kisline (A) in spreminjajočega se deleža ACN (B), po časovnem programu prikazanem v preglednici III. Volumen injiciranja je bil 50 μ L, pretok je znašal 2 mL/min in temperatura kolone je bila 50°C. Eluirane spojine smo detektirali pri 256 nm ali 272 nm (Preglednica IV).

Spojina	RT [min]	UV [nm]
PHBA	2,7	256
Kofein	4,2	272
Minoksidil	4,6	272
Imidaklopid	6,2	272
Metilparaen	6,7	256
Diklofenak	9,6	272

B [%]	t [min]
5	2
25	6
75	9,5

Preglednica III: Retencijski časi in valovna dolžina zaznave

Preglednica IV: Casovni program spreminjajočega se deleža ACN

4.2. Umeritvena krivulja

Iz odzivov smo v odvisnosti od koncentracije spojine naredili umeritvene krivulje posameznih spojin. Koeficient determinacije (R^2) je za vsako premico znašal vsaj 0,9997, kar nam pove, da je linearnost zadovoljiva. Sečišča premic z y osjo so tudi zelo nizka, kar je dodatni kriterij za presojo linearnosti in je pomemben predvsem, ker nam omogoča kvantifikacijo spojin v zelo majhnih koncentracijah.

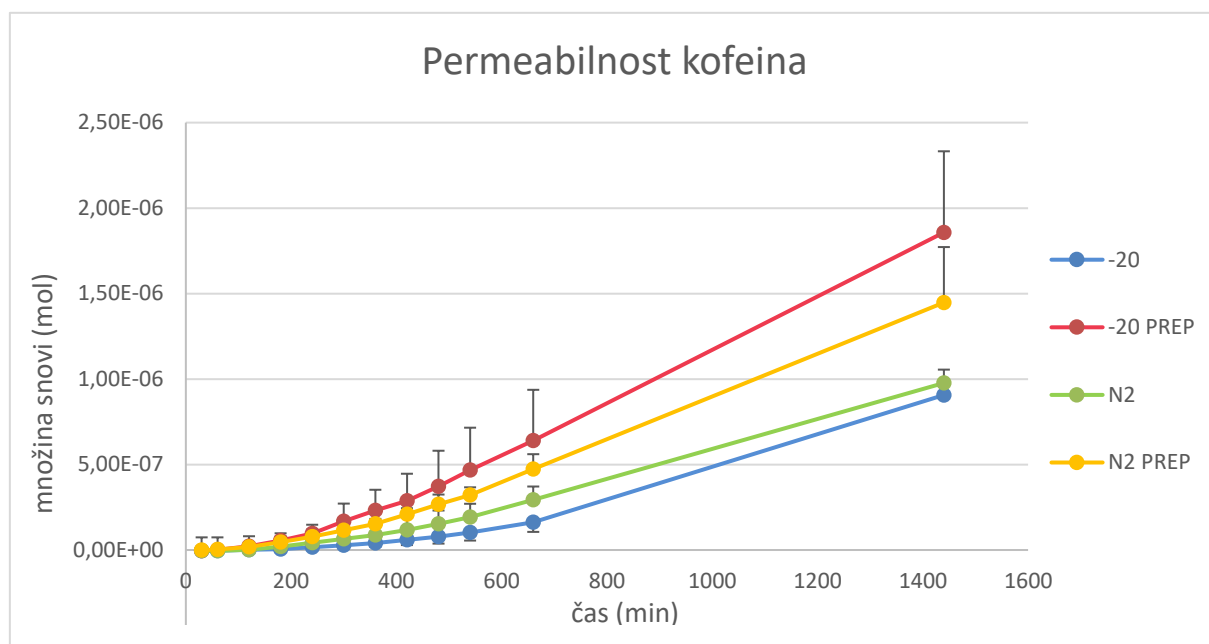
4.3. Permeabilnost spojin

Permeabilnostne koeficiente smo določali na koži prašičjih ušes (preglednica V). Pri pregledu podatkov smo nekatere celice izločili, če s spreminjanjem dolžine *lag faze* nismo dosegli zadovoljive linearnosti. Za vsako celico smo želeli pridobiti linearno območje z $R^2 \approx 0,990$, ki kaže dobro korelacijo med časom in fluksom. Pri nekaterih celicah pa smo sprejeli tudi manjši R^2 , ki je znašal najmanj 0,982 (z izjemo metilparabena). Na ta način smo izločili Franzovo celico številka 3 pri vseh spojinah. Prve tri celice iz poskusa zamrznjene kože pri -20°C so bile preko noči termostatirane na več kot 37°C , zato nam rezultati vzorčenja pri 24h niso na voljo. Če bi že pri času t_0 bilo v mediju mogoče zaznati kakšno spojino, bi morali rezultate teh celic izločiti, saj je koža preveč prepustna in je verjetno poškodovana. Pri statističnem vrednotenju rezultatov s F in t-testom smo se osredotočili na primerjavo treh različnih načinov zamrzovanja kože s predhodno nepreparirano kožo, zamrznjeno pri -20°C . Podatki o naklonih linearnega dela kumulativnih množin snovi, koeficientih determinacije (R^2) za izbran linearni odsek in izračunani J_{ss} za posamezno spojino so podani v prilogah 7.3 do 7.7.

Preglednica V: Oznake poskusov različnih načinov zamrzovanja

TIP POSKUSA	OZNAKA
Koža, zamrznjena pri -20°C	-20
Predhodno preparirana koža, zamrznjena pri -20°C	-20P
Koža, zamrznjena z N_2	N_2
Predhodno preparirana koža, zamrznjena z N_2	N_2P

Kofein



Slika 9: Naraščanje množine snovi kofeina tekom poskusa glede na način zamrzovanja

Iz slike 9 je razvidno, da se kumulativna množina snovi ne povečuje linearno od samega začetka poskusa, ravno zaradi *lag faze*, ki pa ji sledi faza linearnega naraščanja koncentracije, ko so koeficienti determinacije pri odvisnosti množine snovi od časa vsaj 0,98. Vidno je, da je za kofein najbolj prepustna -20P, sledi pa ji N₂P. Kot najmanj prepustna se izkaže -20. To se sklada tudi s $\overline{P_{app}}$ za posamezen način zamrzovanja (preglednica VI).

Preglednica VI: Permeabilnostni koeficienti posameznih celic (P_{app}) ter povprečne vrednosti (PV), standardni odkloni (SD) in relativni standardni odkloni (RSD) glede na način zamrzovanja za kofein

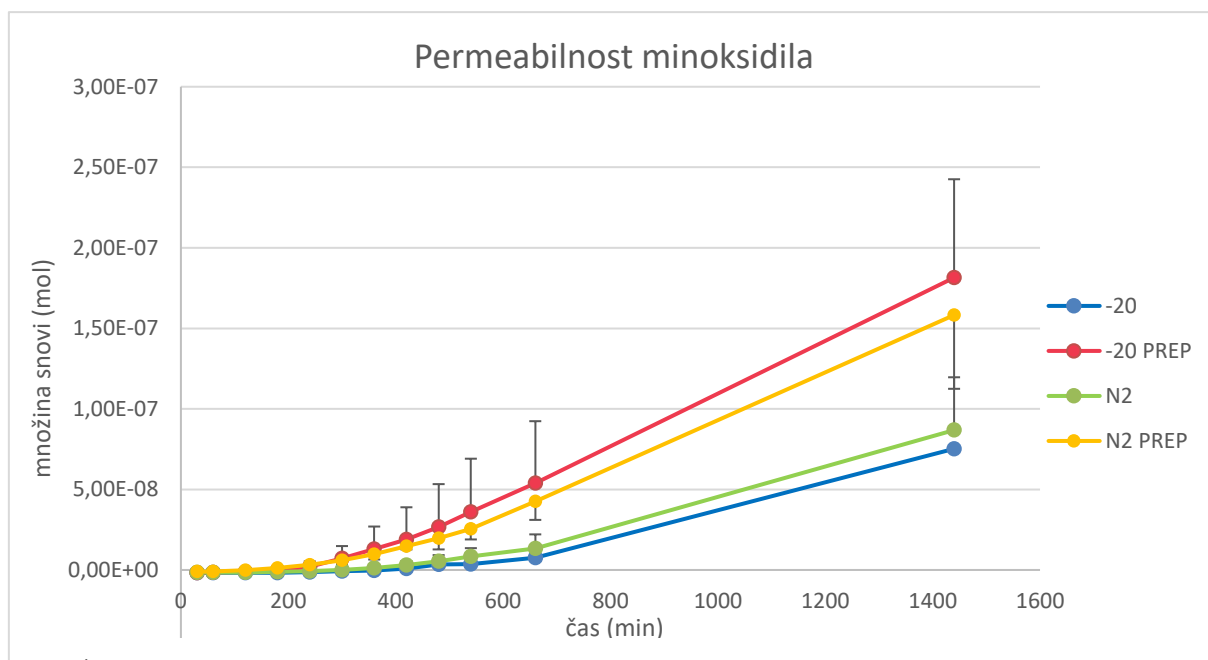
P_{app} [nm/s]	1	2	3	4	PV	SD	RSD (%)
-20	1,18	0,77		2,79	1,58	1,06	67,3
-20P	3,33	5,66	6,38	5,86	5,31	1,35	25,5
N ₂	2,63	2,28	2,58	4,33	2,96	0,93	31,5
N ₂ P	3,32	4,40	5,55	4,01	4,32	0,93	21,6

Pri statistični primerjavi -20 in -20P je vidno, da so razlike med njima statistično značilne ($p = 0,011$; $p < 0,05$) in ničelna hipoteza ostane nepotrjena. Razlike so značilne tudi pri primerjavi -20 in N₂P. Verjetnost povezana s t-testom pri primerjavi -20 in N₂ pokaže, da razlike niso statistično značilne ($p = 0,127$; $p > 0,05$) (preglednica VII).

Preglednica VII: Verjetnosti povezane s F in t-testi za kofein

Kofein		-20P	N ₂	N ₂ P
-20	F-test	0,809	0,781	0,784
	t-test	0,011	0,127	0,015

Minoksidil



Slika 10: Naraščanje množine snovi minoksidila tekom poskusa glede na način zamrzovanja

Tudi pri prehajanju minoksidila (slika 10) je vidno, da sta predhodno preparirani koži najbolj permeabilni in imata najvišja permeabilnostna koeficienta (preglednica VIII). Zopet je najmanj prepustna koža zamrznjena na -20°C brez predhodne priprave.

Preglednica VIII: Permeabilnostni koeficienti celic (P_{app}) ter povprečne vrednosti (PV), standardni odkloni (SD) in relativni standardni odkloni (RSD) glede na način zamrzovanja za minoksidil

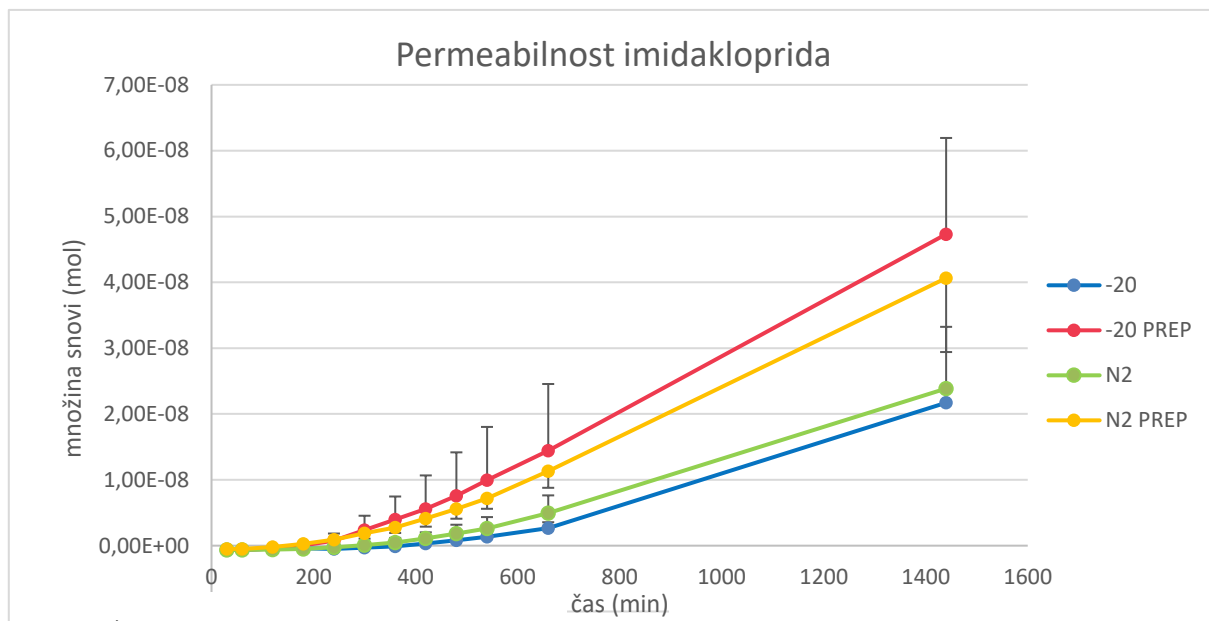
P_{app} [nm/s]	1	2	3	4	PV	SD	RSD (%)
-20	0,07	0,03	/	0,25	0,12	0,12	96,9
-20P	0,19	0,35		0,34	0,69	0,39	0,21
N ₂	0,26	0,24	0,24	0,27	0,25	0,02	6,4
N ₂ P	0,29	0,51	0,64	0,44	0,47	0,15	31,0

S statističnem vrednotenjem (preglednica IX) smo ugotovili, da so razlike statistično značilne pri primerjavi -20 in N₂P. Razlike pa niso statistično značilne pri primerjavi N₂ in -20 in pri primerjavi -20P in -20.

Preglednica IX: Verjetnosti povezane s F in t-testi za minoksidil

Minoksidil		-20P	N ₂	N ₂ P
-20	F-test	0,481	0,010	0,827
	t-test	0,103	0,183	0,019

Imidaklopid



Iz slike 11 je razvidno, da je največ imidakloprida prešlo v akceptorski medij pri obeh prepariranih kožah, najmanj pa pri N₂ in -20. V preglednici X je vidno, da si povprečja P_{app} sledijo od najbolj permeabilne -20P (0,14 nm/s) do najmanj permeabilne -20 (0,04 nm/s).

Preglednica X: Permeabilnostni koeficienti celic (P_{app}) ter povprečne vrednosti (PV), standardni odkloni (SD) in relativni standardni odkloni (RSD) glede na način zamrzovanja za imidaklopid

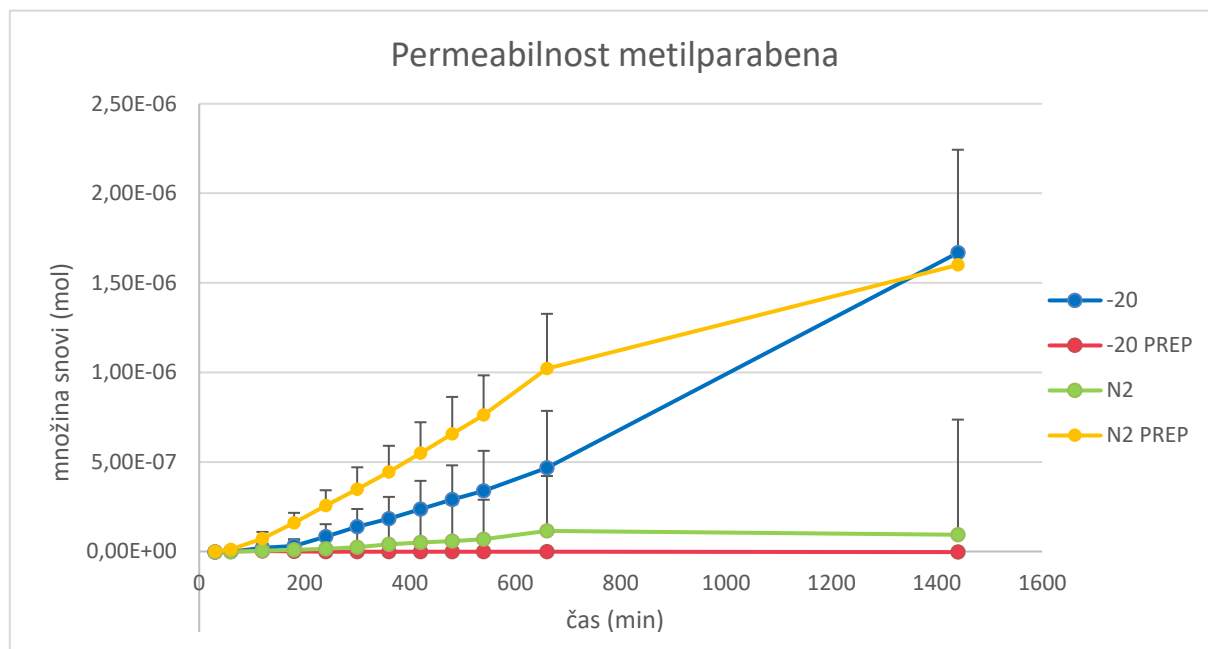
P _{app} [nm/s]	1	2	3	4	AVG	SD	RSD (%)
-20	0,02	0,01	/	0,07	0,04	0,03	88,9
-20P	0,09	0,15	0,15	0,18	0,14	0,04	27,1
N ₂	0,07	0,07	0,06	0,12	0,08	0,03	31,4
N ₂ P	0,10	0,13	0,17	0,11	0,13	0,03	24,1

Po statistični obdelavi (preglednica XI) je vidno, da so razlike statistično značilne pri primerjavi obeh predhodno prepariranih kož z -20. Pri statistični primerjavi N₂ in -20 pa verjetnost povezana s t-testom kaže, da razlike niso statistično značilne (p = 0,095; p > 0,05).

Preglednica XI: Verjetnosti povezane s F in t-testi za imidakloprid

Imidakloprid		-20P	N ₂	N ₂ P
-20	F-test	0,866	0,666	0,874
	t-test	0,012	0,095	0,013

Metilparaben



Slika 12: Naraščanje množine snovi metilparabena glede na način zamrzovanja

Pri interpretaciji rezultatov MP smo imeli največ težav, saj množina snovi ne narašča skoraj linearno kot pri drugih spojinah, v nekaterih primerih pa vrednosti celo padajo (slika 12). Tudi ko smo sešteli množino snovi MP in PHBA, ki sta prešli membrano pri posameznih celicah, nismo dobili smiselnih rezultatov. Lahko sklepamo, da se skoraj ves MP v poskusih N₂ in -20P metabolizira. Takšni rezultati so lahko posledica nepravilno shranjenih vzorcev ali napake v analizi. Tudi glede na preglednico XII je N₂P najbolj permeabilna, sledi pa ji -20. Zaradi rezultatov, ki ne kažejo smiselnih povezav, se ne bomo spuščali v pregled F in t-testov.

Preglednica XII: Permeabilnostni koeficienti celic (P_{app}) ter povprečne vrednosti (PV) in standardni odkloni (SD) glede na način zamrzovanja za metilparaben

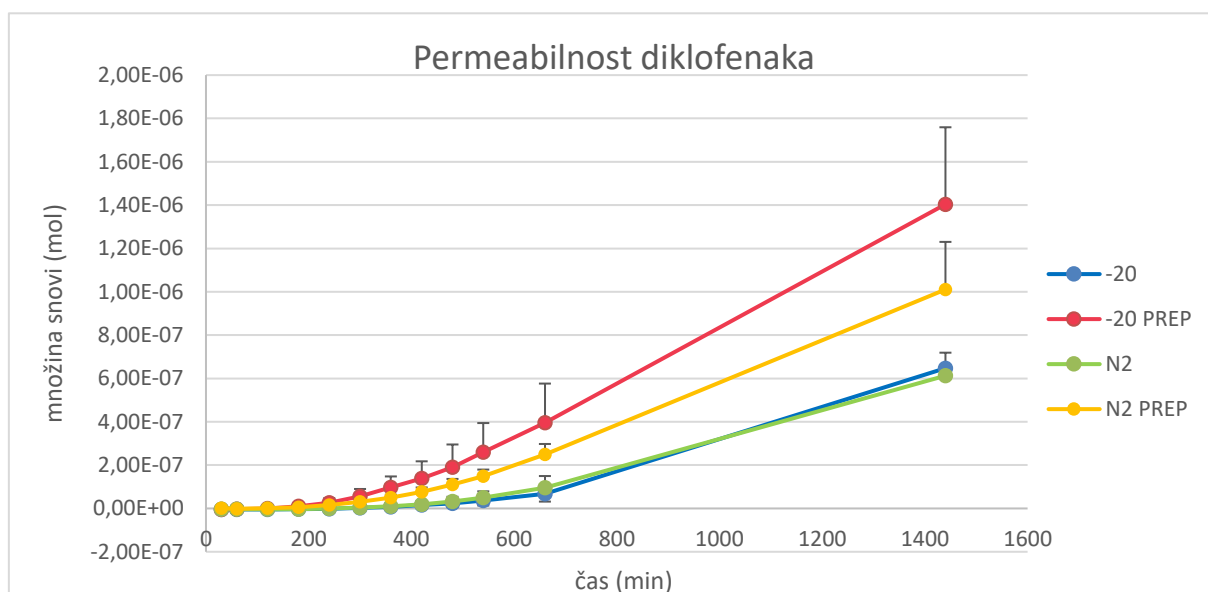
P_{app} [nm/s]	1	2	3	4	AVG	SD
-20	3,38	2,48	0,24	4,45	2,64	1,79
-20P	-0,01	0,00	0,00	-0,01	0,00	0,00
N ₂	2,76	-0,02	0,00	0,00	0,69	1,38
N ₂ P	2,01	3,67	5,40	7,12	4,55	2,20

V *in vitro* študiji so ugotovili, da kožo prašičjega uhlja po štirih urah penetrira le 2-5 % nemetaboliziranega MP (donorska 0,1 % MP), največ nemetaboliziranega metilparabena (18 %) pa ostane v roženi plasti. Meritve metilparabena in PHBA niso ponovljive, saj je poleg metabolizma njuna zaznava otežena, morda tudi zaradi drugih interakcij s tkivom (34). Težave pri zaznavi so se pojavile tudi v diplomski nalogi Edite Rozina (26). Zaradi metabolizma in njihove otežene detekcije je uporaba metilparabena kot modelne spojine nesmiselna.

PHBA

Rezultati meritev PHBA so bili podobno kot pri metilparabenu neponovljivi in pravzaprav tudi nesmiselni in jih zato ne bomo navedli. Odziv PHBA se je tekom analize vzorcev premikal in širil, zato smo nekatere vzorce pomerili z drugo kolono. Nekaj časa je bil odziv lep, potem pa se je premikanje in širjenje ponovno pojavilo. Glede na meritve bi v obliki PHBA skozi kožo namreč prešla celotna količina MP iz donorske raztopine. Pri seštevanju množine snovi MP, ki je prešel kožo v obliki nespremenjenega MP in PHBA, tako seveda tudi nismo dobili smiselnih aditivnih podatkov. Sklepamo lahko, da v koži poleg metabolizma, pride tudi do neznanih interakcij metilparabena s tkivom.

Diklofenak



Slika 13: Naraščanje množine snovi diklofenaka tekom poskusa glede na način zamrzovanja

Najbolj permeabilna je predhodno preparirana koža, ki smo jo zamrznili in shranili pri -20°C , nato ji sledi predhodno preparirana koža, zamrznjena s tekočim dušikom. Za diklofenak se kot najmanj prepustni koži izkažeta poskusa -20 in N_2 (slika 13). Razlike so statistično značilne pri primerjavi -20P in -20 ter pri N_2P in -20. Razlik pa s t-testom ni bilo zaznati pri primerjavi -20 in N_2 (preglednica XIV).

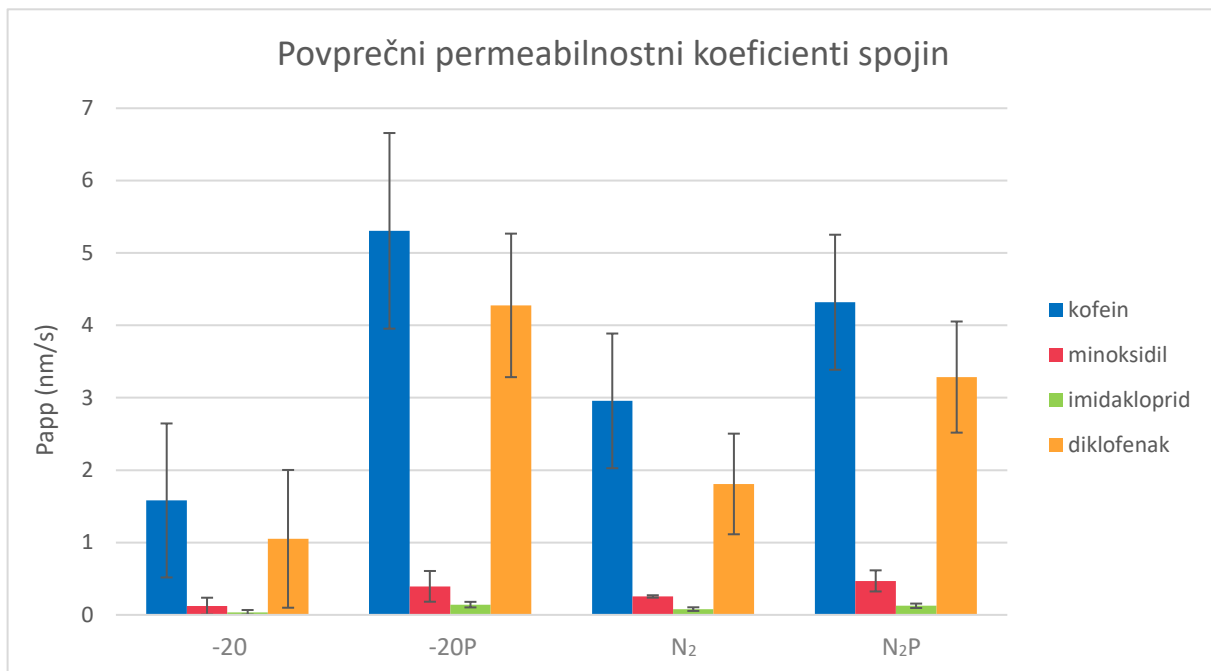
Preglednica XIII: Permeabilnostni koeficienti celic (P_{app}) ter povprečne vrednosti (PV) in standardni odkloni (SD) in relativni standardni odkloni (RSD) glede na način zamrzovanja za diklofenak

P_{app} [nm/s]	1	2	3	4	AVG	SD	RSD (%)
-20	0,68	0,34		2,13	1,05	0,95	90,6
-20P	2,84	4,88	4,98	4,41	4,28	0,99	23,2
N_2	1,89	2,01	0,84	2,49	1,81	0,70	38,4
N_2P	2,41	2,89	4,04	3,80	3,29	0,77	23,4

Preglednica XIV: Verjetnosti povezane s F in t-testi za diklofenak

Diklofenak		-20P	N_2	N_2P
-20	F-test	0,985	0,593	0,694
	t-test	0,007	0,273	0,018

Primerjava P_{app}



Slika 14: Povprečja permeabilnostnih koeficientov spojin (P_{app}) po posameznem načinu zamrzovanja kože, vključno s standardnimi odkloni

Glede na povprečne permeabilnostne koeficiente (slika 14) se je kot najbolj prepustna koža izkazala predhodno preparirana koža, zamrznjena pri -20°C (-20P), sledi ji predhodno preparirana koža, zamrznjena s tekočim dušikom (N_2P), nato sledi koža, zamrznjena s tekočim dušikom (N_2) in nato z najmanjšimi $\overline{P_{app}}$ sledi še koža, zamrznjena pri -20°C . Ta permeabilnostni trend smo videli tudi pri vseh spojinah (razen pri MP) v prejšnjih poglavjih. Pri primerjavi $\overline{P_{app}}$ pri vseh spojinah med -20 in -20P je povprečje razmerij 3,7, med -20 in N_2P pa 3,3. Pri zamrzovanju s tekočim dušikom pa so $\overline{P_{app}}$ v povprečju dvakrat večji kot pri zamrzovanju pri -20°C .

Razvidno je, da se razmerja spojin lepo ohranjajo med posameznimi načini zamrzovanja. Metilparaben na grafu ni prikazan, ker so povprečja P_{app} in standardni odkloni zelo veliki. Kofein velja za eno izmed najbolj permeabilnih spojin skozi kožo ($\overline{P_{app}}_{(-20)} = 1,58 \text{ nm/s}$) kar je zaželjeno pri kozmetičnih izdelkih proti celulitu ali pri izdelkih za pospešitev rasti las. Nasprotno, imidaklopid težje in najpočasneje prehaja kožo ($\overline{P_{app}}_{(-20)} = 0,04 \text{ nm/s}$), kar je zaželjeno, saj se ga uporablja kot insekticid. Razmeroma dobro prehajanje diklofenaka skozi kožo se v terapiji že izkorišča, zato je na trgu kar nekaj zdravil z diklofenakom (npr. Voltaren), namenjenih lokalni uporabi. Poleg kofeina se za spodbujanje rasti las uporablja tudi minoksidil in vidimo, da veliko slabše prehaja kožo ($\overline{P_{app}}_{(-20)} = 0,12 \text{ nm/s}$). Slabše prehajanje minoksidila

skozi kožo je za uporabo pospeševanja rasti las zaželeno, saj je v tem primeru namenjen le lokalni uporabi. Prevelika sistemska absorpcija bi z varnostnega vidika pomenila njegovo neuporabnost (periferni vazodilatator).

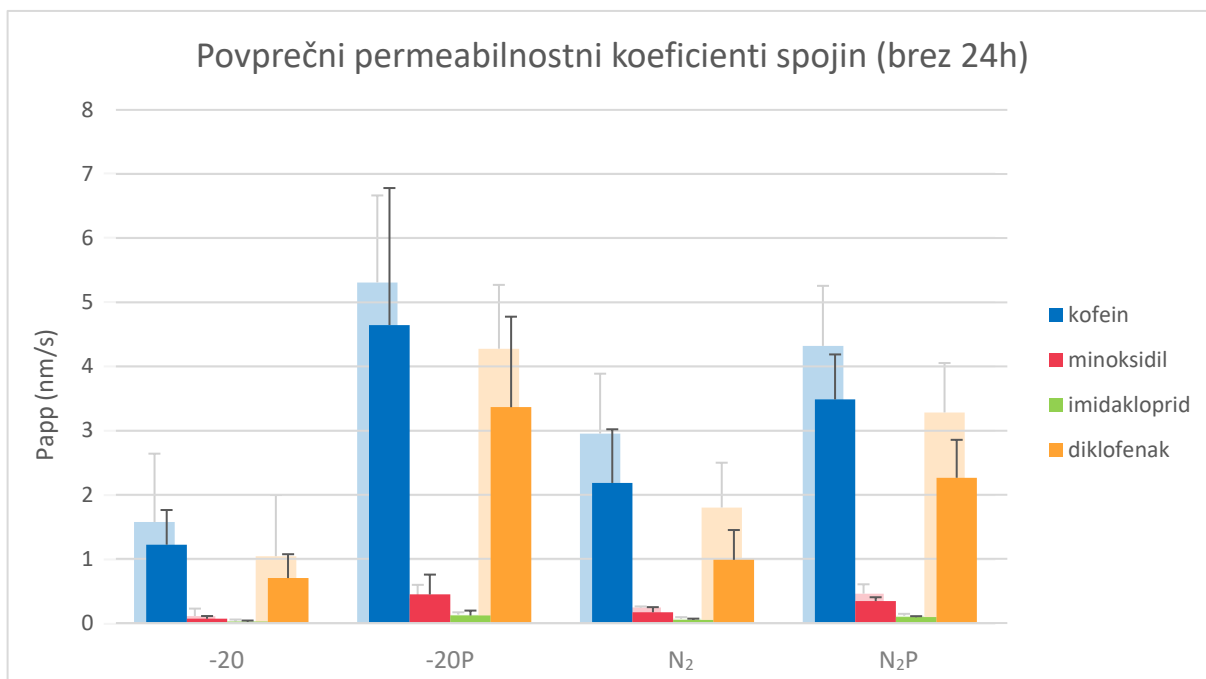
Smiselnost vzorčenja pri 24-urnem poskusu

Pri vseh celicah smo izbrisali zadnjo točko vzorčenja (24 ur), dolžino *lag faze* pa nismo spreminjali. Primerjave $\overline{P_{app}}$ (preglednica XV) nakazujejo, da razlike med 24-urnim in 11-urnim poskusom niso statistično značilne ($p > 0,05$). Sklepamo lahko, da sta oba vzorca izvzeta iz iste populacije. Prekonočno izvajanje pokusa bi pri delu z našim naborom modelnih spojin lahko izpustili, saj preko noči nimamo nadzora nad celicami, vzorec odvzet ob 24 urah pa bistveno ne doprinese k zanesljivosti rezultata. Celo nasprotno, na primeru ene od uporabljenih termostatiranih vodnih kopeli, kjer je prišlo do velikega odstopa temperaturne nastavitve preko noči, se je povsem slučajno pokazala smiselnost stalnega nadzora nad poskusom.

Preglednica XV: Verjetnosti povezane s t-testom pri primerjavi rezultatov P_{app} posameznih celic znotraj istega načina zamrzovanja z in brez rezultatov vzorčenja v

t-test	Kofein	Minoksidil	Imidakloprid	Metilparaben	Diklofenak
-20	0,63	0,49	0,62	0,99	0,59
-20P	0,62	0,79	0,13	0,62	0,33
N2	0,26	0,12	0,11	0,65	0,10
N2P	0,20	0,16	0,09	0,27	0,08

Stolpčni diagram (slika 15) v močnejših barvah prikazuje povprečja permeabilnostnih koeficientov spojin ($\overline{P_{app}}$) brez zadnje točke vzorčenja (24h) po posameznem načinu zamrzovanja kože, vključno s standardnimi odkloni in v ozadju v šibkejših barvah stolpični diagram iz poglavja Primerjava P_{app} . Če bi poskus izvajali le 11 ur bi bila $\overline{P_{app}}$ v primerjavi s 24-urnim poskusom manjša. To bi lahko pripisali prekomerni hidrataciji kože, ki je po 24-urnem stiku z donorsko raztopino bolj permeabilna.



Slika 15: Stolpčni diagram primerjave povprečnih permeabilnostnih koeficientov spojin pri izvajanju poskusa 24h ali 11h

V preglednici XVI so prikazani rezultati primerjav ostalih načinov zamrzovanja z zamrzovanjem tkiva pri -20°C . Osredotočili smo se na primerjavo N₂ in -20. Pri kofeinu je vidno, da se p vrednost bistveno ne spremeni ($p_1 = 0,127$; $p_2 = 0,146$). Verjetnosti, povezane s t-testom se pri primerjavi -20 in N₂ pri minoksidilu zniža na $p = 0,104$ in za spojino imidaklopid se v primerjavi s prejšno nižjo ($p = 0,095$) vrednostjo zviša na $p = 0,11$. Prav tako se p vrednost zviša pri statistični primerjavi N₂ in -20 pri diklofenaku.

Lahko zaključimo, da nam izključitev zadnje točke vzorčenja glede na vrednosti t-testov ne spremeni končne interpretacije rezultatov. Spremeni se le primerjava -20P in -20, ki pokaže, da razlike niso več statistično značilne. S krajšim izvajanjem poskusa bi zagotovili boljši nadzor nad celotnim sistemom (nadzor temperature, nivoja vodne kopeli, količine donorske raztopine v primeru slabega tesnenja, mešanja, itd.). Poleg tega so zadnje meritve nekoliko višje, kot bi morale biti, saj se koži zmanjša barierna funkcija zaradi dolgotrajne hidratacije.

Preglednica XVI: Verjetnosti povezane s t-testom pri primerjavi P_{app} posameznih Franzovih celic pri 24-urnem in 11-urnem poskusu

24-urni poskus		-20P	N ₂	N ₂ P
Kofein	-20	0,011	0,127	0,015
Minoksidil		0,103	0,183	0,019
Imidaklopid		0,012	0,095	0,013
Diklofenak		0,007	0,273	0,018

11-urni poskus		-20P	N ₂	N ₂ P
Kofein	-20	0,045	0,146	0,006
Minoksidil		0,095	0,104	0,001
Imidaklopid		0,094	0,110	0,002
Diklofenak		0,026	0,427	0,011

Za vsak način zamrzovanja smo v Franzovih celicah uporabili tkivo z uhlja iste živali. Potrebno je upoštevati, da se kože med seboj razlikujejo po poraščenosti, številu kožnih izvodil, količini maščevja, debelini posameznih kožnih plasti itd. Pridobitev rezultatov s tako velikimi standardnimi odkloni bi lahko pripisali prav tem razlikam v koži. Na velike standardne odklone vpliva tudi majhno število meritev v našem poskusu. Poleg tega pri ločitvi kože od hrustanca zaradi težko ponovljivega postopka pridobimo kože z različnimi debelinami maščevja, kar lahko močno vpliva na prehajanje spojin v akceptorski medij. Možno je tudi, da s prostim očesom nismo zaznali poškodb, ki smo jih naredili s škarjicami ali skalpelom. Pri koži, zamrznjeni s tekočim dušikom, bi zgolj na osnovi dejstva, da se pri tem postopku tvorijo majhni vodni kristali, lahko pričakovali manjše permeabilnostne koeficiente spojin kot pri predhodno nepreparirani koži, zamrznjeni pri -20°C , vendar rezultati našega poskusa tega niso potrdili. Ravno nasprotno, zamrzovanje s tekočim dušikom povzroči večje prehajanje spojin skozi kožo.

V primeru *in vitro* permeabilnostnih testiranj z uporabo človeške kože dobimo najbolj zanesljive rezultate. Pri plastičnih operacijah pridobimo kožo, v podobni (preparirani) obliki kot pri ločitvi kože od hrustanca v primeru priprave prašičjega uhlja. Opredeliti, kateri način zamrzovanja ali priprave tkiva je za uporabo v dermalnih testiranjih boljši, je nesmiselno, saj ni pravilnega ali napačnega tkiva za testiranje. Naši rezultati predvsem kažejo, da kadar uporabimo enako obravnavano tkivo (način zamrzovanja, živalska vrsta, čas shranjevanja, metoda ločevanja, itd.) je primerjava med različnimi poskusi, izvedenimi pod enakimi pogoji izvedbe, možna. Da je primerjava rezultatov možna, je smiselno standardizirati obravnavo tkiva vsaj znotraj istega laboratorija.

Hitrost zamrzovanja ima lahko velik vpliv tudi na delež vlage v tkivu. Pri hitrem zamrzovanju s tekočim dušikom bo voda imela manj časa za izhlapevanje, kot pri počasnem zamrzovanju v skrinji. V zamrznjenem tkivu lahko pride do izgub mase predvsem zaradi sublimacije ledu (35, 36). Tvorba kristalov pri zamrzovanju lahko lipidnim plastem odtegne vodo, ki se med hidratacijo tkiva ne povrne popolnoma, kar lahko povzroči večjo permeabilnost tkiva (36).

Pri primerjavi N_2P in -20 so razlike pri vseh spojinah statistično značilne, tako pri 24-urnem, kot tudi pri 11-urnem poskusu. Pri primerjavi -20P in -20 pa se pri 11-urnem poskusu pri imidaklopridu razlike izkažejo za statistično značilne. Le pri predhodno prepariranih kožah bi lahko pripisali vpliv zamrzovanja s tekočim dušikom (manj mikropoškodb) na permeabilnost. To se vidi tako, da ima pri vseh spojinah N_2P manjše $\overline{P_{app}}$ od -20P .

5. SKLEP

Rezultati potrjujejo odvisnost prehajanja modelnih spojin skozi različno zamrznjeno kožo. Za vse modelne spojine je najbolj permeabilna predhodno preparirana koža, zamrznjena pri -20°C , sledi pa ji predhodno preparirana koža, zamrznjena s tekočim dušikom. Ugotovili smo, da predhodna ločitev kože od hrustanca (prepariranje) povzroči več kot 3x višjo permeabilnost tkiva. Lahko pridemo do zaključka, da zamrzovanje s tekočim dušikom pri predhodno preparirani koži povzroči manj mikropoškodb, zato je permeabilnost takega tkiva nekoliko manjša. Smiselno bi bilo tudi preučiti, kako zamrzovanje s tekočim dušikom vpliva na vsebnost kožne vlage.

Rezultati statistične obdelave podatkov pri vseh uporabljenih modelnih spojinah nakazujejo, da lahko uhelj zamrznemo z uporabo tekočega dušika brez statistično značilnega vpliva na permeabilnost ($p > 0,05$). Povprečni premeabilnostni koeficienti ($\overline{P_{app}}$) so pri zamrzovanju s tekočim dušikom v povprečju dvakrat večji, kot pri zamrzovanju pri -20°C . Za večjo težo rezultatov bi bilo smiselno opraviti več poskusov za primerjavo vpliva zamrzovanja na permeabilnost zamrzovanju pri -20°C in zamrzovanju s tekočim dušikom.

Ugotovili smo še, da je uporaba metilparabena kot modelna spojina neustrezna, ker se večina te spojine pri prehodu skozi tkivo pretvori v PHBA ter da se poskus z našim naborom modelnih spojin lahko namesto 24 ur izvaja le 11 ur. S tem bi tudi zagotovili boljši nadzor nad celotnim sistemom.

6. LITERATURA

1. Gosenca M, Gašperlin M; Membrane za *in vitro* testiranje dermalne absorpcije. Farm Vestn. 2009: 8-13.
2. Lee S H, Jeong S K, Ahn S K; An Update of the Defensive Barrier Function of Skin. Yonsei Med J. 2006: 293-306.
3. Lademann J, Jacobi U, Surber C, Weigmann H-J, Fluhr J. W; Biology of Stratum Corneum: Tape Stripping and Protein Quantification. The tape stripping procedure-evaluation of some critical parameters. Eur J Pharm Biopharm 2009. 72(2): 317–323
4. The SCCS's notes of guidance for the testing of cosmetic substances and their safety evaluation 8th Revision. European commission. 11.12.2012. Dostopno na spletnem naslovu https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_006.pdf. Dostop: 20.7.2017
5. Scheuplein R J; Permeability of the skin: A review of major concepts and some new developments. Department of Dermatology. Harvard Medical School at the Massachusetts General Hospital. Boston. 672-676.
6. Humbert P, Fanian F, Maibach H; Non-invasive Investigations. Measuring the Skin. Springer-Verlag. Berlin. 2004: 33-39.
7. Gray V, Kelly G, Min Xia, Butler C, Thomas S, Mayock S. The Science of USP 1 and 2 Dissolution: Present Challenges and Future Relevance. Pharm Res. 2009. 26(6): 1289-1302.
8. OECD guidance document for the conduct of skin absorption studies, OECD series on testing and assessment. 5.3.2004, Number 28. Dostopno na spletnem naslovu [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=en/jm/mono\(2004\)2](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=en/jm/mono(2004)2). Dostop: 8.8.2017
9. Guth K, Schäfer-Korting M, Fabian E, Landsiedel R; Suitability of skin integrity tests for dermal absorption studies in vitro. Toxicol In Vitro. 2015. 29(1): 113–123
10. Netzlaff F, Lehr C M, Wertz P W, Schaefer U F; The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. Eur J Pharm Biopharm. Julij 2005. 60(2):167-78.
11. www.episkin.com. Dostop:3.5.2017
12. Barbero A M, Frasch H F; Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. Toxicol In Vitro 2009; 23: 1–13.
13. Nielsen J B, Plasencia I, Sørensen J A, Bagatolli L A; Storage conditions of skin affect tissue structure and subsequent in vitro percutaneous penetration. Skin Pharmacol Physiol. 2011; 24(2): 93-102.
14. Bakhach J; The cryopreservation of composite tissues. Organogenesis. 2009; 5(3): 119–126.
15. Kočevar Glavač N, Janeš D; Sodobna kozmetika: Sestavine naravnega izvora, 1. izdaja. Velenje. 2015. 105-108.

16. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Dostop 13.6.2017
17. Otberg N, Teichmann A; Follicular Penetration of Topically Applied Caffeine via a Shampoo Formulation. *Skin Pharmacol Physiol* 2007; 20: 195–198.
18. Schoning R, Schmuck R; Analytical determination and relevant metabolite residues by LC MS/MS. *Bulletin of Insectology* 2003; 56: 41-50.
19. Sintov A C, Botner S; Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: Influence of skin storage conditions on the in vitro permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems. *Int. J. Pharm.* 2006; 311: 55–62.
20. <https://www.drugs.com/diclofenac.html> Dostop: 5.7.2017
21. Barbas C, Ruperez J; Separation of Paraben Preservatives by Reversed-Phase HPLC. Agilent technologies. ZDA, 2005. Dostopno na spletnem naslovu: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-3635EN.pdf>. Dostop: 28.8.2017
22. <http://wisderm.com/ingredients/Methylparaben>. Dostop: 27.7.2017
23. <http://chemicalland21.com/lifescience/phar/p-HYDROXYBENZOIC%20ACID.htm>. Dostop: 5.7.2017
24. Kudlacek P, Anderson R; Human Skin and Platelet Minoxidil Sulfotransferase Activities: Biochemical Properties, Correlations and Contribution of Thermolabile Phenol Sufhoftansferase. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995; 273: 582-590.
25. Ilaš J, Žakelj S; Instrumentalna analiza v kozmetiki: Vaje in seminarji. Fakulteta za farmacijo. Ljubljana. 2013: 37-38.
26. Rozina E; Sočasno določanje permeabilnosti različnih spojin skozi kožo prašičjega uhlja iz vodne in oljne donorske raztopine. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo. Ljubljana, 2017.
27. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Dostop: 21.7.2017
28. Gačnik A; Odvisnost permeabilnostnih lastnosti kože prašiča v Franzovih difuzijskih celicah od časa shranjevanja kože. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo. Ljubljana, 2016.
29. Jakasa I, Kezic S; Evaluation of in-vivo animal and in-vitro models for prediction of dermal absorption in man. *Hum Exp Toxicol.* 2008. 27(4): 281-288.
30. Sodobni materiali: Difuzija v trdnem, univerza v Novi Gorici. Dostopno na spletni strani http://www.ung.si/~mvalant/downloadable/Sodobni_materiali_II.pdf. Dostop: 12.8.2017
31. Kristl A, Žakelj S; Bioelectrics of Epithelia (Ussing chamber); interno gradivo za delavnico v sklopu “6th international intensive course and workshop on cell culture and in-vitro models for drug absorption and delivery”, Saarbruecken 2006.
32. OECD guidance notes on dermal absorption draft. 22.10. 2010. Dostopno na spletnem naslovu <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/46257610.pdf>. Dostop 7.7.2017

33. Sintov A, Botner S; Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: Influence of skin storage conditions on the in vitro permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems. *Int J of Pharm.* 2006. 311(1-2); 55–62.
34. Pažourekova S, Hojerova J, Klimova Z, Lucova M; Dermal absorption and hydrolysis od methylparaben in different vehicles through intact and damaged skin: Using a pig-ear model in vitro. *Food Chem Toxicol.* September 2013. 59: 754-765.
35. http://www.mizs.gov.si/fileadmin/mizs.gov.si/pageuploads/podrocje/ss/Gradiva_ESS/Biot_ehniska_podrocja_sole_za_zivljenje_in_razvoj/BT_PODROCJA_116ZIVILSTVO_Priprava_Subic.pdf. Dostop: 14.8.2017
36. <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/freezing-biological-samples/> Dostop: 24.8.2017

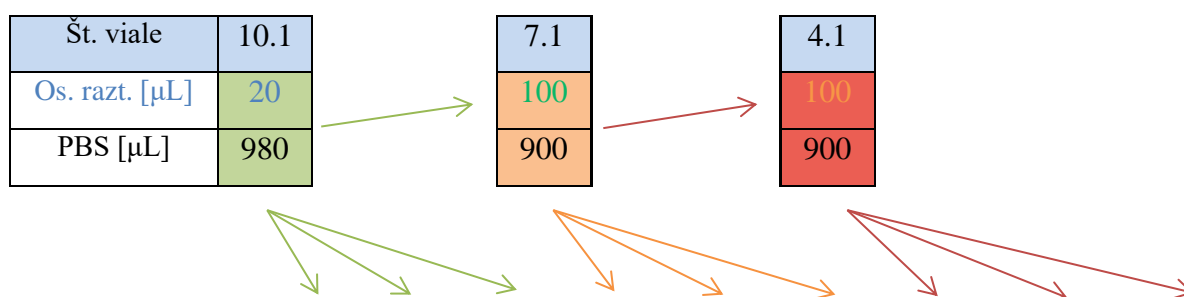
7. PRILOGE

7.1. Podatki o Franzovih celicah

Št. FC	1	2	3	4	5	6	7	8
V akc. dela (mL)	7,9	7,1	6	8,45	8,5	8,5	7,45	7,3
Površina kože (cm ²)	1,13	1,13	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95

Št. FC	9	10	11	12	13	14	15	16
V akc. dela (mL)	7,4	7,6	7,5	7,5	7	7,5	7,5	7,5
Površina kože (cm ²)	0,95	0,95	0,785	0,95	0,95	0,95	0,95	0,785

7.2. Postopek redčenja vzorcev za izdelavo umeritvene premice



Št. viala	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
Os. razt. [µL]	20	500	200	100	500	200	100	500	200	100
PBS [µL]	980	500	800	900	500	800	900	500	800	900
Redčenje	50x	2x	5x	10x	2x	5x	10x	2x	5x	10x
FR	50x	100x	250x	500x	1000x	2500x	5000x	10000x	25000x	50000x

7.3. Podatki za izračun permeabilnostnih koeficientov za kofein

Kofein	1	2	3	4	5	6	7	8
kd [mol/h]	2,41E-08	1,57E-08	1,68E-08	4,76E-08	5,69E-08	9,67E-08	1,09E-07	1,00E-07
R ²	0,987	0,992	0,968	0,997	0,992	0,995	0,997	0,995
J [nmol/(h*cm ²)]	21,29	13,93	17,68	50,15	59,95	101,86	114,81	105,42

Kofein	9	10	11	12	13	14	15	16
kd [mol/h]	4,5E-08	3,9E-08	3,65E-08	7,41E-08	5,67E-08	7,52E-08	9,46E-08	5,66E-08
R ²	0,999	0,993	0,983	0,995	0,997	0,997	0,998	0,995
J [nmol/(h*cm ²)]	47,40	41,06	46,44	78,00	59,73	79,22	99,85	72,20

7.4. Podatki za izračun permeabilnostnih koeficientov za minoksidil

Minoksidil	1	2	3	4	5	6	7	8
kd [mol/h]	1,49E-09	7,05E-10	7,86E-10	4,33E-09	3,20E-09	6,05E-09	5,88E-09	1,18E-08
R ²	0,989	0,991	0,941	0,990	0,986	0,986	0,993	0,996
J [nmol/(h*cm ²)]	1,320	0,624	0,828	4,559	3,372	6,371	6,194	12,440

Minoksidil	9	10	11	12	13	14	15	16
kd [mol/h]	4,51E-09	4,16E-09	3,38E-09	4,67E-09	4,95E-09	8,76E-09	1,09E-08	6,19E-09
R ²	0,998	0,992	0,987	0,995	0,990	0,994	0,990	0,991
J [nmol/(h*cm ²)]	4,746	4,375	4,301	4,917	5,212	9,223	11,491	7,881

7.5. Podatki za izračun permeabilnostnih koeficientov za imidaklopid

Imidaklopid	1	2	3	4	5	6	7	8
kd [mol/h]	4,49E-10	2,67E-10	3,17E-10	1,24E-09	1,5E-09	2,62E-09	2,5E-09	3,06E-09
R ²	0,988	0,999	0,978	0,993	0,990	0,994	0,992	0,995
J [nmol/(h*cm ²)]	0,397	0,236	0,334	1,300	1,583	2,762	2,629	3,217

Imidaklopid	9	10	11	12	13	14	15	16
kd [mol/h]	1,26E-09	1,15E-09	8,67E-10	1,99E-09	1,65E-09	2,18E-09	2,85E-09	1,57E-09
R ²	0,999	0,994	0,990	0,990	0,995	0,995	0,994	0,995
J [nmol/(h*cm ²)]	1,322	1,214	1,105	2,097	1,739	2,296	3,004	2,002

7.6. Podatki za izračun permeabilnostnih koeficientov za metilparaben

Metilparaben	1	2	3	4	5	6	7	8
kd [mol/h]	6,87E-08	5,05E-08	4,13E-09	7,6E-08	-1,1E-10	-7,5E-12	-7,2E-11	-1,1E-10
R ²	0,987	0,999	0,988	0,999	-0,591	-0,333	-0,480	-0,333
J [nmol/(h*cm ²)]	60,87	44,68	4,35	80,02	-0,12	-0,01	-0,08	-0,12

Metilparaben	9	10	11	12	13	14	15	16
kd [mol/h]	4,72E-08	-2,6E-10	0	0	3,44E-08	6,28E-08	9,24E-08	1,01E-07
R ²	0,973	-0,692	0	0	0,922	0,953	0,990	0,983
J [nmol/(h*cm ²)]	49,76	-0,27	0	0	36,19	66,08	97,28	128,09

7.7. Podatki za izračun permeabilnostnih koeficientov za diklofenak

Diklofenak	1	2	3	4	5	6	7	8
kd [mol/h]	1,38E-08	6,93E-09	4,11E-09	3,65E-08	4,85E-08	8,35E-08	8,51E-08	7,54E-08
R ²	0,987	0,997	0,931	0,991	0,993	0,994	0,995	0,998
J [nmol/(h*cm ²)]	12,222	6,133	4,323	38,378	51,052	87,898	89,559	79,366

Diklofenak	9	10	11	12	13	14	15	16
kd [mol/h]	3,24E-08	3,43E-08	1,19E-08	4,26E-08	4,11E-08	4,95E-08	6,92E-08	5,37E-08
R ²	0,992	0,993	0,990	0,992	0,995	0,993	0,991	0,997
J [nmol/(h*cm ²)]	34,087	36,138	15,148	44,867	43,306	52,067	72,792	68,406