

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA GAČNIK

**ODVISNOST PERMEABILNOSTNIH LASTNOSTI KOŽE PRAŠIČA
V FRANZOVIH CELICAH OD ČASA SHRANJEVANJA KOŽE**

**INFLUENCE OF PORCINE SKIN STORAGE TIME ON ITS
PERMEABILITY PROPERTIES IN FRANZ DIFFUSION CHAMBERS**

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2016

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

ZAHVALA

Diplomsko delo posvečam svojemu očetu Alešu Gačniku.

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Simonu Žaklju za strokovno pomoč, usmeritve in nasvete tekom laboratorijskega dela ter tehnični sodelavki dipl. ing. kem. Nevenki Lilik za nenehno razpoložljivost, nasvete in pomoč.

Zahvaljujem se tudi mami Renati, Bojanu, Matevžu, Aji in ostalim prijateljem, ki mi stojijo ob strani, me spodbujajo in motivirajo za nadaljnje delo.

IZJAVA

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

Ana Gačnik

Ljubljana, september 2016

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Aleš Obreza, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD	1
1.1 Dermalna absorpcija	1
1.2 Primerjava prašičje in človeške kože.....	2
1.3 Zamrznitev tkiva	3
1.4 Franzove difuzijske celice.....	4
1.4.1 Sink pogoji.....	5
1.5 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC).....	5
1.6 Modelne spojine – označevalci permeabilnosti	6
2 NAMEN DELA.....	8
3 MATERIALI IN METODE	9
3.1 Materiali.....	10
3.2 Aparature in pribor.....	10
3.3 Raztopine	11
3.3.1 Raztopine za razvoj analizne metode	11
3.3.2 Raztopine za merjenje permeabilnosti.....	11
3.4 Razvoj analizne metode	12
3.5 Potek poskusa	12
3.5.1 Priprava raztopin.....	12
3.5.2 Priprava tkiva.....	13
3.5.3 Priprava Franzovih celic za poskus	13
3.5.4 Izvedba poskusa.....	14
3.6 Permeabilnost.....	15
3.6.1 Izračun navideznega permeabilnostnega koeficienta	15
3.7 Statistična obdelava podatkov	18
4 REZULTATI.....	19

4.1	Topnost	19
4.1.1	Kofein	19
4.1.2	Imidaklopid	19
4.1.3	Oksibenzon	19
4.1.4	Gentamicinijev sulfat.....	20
4.1.5	Homosalat.....	20
4.2	Analizna metoda	20
4.2.1	Vzorčenje in analiza vzorcev.....	23
4.3	Permeabilnost.....	23
4.3.1	Določanje permeabilnostnih koeficientov kofeina skozi kožo.....	24
4.3.2	Določanje permeabilnostnih koeficientov imidakloprida skozi kožo	26
4.3.3	Primerjava vrednosti Papp kofeina in imidakloprida	28
4.3.4	Oksibenzon	29
5	RAZPRAVA	30
5.1	Primerjava permeabilnosti različnih tkiv za kofein ter imidaklopid	30
5.2	Oksibenzon	33
6	SKLEP.....	34
7	LITERATURA.....	35
8	Priloge	37

POVZETEK

Koža, kot največji organ v telesu, predstavlja s svojo raznoliko stukturiranostjo učinkovito barierno tkivo, ki omejuje proces penetracije spojin. Na optimalno delovanje koherentne in kompaktne membrane kot je rožena plast kože v največji meri vpliva njena integriteta(1). Slednja je nujna za izvedbo ponovljivih testov dermalne absorpcije, ki dajejo primerljive rezultate. V okviru študij dermalne absorpcije se z namenom definiranja toksičnih profilov, permeacijskih koeficientov itd. najpogosteje uporabljajo živalske kože, ki se razlikujejo v izvoru kot tudi morfološko. Smernice združenj kot so COLIPA sicer dajejo navodila za izvedbo takšnih študij, vendar ostajajo določene zahteve neopredeljene. Ena izmed takšnih zahtev je shranjevanje kože pred izvedbo poskusa dermalne absorpcije, ki naj bi po besedah nekaterih avtorjev pomembno vplivala na integriteto kože ter nadaljnje rezultate.

Cilj diplomske naloge je bil raziskati permeabilnostne lastnosti kože prašičjih ušes, ki je bila podvržena časovno različnim pogojem shranjevanja. Iz nabora šestih spojin smo izbrali tri (kofein, imidakloprid ter oksibenzon), s pomočjo katerih smo določili parametre fluksa in navideznega permeabilnostnega koeficienta skozi testirane kože. Predpostavili smo, da zamrzovanje vpliva na integriteto ter lipidno sestavo rožene plasti. Takšne spremembe notranje strukture bi lahko spremenile stopnjo penetracije preiskovanih spojin in jo v primeru zamrzovanja tkiva pospešile.

V raziskavi smo uporabili Franzove difuzijske celice v kombinaciji s tremi tkivi: prvo tkivo smo pred izvedbo poskusa v zamrzovalniku shranjevali 36 mesecev, drugo smo zamrznjeno shranjevali 1 mesec, tretje tkivo pa smo uporabili sveže. Za akceptorski medij smo izbrali fosfatni pufer. Vzorčili smo v enajstih časovnih točkah tekom 24h in pridobljene vzorce analizirali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti in jih nato med seboj primerjali.

Ugotovili smo, da dolgotrajnejše shranjevanje zamrznjene kože v primerjavi s svežo kožo izkazuje statistično značilne razlike v vrednostih navideznega permeabilnostnega koeficienta, medtem ko razlika med svežo ter nekaj tednov zamrznjeno kožo ni značilna. Iz tega sklepamo, da bi bilo potrebno pogoje ter čas shranjevanja kože standardizirati, uporabo dolgotrajno zamrznjene kože pa omejiti.

SEZNAM OKRAJŠAV

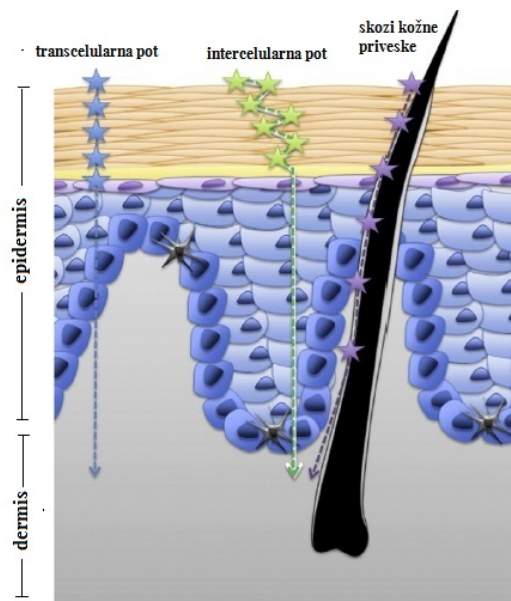
- COLIPA = Združenje evropskih proizvajalcev kozmetičnih izdelkov in izdelkov za osebno nego
- ECETOC = Evropski center za ekotoksikologijo in toksikologijo kemikalij
- FD-C/ FC = Franzova difuzijska celica
- HPLC = tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
- OECD = Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj
- PBS = fosfatni pufer
- SC = rožena plast
- SCCP = Znanstveni komite za potrošniške produkte
- TEWL = transepidermalna izguba vode

1 UVOD

1.1 Dermalna absorpcija

Koža, kot največji organ našega telesa, je morfološko raznolika struktura. Ključna naloga tega večplastnega organa je zaščita telesa pred okoljem, med drugim tako predstavlja učinkovito permeabilnostno oviro za eksogene molekule (2). Koža je v osnovi razdeljena na tri plasti: na epidermis, dermis in podkožje. Primarno zaščito koži nudi zgornja - rožena plast ali *stratum corneum* (SC). SC sestavljajo diferencirane celice brez jedr - korneociti, ki so zasidrani v lipidno ogrodje in predstavljajo izrazito hidrofobno bariero. Ta t.i. neživi del kože omejuje perkutano penetracijo molekul (2).

Vrednosti permeacijskih koeficientov skozi kožo so odvisne od načina absorpcije. Ločimo med tremi mehanizmi transdermalnega prehajanja: a) skozi intercelularno ogrodje v SC, b) skozi kožne priveske (dlake, lojnice, znojnice) c) transcelularno. Razlike med koeficienti transdermalne permeacije molekul so posledica izbire dermalnega modela, debeline kože in sestave intercelularnih lipidov kot tudi številčnosti kožnih izvodil (2).



Slika 1: Mehanizmi transdermalnega prehajanja skozi kožo

Oceno transdermalne absorpcije testirane spojine najbolj točno podamo z uporabo človeške kože kot membrane. Največkrat gre za kožo, ki ostane kot odpadni produkt kozmetičnih operacij in amputacij ter se uporabi za *in vitro* testiranje perkutane

penetracije. Vendar je dostopnost takšne kože omejena, zato je danes v uporabi vedno več alternativ: živalska koža, umetne membrane, rekonstituirani kožni modeli (2).

Cilj *in vitro* eksperimentov transdermalne dostave spojin je kvantificirati penetracijo molekul skozi kožo z uporabo različnih membran. Običajno uporabljamo raznovrstne difuzijske celice, hkrati pa sledimo že uveljavljenim smernicam, ki zajemajo priporočila regulatornih organov. Najpomembnejše smernice zajemajo: *Smernico št. 428 o izvajanju študij absorpcije na koži* (OECD - Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj), *Metode za ocenjevanje perkutane penetracije* (ECETOC - Evropski center za ekotoksikologijo in toksikologijo kemikalij), *Smernice za perkutano penetracijo /absorpcijo* (COLIPA - Združenje evropskih proizvajalcev kozmetičnih izdelkov in izdelkov za osebno nego). Ne glede na priporočila smernic pa je pri izvedbi eksperimenta pomembno vplivajo: tehnike in metode, ki se jih poslužujemo, vir membran, integriteta kože, priprava kože, sestava receptorskega medija in končno tudi način izračuna koeficientov. Vsi omenjeni parametri lahko tako ključno vplivajo na končni rezultat (2).

Razvoj metode, ki bi predstavljala globalni test kakovosti prehajanja različnih spojin je izrednega pomena. Objavljene smernice dajejo navodila za izvajanje poskusov, vendar so hkrati presplošne, kar se kaže v: pomanjkanju standardizacije, nedoločenih kriterijih izvedbe poizkusa, neustreznemu razumevanju osnovnih zakonov absorpcije in njenih aplikacij ... (2)

1.2 Primerjava prašičje in človeške kože

Za *in vitro* poskuse, ki jih izvajamo na živalski koži, pogosto uporabljamo prašičjo kožo (3). Kljub določenim pomanjkljivostim, ki še niso bile dodobra raziskane (npr. shranjevanje kože), velja prašičja koža za eno najpogosteje izbranih alternativ človeški koži, ki se uporablja v *in vitro* študijah in ocenah absorpcije ter perkutane permeacije. V zgodnjih 60tih je Montagna izpostavil podobnost prašičje ter človeške kože. Ugotovil je, da je obema skupno: podobna količina dlačnih izvodil, povrhnjica z dobro diferencirano strukturo, dermis z razvitim papilarnim slojem ter velik delež elastičnih vlaken. Vendarle so prisotne tudi razlike, in sicer v prekrvavljenosti (pri človeku je le ta dobra, pri prašiču slabša) ter v žlezah znojnicah. Človeško kožo v primerjavi s prašičjo prekriva večina ekkrinih žlez znojnic, medtem ko so pri prašiču pogostejše apokrine žleze znojnice (4).

Raziskave histološke podobnosti človeškega ter prašičjega epidermisa so prav tako pokazale pozitivno korelacijo (4). Debelini epidermisa ter dermisa sta zelo podobni (5). Ugotovili so podobnosti v procesu epidermopoeze (obnavljanja tkiva) ter pri obeh povrhnjicah zasledili značilne proteine - keratine. Lipidna sestava prašičjega epidermisa glede na ostale alternative: miši, krave, podgane ... izkazuje največjo podobnost s človeškim epidermisom (3).

1.3 Zamrznitev tkiva

Smernice OECD (2004) za *in vitro* testiranja absorpcije učinkovin skozi kožo predvidevajo uporabo tako sveže metabolično aktivne kože, kot tudi nežive, ustrezno hranjene kože. Preizkusi difuzije na neživi koži dajejo informacije o difuziji skozi kožo, s testi na metabolično aktivni koži pa pridobimo tudi informacije o metabolizmu spojin, ki se na kožo aplicirajo (6).

Raziskovalci (7) so s študijami ugotavljali korelacijo med shranjevanjem kože in njeno permeabilnostjo. Veljalo naj bi, da s procesom zamrzovanja tkiva le tega fizikalno in kemijsko spremenimo, kar se kaže v spremenjeni strukturi in integriteti tkiva. Ker SC pri živem kožnem tkivu predstavlja oviro za difuzijo spojin, raziskovalci predvidevajo, da se njegova barierna učinkovitost z zamrzovanjem spremeni. Zamrzovanje tkiva vodi v kristalizacijo molekul vode v plasteh epidermisa in dermisa, ter v reorganizacijo lipidov. Posledično se trajno spremeni struktura keratinocitov ter intracelularnega lipidnega matriksa SC, s čimer se poveča permeabilnost kože. Raziskovalci so dokazali, da se permeabilnost spremeni različnim modelnim spojinam (hidrofilnim in lipofilnim), zato sklepajo na spremembo poti difuzije skozi zamrznjeno kožo tako za lipidne kot polarne spojine (7).

Kljub raziskavam je področje vpliva shranjevanja in zamrzovanja kože na permeabilnost še vedno kontradiktorno in ne dovolj raziskano. Študije so bile izvedene na tkivih, zamrznjenih pod različnimi pogoji, kar posledično vpliva na rezultate. Kožo v študiji (8) so pred zamrzovanjem več ur hidratirali v puferski raztopini, s čimer se je kristalizacija molekul vode v tkivu znatno povečala in vplivala na navidezno višjo permeabilnost tkiva. Nedavno izvedena študija (8) pa primerja permeabilnost SC za kofein med tkivom, ki je bilo zamrznjeno (3 tedne, -20 °C) ter svežim tkivom. Ugotovili so, da med njima ni prišlo do razlik permeabilnostnih koeficientov. Nasprotno pa se je

zamrzovanje enake kože pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ izkazalo kot dovolj stresen dejavnik, ki je vplival na integriteto kože in njeno permeabilnost (8).

1.4 Franzove difuzijske celice

Poskusi z difuzijskimi celicami so ena izmed najpogosteje uporabljenih metod za določanje permeabilnosti modelnih spojin skozi kožo. Franz je leta 1975 razvil model vertikalne difuzijske celice t.i. *Franzove difuzijske celice*, za katero so določili dobro korelacijo med *in vivo* ter *in vitro* rezultati za organske spojine. Raziskave so pokazale ustreznost metode tudi za preučevanje poltrdnih formulacij, kot tudi idealno za simulacijo *in vivo* pogojev (1).

Franzova difuzijska celica je steklen, ročno izdelan pripomoček, ki ga sestavljata 2 dela: zgornji donorski del ter spodnji akceptorski/ receptorski del. Membrano (človeška koža, živalska koža, sintezni kožni modeli ...) umestimo med oba dela tako, da je SC obrnjen v donorski del in je v stiku s preučevano formulacijo. Spodnji akceptorski del napolnimo z izotonično raztopino, da zagotovimo sink pogoje. V času vzorčenja zagotavljamo konstantno temperaturo akceptorskega medija tako, da Franzove celice hranimo v vodnih kopelih z uravnavano temperaturo, hkrati pa uravnavamo tudi hitrost mešanja receptorskega medija z magnetnim mešalom (8).

Prehajanje modelne spojine skozi membrano določamo preko koncentracije le te v akceptorskem delu tako, da v časovnih točkah od začetka nanosa vzorčimo akceptorski medij ter ga analiziramo. Določamo permeabilnostne koeficiente modelnih spojin s pomočjo validiranih analiznih metod, ki vključujejo spektroskopske in kromatografske tehnike (8).

Kljub enostavnosti metode Franzovih difuzijskih celic, moramo za pridobitev ponovljivih, reprezentativnih rezultatov zagotavljati ustrezne pogoje opravljanja preizkusa. Pomembni parametri, ki vplivajo na rezultate so: mešanje in temperatura receptorskega medija ter zagotovljeni sink pogoji (1).



Slika 2: Primer Franzove celice

1.4.1 Sink pogoji

Raziskovalci, ki izvajajo teste na Franzovih difuzijskih celicah v splošnem predvidevajo, da difuzija spojin poteka pod popolnimi »sink pogoji«. Sink pogoji so zagotovljeni, ko je koncentracija preiskovane spojine v akceptorskem delu ničelna oz. je volumen medija vsaj trikrat večji od volumna, ki bi bil potreben, da se tvori nasičena raztopina substance (9,10). Ker doseganje ničelne koncentracije v statičnih difuzijskih celicah ni popolnoma mogoče, velja splošni dogovor za *in vitro* eksperimente: sink pogoji so ustvarjeni, ko v akceptorskem delu vrednosti preiskovane spojine ne presežejo 10 % meje njene nasičene topnosti. Sink pogoje lahko uravnavamo z različnimi parametri: z zmanjševanjem koncentracije modelne spojine v donorskem delu, z uporabo manj permeabilne membrane ali z izbiro volumsko večjega akceptorskega dela (9).

1.5 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

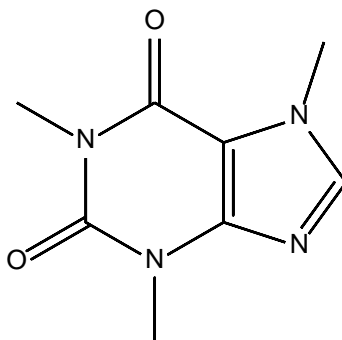
HPLC (*ang. High Performance Liquid Chromatography*) oz. tekočinska kromatografija visoke ločljivosti je analizna metoda, ki je osnovana na kromatografiji in v splošnem zajema ločevanje spojin kot posledico različnega zadrževanja v stacionarni fazi. Vzorec, namenjen analizi potuje z mobilno fazo skozi kolono, v kateri je stacionarna faza. Glede na fizikalno kemijske lastnosti preiskovane spojine in pogoje analize se ta v koloni zadrži določen čas in se iz nje eluira ob zanjo značilnem retencijskem času. Namen HPLC analize je fizično ločiti posamezne komponente vzorca, ki jih nadalje identificiramo in kvantificiramo. Omogoča nam pridobivanje kvalitativnih ter kvantitativnih podatkov o injiciranem vzorcu (11).

1.6 Modelne spojine – označevalci permeabilnosti

Kofein

Kofein je metilksantinski alkaloid, ki ga lahko najdemo v semenih, plodovih in listih številnih rastlin s poreklom iz južne Amerike in vzhodne Azije (12). Kofein pogosto zasledimo v izdelkih za kozmetične in negovalne namene, zaradi njegove visoke biološke aktivnosti in zmožnosti penetracije skozi kožno bariero. Omenjeni alkaloid pogosto uporabljamo kot hidrofilno modelno substanco za ocenjevanje permeabilnosti membran z uporabo Franzovih difuzijskih celic (13). S strani OECD je kofein priznana in priporočena testna substanca za določanje faktorja nevarnosti (risk assessment), saj je z njo opravljenih že veliko *in vivo* kot *in vitro* študij (13).

Glavna pot permeacije skozi kožo poteka čez lipidni matriks zunanje plasti SC. Kljub pogosti izbiri kofeina za modelno substanco, le ta nima lastnosti idealnega penetranta. Njegova log P vrednost znaša -0.07 (14). V nevodnih topilih izkazuje nenavadno obnašanje, saj je v kloroformu najboljše topen, medtem ko je topnost v etanolu slabša kot v vodnem mediju (15). V vodnih medijih tvori kofein agregate. Za zadovoljivo dostavo spojine na mesto delovanja so raziskovalci preučevali vgradnjo in izdelavo raznolikih formulacij (mikroemulzije, emulzije, nanodelci ...) ter ugotovili, da so mikroemulzije in multiple emulzije najučinkovitejše (14).

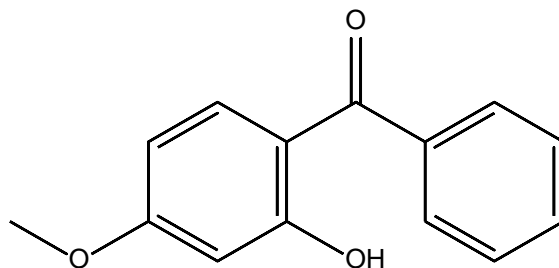


Slika 3: Struktura molekule kofeina (ChemDrawProfessional)

Oksibenzon

Oksibenzon (2-hidroksi-4-metoksifenil-fenilmetanon) je eden izmed pogosto uporabljenih UVA/UVB filtrov in ga zasledimo v kozmetičnih pripravkih za zaščito pred soncem (16). Gre za organsko spojino, pridobljeno iz benzofenona. Pri sobni temperaturi tvori brezbarvne kristale, ki so topni v večini organskih topil (16). V idealnih pogojih uporabe modelna spojina kot je oksibenzon le v minimalni meri prehaja skozi kožo, prav tako je prehod v sistemski krvni obtok iz dermalnih pripravkov nizek. Zmožnost permeacije skozi kožo in doseganje krvnega obtoka pa sta pogojena z lastnostmi vehikla. Stopnja permeacije je odvisna od topnosti v dostavnem sistemu, načina priprave raztopine in dispergiranja v vehikel (16).

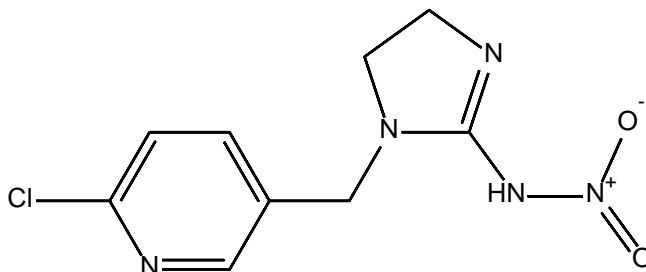
Avtorji Znanstvenega komiteja za potrošniške produkte (SCCP) so iz zbranih podatkov številnih študij o oksibenzonu predpostavili, da gre za spojino z nizko biološko uporabnostjo (9). Biološka uporabnost je stopnja absorpcije učinkovine v živi organizem, pri čemer postane dostopna organizmu za uporabo (17). Opravili so *in vitro* študijo dermalne absorpcije na koži prašičjega ušesa s pomočjo Franzovih difuzijskih celic. Ugotovili so, da skozi kožo po 24 urah poskusa prehaja približno 3-4 % oksibenzona. Permeacija je odvisna od koncentracije oksibenzona v donorski formulaciji (9).



Slika 4: Struktura molekule oksibenzona (ChemDraw Professional)

Imidakloprid

Imidakloprid je kemijska substanca v obliki brezbarvnih kristalov, ki je dobro topna v vodi. Uporablja se predvsem v poljedelstvu, medtem ko je v farmacevtskih izdelkih le redek. Gre za insekticid, ki insektom onemogoča uničenje kmetijskih pridelkov. V farmaciji se uporablja le kot antiparazitno sredstvo v zdravljenju ektoparazitnih okužb (18).



Slika 5: Struktura molekule oksibenzona imidakloprida (ChemDrawProfessional)

2 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je oceniti v kolikšni meri vpliva shranjevanje kože, ki jo nato uporabimo v eksperimentu, na njeno permeabilnost. *In vitro* testiranja dermalne absorpcije na Franzovih celicah pogosto zasledimo kot metodo določanja permeabilnosti v raziskovalnih člankih z namenom določanja biokemijskih interakcij učinkovin s kožo, parametrov toksičnosti ... Smernice, kot so OECD 2004 sicer dajejo navodila za izvajanje takšnih eksperimentov, vendar ne obravnavajo pogojev shranjevanja kože, ki se uporablja za testiranja s Franzovimi difuzijskimi celicami. Ker predvidevamo, da shranjevanje kože (ali je bila koža pred poskusom sveža ali zamrznjena–ter koliko časa) vpliva na permeabilnostne koeficiente, bomo merili razliko v permeabilnosti različno shranjenih vzorcev kož.

Za izvedbo meritev bomo potrebovali tri ustrezne modelne spojine. Za izbor le teh bomo pripravili raztopine kofeina, imidakloprida, diklofenaka, gentamicinijevega sulfata, homosalata ter oksibenzona. Začeli bomo s preiskovanjem topnosti v različnih topilih oz. kombinaciji topil ter določili optimalne pogoje za pripravo modelnih spojin. V nadaljevanju bomo za izbrano trojico spojin razvili HPLC analizo metodo, primerno za kasnejšo analizo vzorcev pridobljenih v poskusih s Franzovimi difuzijskimi celicami.

Za osnovni kožni model bomo vzeli kožo prašičjih ušes, ki je bila izpostavljena različnim pogojem shranjevanja. Dva eksperimenta bomo izvedli na predhodno zamrznjeni koži (čas shranjevanja: 1 mesec in 36 mesecev), enega pa na sveži koži. Za vsako spojino in preizkušano tkivo bomo uporabili več Franzovih celic ter tako pridobili večji nabor podatkov za nadaljnje določanje permeabilnostnih koeficientov posamezne spojine, ki jih bomo nato kritično vrednotili. Na osnovi rezultatov bomo lahko bolje ocenili, v kolikšni meri shranjevanje kože vpliva na permeabilnostne koeficiente v našem laboratoriju in kolikšna je potreba po poenotenju pogojev, v katerih se shranjuje prašičja koža, z namenom ponovljivosti in standardizacije *in vitro* testiranj.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

MODELNE SPOJINE ZA MERJENJE PERMEABILNOSTI

- kofein: Fluka Chemie GmbH, Buchs, Švica
- diklofenak: Sigma, Nemčija
- imidaklopid, Sigma Aldrich, Nemčija
- oksibenzon, Sigma Aldrich, Nemčija
- gentamicinijev sulfat, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, ZDA
- homosalat, Sigma Aldrich, Nemčija

SUBSTANCE, ZA PRIPRAVO MEDIJEV IN PUFROV

- ultra prečiščena voda za HPLC (mobilne faze)
- prečiščena voda
- fosforjeva(V) kislina, Merck KGaA, Nemčija
- amoniak, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, ZDA
- pufer (pH=3) za umerjanje pH-metra, PanReac, Španija
- Miglyol 812, Sasol Germany GmbH, Hamburg, Nemčija
- acetonitril (ACN), Sigma-Aldrich, Nemčija
- etil acetat, Carlo Erba, Francija
- dinatrijev hidrogen fosfat, Merck KGaA, Nemčija
- kalijev dihidrogen fosfat, Merck KGaA, Nemčija
- natrijev klorid, Merck KGaA, Nemčija
- klorovodikova kislina(HCl) 1M, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija

3.2 Aparature in pribor

- Q-pod: MilliQ, Merck KGaA, Nemčija
- Agilent Chemstation, Agilent Technologies, ZDA
- Agilent 1100 series, , Agilent Technologies, ZDA
- Tehnica XP 205, Mettler Toledo, Švica
- pH 330i, pH meter, WTW, Nemčija
- Sonis 4, Iskra pio d.o.o., Slovenija
- Avtomatska pipeta EPPENDORF Research 1000
- Mikrotitrna ploščica z 96 vdolbinicami Agilent Technologies, ZDA
- Magnetno mešalo IKA RCT basic

- Magnetno mešalo IKA RET control/t
- ZORBAX 3,5 μ m, Eclipse, XDB, C18, 4,6 \times 75 mm

3.3 Raztopine

3.3.1 Raztopine za razvoj analizne metode

- Amonijev fosfat: Steklenico iz Duran stekla smo napolnili z 1 L ultračiste vode za HPLC. Postavili smo jo na magnetno mešalo in z magnetom omogočili enakomerno mešanje in konstanten pH. Dodali smo 2 \times 2,5 mL fosforjevo (V) kislino ter z umerjenim pH metrom smo izmerili pH in raztopino ustrezno naalkalili (z vodno raztopino amoniaka) oz. nakisali (1M HCl) do pH=3.
- Ultračista voda: Kot mobilno fazo smo uporabljali tudi samo ultračisto vodo, ki smo jo pridobili iz prečiščevalne aparature MilliQ.

Osnovne raztopine za razvoj analizne metode

- 20 mM raztopina kofeina, v prečiščeni vodi
- 2 mM raztopina imidakloprida, v prečiščeni vodi
- 20 mM raztopina diklofenaka, v prečiščeni vodi
- 20 mM raztopina oksibenzona, v abs. EtOH
- 20 mM raztopina gentamicinijevega sulfata, v prečiščeni vodi
- 20 mM raztopina homosalata, v abs. EtOH

3.3.2 Raztopine za merjenje permeabilnosti

- PBS (fosfatni pufer)

Sestava: 1,190 g Na₂HPO₄ \times 12 H₂O, 0,095 g KH₂PO₄, 4,000 g NaCl

V 0,5 L stekleno bučko smo kvantitativno prenesli natehtano zmes in dolili prečiščeno vodo do oznake. S pomočjo ultrazvočne kopeli smo natehtane soli popolnoma raztopili. Nastalo raztopino smo umerili na pH= 7,4 z dodatkom 1M HCl ali NaOH. Za čas poskusa smo pufer shranjevali v hladilniku.

Osnovne raztopine za merjenje permeabilnosti

- 20 mM raztopina kofeina v PBS
- 2 mM raztopina imidakloprida v PBS
- 20 mM raztopina oksibenzona v PBS
- 20 mM raztopina oksibenzona v Miglyolu 812

3.4 Razvoj analizne metode

Pred razvojem analizne metode smo eksperimentalno preverili topnost preiskovanih modelnih spojin v prečiščeni vodi in kombinaciji več topil. Ko smo preverili topnost in določili topilo z najustreznejšo topnostjo za posamezno spojino, smo nadaljevali z razvojem HPLC analiznih metod za vsako posamezno substanco. Metoda omogoča ločevanje spojin in temelji na različnih afinitetah spojin do stacionarne faze v koloni, skozi katero potujejo. Različno polarne in nepolarne spojine se ločijo v koloni in se eluirajo ob različnih časih, t.i. retencijskih časih (11).

Namen razvoja analiznih metod s HPLC je bil določiti pogoje izokratske elucije: kolono, pretok mobilne faze, sestavo mobilne faze (razmerje med ACN in pufrom/vodo), volumen injiciranja, temperaturo kolone ter valovne dolžine zaznave. Sprva smo pripravljeno osnovno spojino izpostavili gradientni eluciji, tako da smo delež ACN med analizo postopoma zviševali do končne koncentracije ACN. Glede na pridobljeni kromatogram smo ocenili delež ACN, pri katerem se pojavi kromatografski vrh preiskovane spojine. Z odčitanim deležem ACN smo nadaljevali z izokratsko metodo, pri kateri sestava mobilne faze ostaja nespremenjena do konca analize. Izokratske elucije smo optimizirali z manjšimi spremembami deleža ACN in tako pridobili metode, ki so nam dale vrh pravilne oblike in ustrezen retencijski faktor približno v območju od 2 do 5 za vsako spojino posebej.

3.5 Potek poskusa

3.5.1 Priprava raztopin

Vse raztopine za izvedbo poskusa smo pripravili na dan začetka poskusa ali dan prej. PBS pufer, ki smo ga pripravili po postopku omenjenem v poglavju 3.3.2 smo hranili v

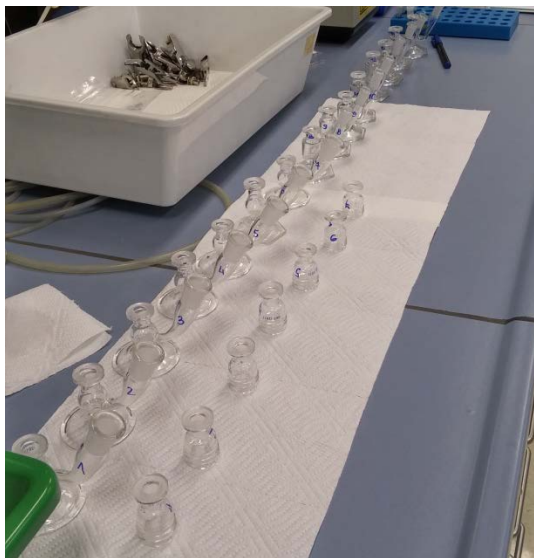
0,5L stekleni bučki v hladilniku do konca poskusa. Spojine, katerih permeabilnost smo raziskovali so bile vse raztopljene v PBS pufu, z izjemo oksibenzona, ki smo ga raztopili še v Miglyolu 812. Raztopine za nanos na kožno tkivo Franzovih celic smo s pomočjo ultrazvočne kopeli raztopili do bistrosti, nato pa jih hranili v steklenih bučkah do konca poskusa. Osnovne raztopine testnih spojin smo uporabili tako za nanos, kot tudi za izdelavo redčitev za umeritveno premico.

3.5.2 Priprava tkiva

V samem poskusu smo preizkusili permeabilnost treh kož prašičjih ušes, in sicer kožo zamrznjeno 36 mesecev, zamrznjeno 1 mesec ter svežo kožo. Razen v primeru sveže kože, ki smo jo neposredno po odvzemu hranili v hladilniku do največ 2h, smo kožo prašičjih ušes vzeli iz zamrzovalnika ($T = -22\text{ °C}$) in pustili odtajati približno 30 min. Kožo ustrezne velikosti smo obrisali s sterilnimi gazami, namočenimi v vodi, odvečno vodo pa smo popivnali s suho gazo. S škarjicami smo pristigli dlake in bili pozorni, da pri tem nismo poškodovali kože. Kožo smo od hrustanca previdno in natančno ločili s skalpelom. V kolikor smo kožo tekom ločevanja poškodovali, za nadaljnje poskuse ni bila primerna in smo jo zavrgli. Če je bilo možno, smo uporabili obe strani uhlja.

3.5.3 Priprava Franzovih celic za poskus

Na dan poskusa smo Franzove celice glede na *Tabelo 12* ustrezno razvrstili in označili z zaporednimi številkami. Spodnji del Franzove celice (FC) smo s pomočjo avtomatske pipete natančno napolnili s svežim medijem PBS in dodali magnetno mešalo. Pripravljeno kožo prašičjih ušes smo za vsako celico posebej odrezali s skalpelom ter namestili na spodnji akceptorski del. Sledilo je nameščanje donorskega dela, ki smo ga s prižemo dobro fiksirali na spodnji del FC. Stekleni del, namenjen vzorčenju smo zatesnili s steklenim zamaškom, da smo preprečili izhlapevanje receptorskega medija. Tako pripravljene celice smo postavili v termostatorano kopel z magnetnim mešalom.



Slika 6: Priprava Franzovih celic za polnjenje s PBS (vir: lasten arhiv)

3.5.4 Izvedba poskusa

Tekom izvedbe poskusa je bilo pomembno, da je nivo vodne kopeli v kateri so bile celice, segal do zgornjega roba akceptorskega dela. Kopel smo termostatirali na 37 °C in zagotovili mešanje s hitrostjo 800 s⁻¹. Celice z vpeto kožo smo postavili v kopel dan pred začetkom poskusa ter pustili, da se je sistem Franzovih celic do jutra stabiliziral. S tem smo zagotovili enake pogoje za vse celice. Koža se je čez noč ustrezno hidratirala, hkrati pa smo z uravnavano temperaturo akceptorskega medija pri 37 °C zagotovili zaželenih 32 °C na površini kože. Ta izpolnjena pogoja zagotavljata dobro posnemanje *in vivo* stanja kože. Poskus smo začeli po 17-urni predinkubaciji tkiva v Franzovih celicah. Izpraznili smo receptorski del, kamor so čez noč v receptorski medij prehajale tudi nekatere nečistoče iz kože. Receptorski del smo previdno napolnili s svežim medijem in pazili na nastanek morebitnih zračnih mehurčkov pod kožo. Celice smo postavili nazaj v kopel ter v donorski del FC nanесли 1 mL testne spojine. Poskus smo opravljali s t.i. neskončnim odmerkom, kar pomeni, da koncentracija na donorski strani zaradi ustreznega presežka testne spojine med poskusom ni bistveno padla. Tekom poskusa smo donorsko raztopino ponovno dodali, če je le te primanjkovalo zaradi pronicanja v vodno kopel, kot posledica nezadostnega tesnenja prižem. Če je bila donorska spojina raztopljena v PBS mediju, smo donorski del zaprli s pokrovčkom ter preprečili izhlapevanje. V primeru raztopine v Miglyolu 812 to ni bilo potrebno.

Vzorčili smo po predvidenem načrtu v naslednjih časovnih točkah: 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 8h, 10h, 12h ter 24h. Z avtomatsko pipeto smo ob časovnih točkah iz vsake FC odpipetirali 250 µL receptorskega medija v mikrotitrsko ploščo. Odvzet medij smo

nadomestili z 250 μ L svežega medija, ki smo ga dodali nazaj v receptorski del FC. Tako smo ohranjali enak volumen receptorskega medija in preprečili koncentriranje modelne spojine, ki je prešla skozi tkivo v receptorski del. Poskus smo zaključili, ko smo odvzeli še zadnji vzorec v časovni točki 24h. Sledila je analiza vzorcev s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.



Slika 7: Franzove celice v termostahiranih magnetnih mešalih (vir: lasten arhiv)

3.6 Permeabilnost

3.6.1 Izračun navideznega permeabilnostnega koeficienta

Difuzija molekul skozi kožo je odvisna od raznolikih fizikalnih, kemijskih ter bioloških interakcij. V veliki meri te interakcije niso linearne, zato je lahko matematično modeliranje splošne perkutane absorpcije zahtevno. Glavno oviro difuzije molekul skozi kožo

predstavlja neživi SC (1). Preučevanje difuzije skozi kožo nam omogočajo matematični modeli, ki so v večini zasnovani na Fickovih zakonih difuzije (19).

Za poskuse dermalne absorpcije, v katerih uporabimo že prej omenjen neskončni odmerek preiskovane donorske spojine, uporabimo predpostavko 1. Fickovega zakona (20). Po 1. Fickovem zakonu iz *Enačbe 1* je fluks stacionarne faze direktno sorprocionalen koncentracijskemu gradientu, njuno medsebojno odvisnost pa povezuje difuzijski koeficient (*Enačba 2*). Ta indicira padec koncentracijskega gradienta. Ker pa je fluks pozitivna količina, nosi difuzijski koeficient D negativni predznak. Fluks poteka potemtakem v nasprotni smeri od smeri koncentracijskega gradienta (20).

$$J \propto \frac{dc}{dx}$$

Enačba 1

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

Enačba 2

J fluks ali stopnja prehajanja topljenca na enoto površine [$\frac{g\ cm^2}{h}$]

$\frac{dc}{dx}$ koncentracijski gradient

D difuzijski koeficient [$\frac{cm^2}{h}$]

Za vrednotenje stopnje perkutane absorpcije kemijskih učinkovin uporabljamo parametre izpeljane iz 1. Fickovega zakona: Q_t , P_{app} ter J_{ss} (19).

P_{app}/K_p ali navidezni permeabilnostni koeficient:

Eksperimentalno določena vrednost K_p označuje razmerje med fluksom ter koncentracijo učinkovine v donorski raztopini. Ker koncentracija donorske raztopine ostaja konstantna, to velja tudi za vrednost permeabilnostnega koeficienta. Vrednost K_p je neodvisna od koncentracije donorske spojine, kot tudi od časa. Služi kot primerjalni parameter izvedbe enakega poskusa med različnimi laboratoriji, ob izpostavitvi drugačnim pogojem poskusa, času ali testiranih spojin (19).

Splošno velja, da je pri napovedovanju obsega dermalne absorpcije modelnih spojin parameter P_{app} zanesljivejši od J_{ss} .

$$P_{app} = \frac{J_{ss}}{C_d}$$

Enačba 3

P_{app} ... navidezni permeabilnostni koeficient $\left[\frac{\text{cm}}{\text{s}}\right]$

J_{ss} ... pretok $\left[\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{cm}^2}\right]$

C_d ... koncentracija preiskovane spojine v donorskem delu $\left[\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right]$

J_{ss} ali fluks stacionarne faze

je definiran kot količina pretoka topjenca skozi membrano na enoto površine in časa. Za izračun moramo predhodno določiti naklon regresijske premice v območju linearnosti $Q(t)$.

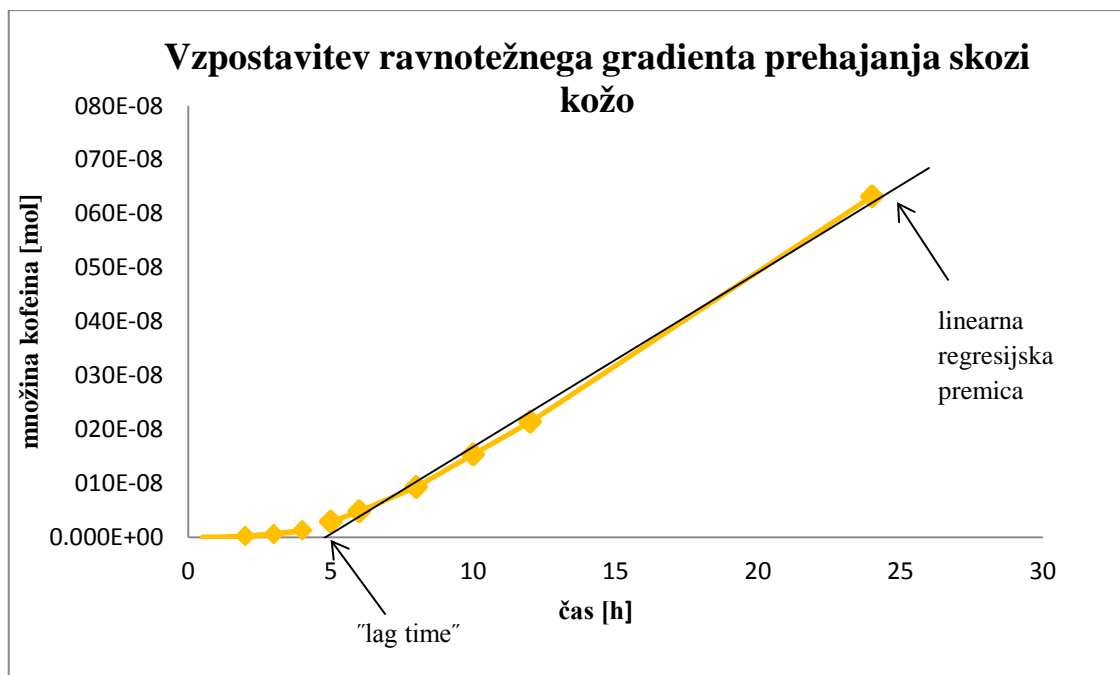
$$J_{ss} = \frac{k_d}{A}$$

Enačba 4

k_d ... naklon linearnega dela regresijske premice $Q(t)$

A ... površina izpostavljene membrane, ki je na voljo za difuzijo preiskovane substance

Za izračun fluksa stacionarne faze po *Enačbi 4*, smo potrebovali zgoraj omenjeni naklon k_d . Slednjega smo določili s pomočjo linearnega dela regresijske premice. Primer postavitve linearne regresijske premice je podan na *Sliki 8*, kjer je prikazano spreminjanje difuzije kofeina, v enem izmed naših poskusov na FC.



Slika 8: Prikaz spreminjanja difuzije topljenca v odvisnosti od časa.

Ker smo skozi izvedbo poskusa vzdrževali eksperimentalne pogoje, termodinamična aktivnost pa je bila konstantna, bi v rezultatih pričakovali konstantno hitrost difuzije oz. linearno naraščanje množine spojine, ki je prešla skozi membrano v odvisnosti od časa. Morebiten nelinearen odnos lahko pripišemo posledicam sprememb lasnosti membrane med poskusom ali naraščanju akceptorske koncentracije preko območja "sink pogojev". Začetni "lag time" pa je praviloma posledica časa, ki je potreben za vzpostavitev ravnotežnega koncentracijskega gradienta skozi celotno debelino membrane- v našem primeru kože, ki je dokaj debela.

3.7 Statistična obdelava podatkov

Rezultate smo statistično obdelali s programom Microsoft Excel podjetja Microsoft. Izračunali smo povprečno vrednost \bar{x} ter standardno deviacijo SD. Zaradi majhnega števila ponovitev poskusa ter vzorcev, se nismo odločili za testiranje normalne porazdelitve, temveč smo rezultate statistično vrednotili s pomočjo t testa, ki takšno porazdelitev predpostavlja. Pri tem smo izvedli tudi F-test in z njim primerjali varianci. Za stopnjo tveganja F-testa in t testa smo uporabili $P=0,05$.

4 REZULTATI

4.1 Topnost

Za izvedbo permeabilnostnih testov na FC smo morali predhodno preizkusiti topnost preiskovanih modelnih spojin v različnih topilih. Namen je bil ugotoviti najvišjo topnost v optimalnem topilu. Podatke smo nato uporabili pri pripravi osnovnih raztopin za nanos na FC.

4.1.1 Kofein

Topnost kofeina v vodnem mediju znaša glede na Roskos et al. 21,7 g/mL ter je z $\log P = 0.01$ v lipidih slabo topen. Zato smo kofein raztopili v prečiščeni vodi. Preizkusili smo koncentracije med 10 mM - 50 mM, pri čemer se je kofein najbolje raztopil pri 20mM. Osnovno raztopino za nanos na FC smo nato pripravili v akceptorskem mediju, PBS.

4.1.2 Imidaklopid

Podatkovna baza PubChem beleži topnost imidakloprida v vodi : 0,061 g/100 mL pri 20 °C(18). Tudi imidaklopid smo raztopili v prečiščeni vodi, pri sobni temperaturi, s pomočjo ultrazvočne kopeli. Začeli smo z 20 mM raztopino. Ker se slednja tudi s pomočjo ultrazvočne kopeli (20min) ni raztopila, smo pripravili še 1, 2, ter 10 mM raztopino imidakloprida. Največja raztopljena koncentracija v prečiščeni vodi je bila 2 mM.

4.1.3 Oksibenzon

Topnost oksibenzona smo sprva preverili v prečiščeni vodi in Miglyolu 812. V prečiščeni vodi pri sobni temperaturi se ni dobro raztapljal, kar potrjujejo tudi nizke vrednosti topnosti iz literarnih virov (0.0037 g/L pri 20 °C (9)). Ker je dobro topen v organskih topilih (17), smo preizkusili topnost pri različnih razmerjih abs. EtOH : H₂O. Izmed treh kombinacij topil: 100 % H₂O, 3 : 7 (H₂O : EtOH), 100 % abs. EtOH, se je pri pripravi 20 mM raztopine oksibenzona najbolje raztopil v 100 % abs. EtOH. Za lažje raztapljanje smo uporabili ultrazvočno kopol. Osnovno raztopino oksibenzona v EtOH smo nato redčili s prečiščeno vodo do 1 mM, 100 μM in 10 μM. Redčitve so bile bistre, do obarjanja pa ni prišlo.

Za primerjavo permeabilnosti oksibenzona iz različnih vehiklov, smo poizkusili oksibenzon raztopiti še v lipofilnem mediju. Za pripravo lipofilne raztopine smo izbrali

Miglyol 812. Največja raztopljena koncentracija je bila 20 mM. Za učinkovito raztapljanje smo bučko z raztopino pustili na magnetnem mešalu čez noč.

4.1.4 Gentamicinijev sulfat

Proizvajalec preizkušene spojine (Sigma Aldrich) navaja, da je topnost gentamicinijevega sulfata boljša v vodnih medijih, pri čemer topnost v vodi znaša 50 mg/mL, medtem ko je v etanolu ter ostalih organskih topilih spojina skoraj netopna. V prečiščeni vodi smo uspešno pripravili 20 mM raztopino genatamicinijevega sulfata, ki smo ga nato redčili s prečiščeno vodo do 1 mM, 100 μ M ter 10 μ M. Redčitve so bile bistre, zato smo 10 μ M raztopino gentamicinijevega sulfata uporabili za nadaljnji razvoj analizne metode.

4.1.5 Homosalat

Topnost homosalata smo preizkusili v treh različnih topilih: v DMSO, EtOH ter prečiščeni vodi. Pripravili smo tri 20 mM raztopine homosalata in ugotovili, da je topnost tako v DMSO kot v EtOH ustrezna, medtem ko je pri raztapljanju v prečiščeni vodi prišlo do nastanka gel strukture. Nadaljevali smo z redčenjem 20 mM raztopine homosalata v DMSO ter homosalata v EtOH s prečiščeno vodo. Pri redčenju homosalata v DMSO mediju je prišlo pri mešanju s prečiščeno vodo do ločitve faz, zato smo njuno kombinacijo izločili iz nadaljnje analize. Raztopino homosalata v EtOH (20 mM) pa smo uspešno redčili s prečiščeno vodo do 10 μ M osnovne raztopine, ki smo jo nato uporabili za razvoj analizne metode.

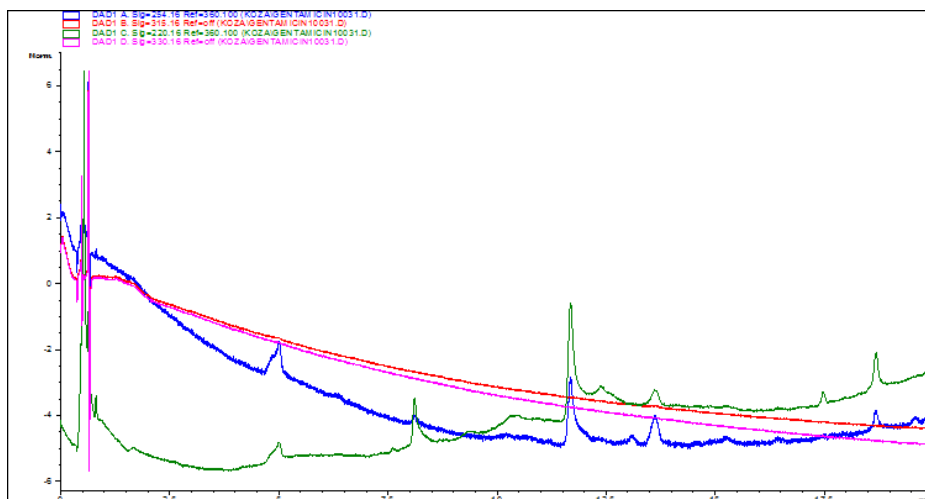
4.2 Analizna metoda

Metoda za določanje vsebnosti modelnih spojin v vzorcih iz poskusov na Franzovih celicah se je razlikovala glede na posamezno spojino. Uporabljali smo kolono ZORBAX 3,5 μ m, Eclipse, XDB, C18, 4,6 \times 75 mm. V *Preglednici 1* spodaj smo za vsako spojino, za katero smo uspešno razvili analizno metodo, zapisali najoptimalnejše pogoje analize za naš laboratorij.

Preglednica 1: Analizna metoda za določanje kofeina, imidakloprida, oksibenzona in diklofenaka

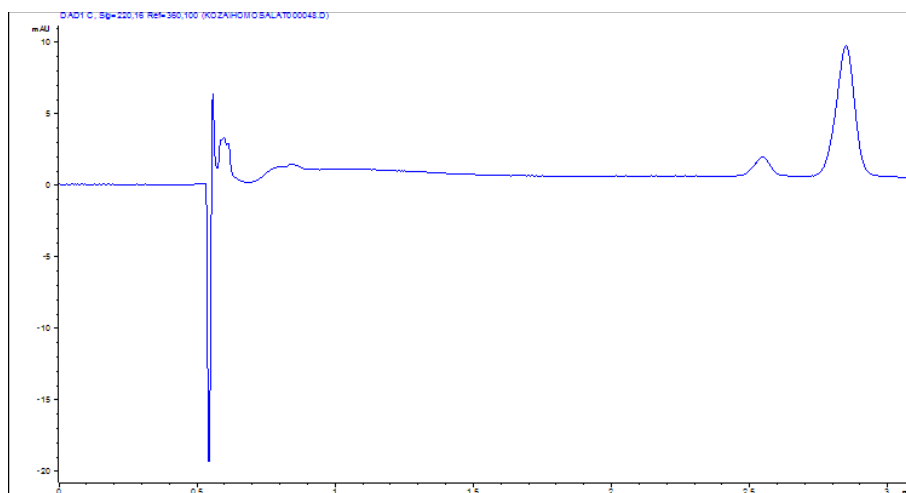
KOFEIN							
Pretok MF [mL/min]	T [°C]	vodna komponenta	organska komponenta	Razmerje vod:org faza	λ [nm]	t_{ret} [min]	V_{inj}
1,2	50	amonijev fosfat; pH=3,066	acetonitril	90:10	272	2,4	100 μ L
IMIDAKLOPRID							
1,5	50	amonijev fosfat; pH=3,066	acetonitril	78:22	270	2,1	100 μ L
OKSIBENZON							
1,5	50	ultračista voda	acetonitril	42:58	289	2,1	100 μ L
DIKLOFENAK							
1,5	50	ultračista voda	acetonitril	42:58	220	1,8	100 μ L

Pri optimiziranju analiznih parametrov za določanje gentamicinijevega sulfata smo v gradientni eluciji kot mobilno fazo uporabili amonijev fosfat (pH=3,066) ter acetonitril, ki je skozi analizo naraščal od 10-65 %. Zaradi nizkih vrhov smo prvotnima signaloma (A=254 nm, B=315 nm) dodali še dvoje signalov pri 220 in 330 nm. Vrh ni bil dobro določljiv in čist ter zato neustrezen. Gentamicinijev sulfat smo zato izločili iz nadaljnje študije in ga nismo uporabili v poskusih s FC.



Slika 9: Kromatogram gradientne analize gentamicinijevega sulfata z ACN (10-65 %).

Na podobno težavo smo naleteli pri analiziranju raztopine homosalata v EtOH, redčenega s prečiščeno vodo do 10 μ M. Pri izokraski metodi smo za mobilno fazo uporabili ultračisto vodo za HPLC s 85 % deležem acetonitrila. Zaradi dveh vrhov, ki sta se pojavljala ob ponovitvah analize nismo uspeli razviti ustrezne analize metode, zato smo homosalat izločili iz nadaljnega raziskovanja dermalne absorpcije skozi kožo.



Slika 10: Kromatogram izokraskne elucije homosalata z mobilno fazo (ultračista voda: ACN=15:85)

4.2.1 Vzorčenje in analiza vzorcev

Vzorke poskusa, ki smo jih zbrali na mikrotitrskih ploščah, smo ustrezno pokrili s tesnilnim silikonskim vložkom. S tem smo preprečili morebitno izhlapevanje topila ter koncentriranje vzorcev. Nato smo jih analizirali s HPLC z najoptimalnejšimi pogoji iz *Preglednice 1*. Kot rezultat smo dobili kromatograme, katerih površine smo uporabili za določitev vsebnosti spojin, ki so permeirale skozi membrano.

Za določitev koncentracije in množine topljenca ki je prešel membrano, pa smo predhodno izdelali umeritveno premico. V akceptorskem mediju- PBS smo raztopili testno substanco in pripravili razredčine v sedmih točkah: od 1 μM do 100 μM . Površine odzivov teh umeritvenih spojin so služile za izračun umeritvene premice in njene enačbe. Slednji podatek nam je omogočil kvantitativno določitev testirane substance in njen gradient v času trajanja poskusa na Franzovih celicah.

4.3 Permeabilnost

Koeficiente permeabilnosti smo določali na koži prašičjih ušes. Pod enakimi pogoji smo izvedli vse tri poskuse s tremi različnimi kožami na Franzovih difuzijskih celicah. Poskus permeabilnosti je trajal 24 ur. Izmed spojin, ki smo jih preizkusili in zanje uspešno razvili analizne metode, smo za poskus na FC izbrali tri: kofein, imidaklopid ter oksibenzon.

S pomočjo redčitev osnovne donorske raztopine smo izdelali umeritveno premico, s katero smo lahko interpretirali rezultate HPLC meritev naših vzorčenj. Z enačbo premice smo iz površine kromatogramov izračunali koncentracije spojine v vzorcu in podatke uporabili v izračunih za J_{ss} ter P_{aap} .

Pri poskusu s kožo, ki je bila zamrznjena 36 mesecev smo uporabili 3 FC. Pri poskusih z 1 mesec zamrznjeno kožo ter svežo kožo pa smo uporabili 4 FC. Minimalno število vsaj treh uporabljenih FC za posamezno spojino nam je služilo kot kontrola integritete kože in ponovljivosti rezultatov. V kolikor bi v rezultatih prišlo do večjih odstopanj v permeabilnosti enake spojine na enako tretirani koži, bi lahko sklepali na poškodbo tkiva med pripravo na poskus.

4.3.1 Določanje permeabilnostnih koeficientov kofeina skozi kožo

Preglednica 2: Parametri za izračun permeabilnosti kofeina skozi 36 mesecev zamrznjeno kožo

KOŽA, ZAMRZ. 36 MESECEV	Franzova celica		
	1	2	3
K_d [mol/h]	3,61E-08	2,75E-08	3,15E-08
R	0,9930	0,9849	0,9956
J [nmol/(h*cm ²)]	5,65E+01	3,48E+01	3,99E+01
P_{aap} [cm/s]	7,84E-07	4,84E-07	5,54E-07

Preglednica 3: Parametri za izračun permeabilnosti kofeina skozi 1 mesec zamrznjeno kožo

KOŽA, ZAMRZ. 1 MESEC	Franzova celica			
	1	2	3	4
K_d [mol/h]	1,08E-07	1,25E-07	6,90E-08	8,02E-08
R	0,9948	0,9934	0,9816	0,9891
J [nmol/(h*cm ²)]	1,14E+02	1,32E+02	8,73E+01	1,25E+02
P_{aap} [cm/s]	1,58E-06	1,83E-06	1,21E-06	1,74E-06

Preglednica 4: Parametri za izračun permeabilnosti kofeina skozi svežo kožo

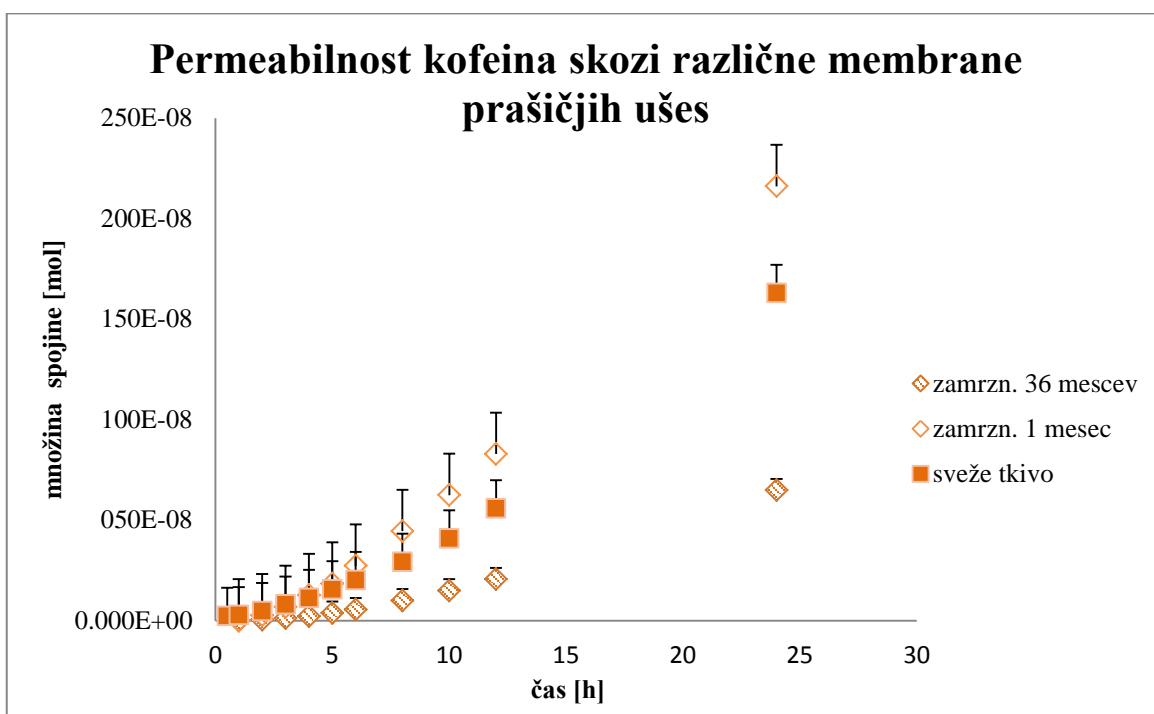
SVEŽA KOŽA	Franzova celica			
	1	2	3	4
K_d [mol/h]	5,60E-08	7,17E-08	9,70E-08	4,46E-08
R	0,9750	0,9845	0,9729	0,9745
J [nmol/(h*cm ²)]	5,90E+01	7,54E+01	1,23E+02	6,96E+01
P_{aap} [cm/s]	8,19E-07	1,05E-06	1,71E-06	9,67E-07

Preglednica 5: Zbrane vrednosti P_{app} [$\times 10^{-6}$ cm/s] kofeina skozi različno shranjevano kožo

	P_{aap} [$\times 10^{-6}$ cm/s]				\bar{x}	SD
	Franzove difuzijske celice št.					
	1	2	3	4		
36 mesecev zamrznjena koža	0,78	0,48	0,55	/	0,60	0,16
1 mesec zamrznjena koža	1,58	1,83	1,21	1,74	1,59	0,27
sveža koža	0,82	1,05	1,71	0,97	1,14	0,39

Preglednica 6: Izračunane vrednosti »p« F-testa ter t testa za kofein za primerjavo sveže kože z dvema različno shranjevanima tkivoma

čas shranjevanja tkiva		sveža koža	36 mesecev
36 mesecev	F TEST	0,280788	
	T TEST	0,080877	
1 mesec	F TEST	0,566119	0,514626
	T TEST	0,107862	0,002672



Slika 11: Prehajanje kofeina skozi različno shranjevano kožo v odvisnosti od časa

4.3.2 Določanje permeabilnostnih koeficientov imidakloprida skozi kožo

Preglednica 7: Parametri za izračun permeabilnosti imidakloprida skozi 36 mesecev zamrznjeno kožo

KOŽA, ZAMRZ. 36 MESECEV	Franzova celica			
	1	2	3	4
K_d [mol/h]	2,07E-09	3,05E-09	1,73E-09	2,30E-09
R	0,9217	0,9383	0,9553	0,9513
J[nmol/(h*cm ²)]	2,18E+00	3,21E+00	2,19E+00	2,42E+00
P_{aap} [cm/s]	3,03E-07	4,46E-07	3,04E-07	3,36E-07

Preglednica 8: Parametri za izračun permeabilnosti imidakloprida skozi 1 mesec zamrznjeno kožo

KOŽA, ZAMRZ. 1 MESEC	Franzova celica			
	1	2	3	4
K_d [mol/h]	8,86E-08	5,58E-08	3,71E-08	3,24E-08
R	0,9669	0,9877	0,9658	0,9824
J[nmol/(h*cm ²)]	9,32E+01	7,06E+01	4,69E+01	3,41E+01
P_{aap} [cm/s]	1,29E-05	9,81E-06	6,52E-06	4,73E-06

Preglednica 9: Parametri za izračun permeabilnosti imidakloprida skozi svežo kožo

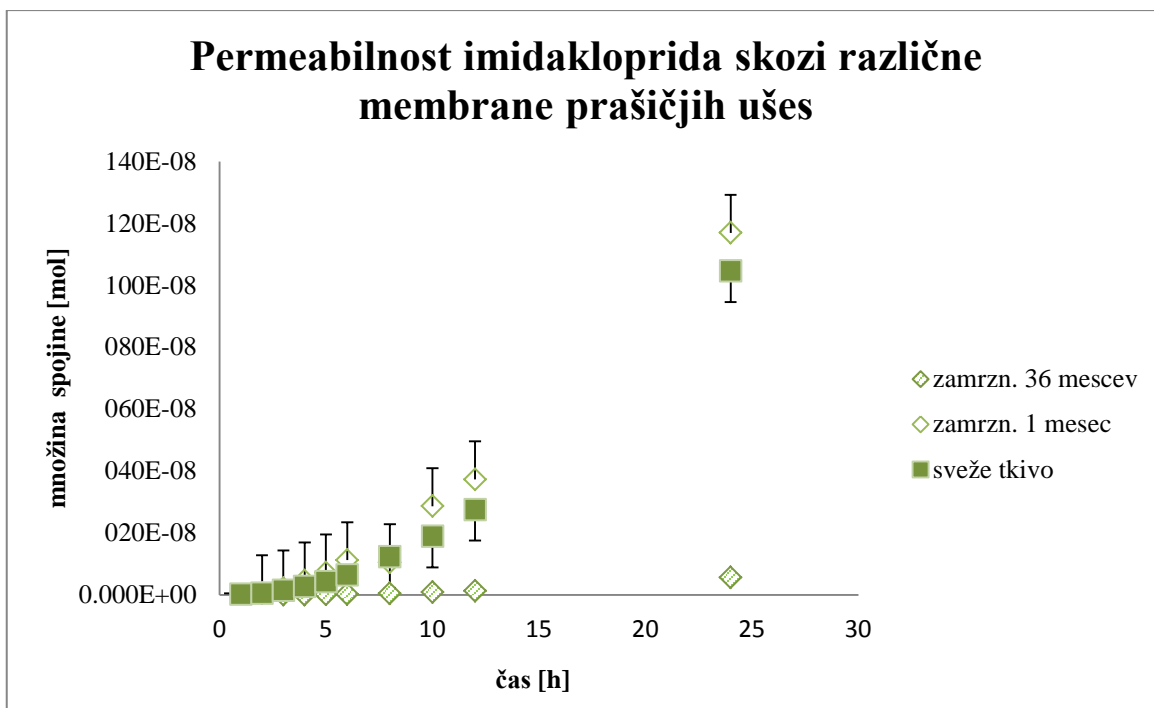
SVEŽA KOŽA	Franzova celica			
	1	2	3	4
K_d [mol/h]	6,98E-08	3,03E-08	5,15E-08	2,92E-08
R	0,9680	0,9463	0,9601	0,9682
J[nmol/(h*cm ²)]	7,35E+01	3,83E+01	6,52E+01	3,07E+01
P_{aap} [cm/s]	1,02E-05	5,32E-06	9,06E-06	4,27E-06

Preglednica 10: Zbrane vrednosti P_{app} [$\times 10^{-6}$ cm/s] imidakloprida skozi različno shranjevano kožo

	P_{app} [$\times 10^{-6}$ cm/s]					SD
	Franzove difuzijske celice št.				\bar{x}	
	1	2	3	4		
36 mesecev zamrznjena koža	0,30	0,45	0,30	0,34	0,35	0,09
1 mesec zamrznjena koža	12,9	9,81	6,52	4,73	8,49	3,62
sveža koža	10,2	5,32	9,06	4,27	7,21	2,86

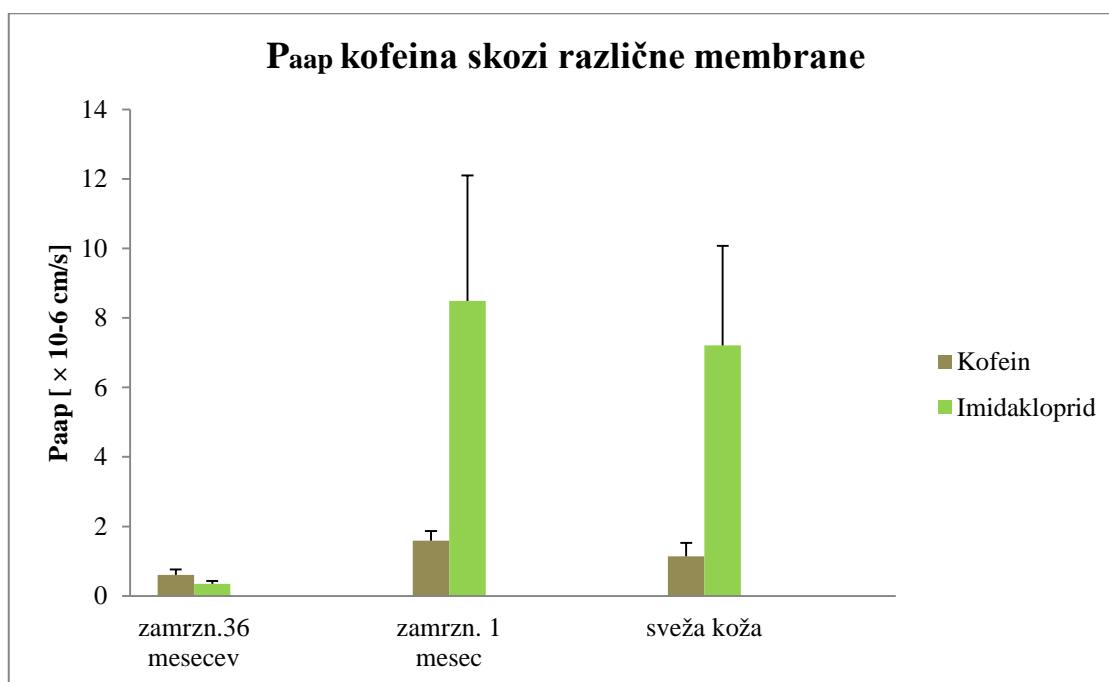
Preglednica 11: Primerjalne vrednosti F testa ter T testa za imidakloprid glede na P_{app} vrednostmi med različno shranjevanimi tkivi

čas shranjevanja tkiva		sveža koža	36 mesecev
36 mesecev	F TEST	5,15E-05	
	T TEST	0,003015	
1 mesec	F TEST	0,710542	2,56E-05
	T TEST	0,599541	0,004088



Slika 12: Prehajanje imidakloprida skozi različno shranjevano kožo v odvisnosti od časa

4.3.3 Primerjava vrednosti P_{app} kofeina in imidakloprida



Slika 13: Primerjava P_{app} vrednosti [$\times 10^{-6}$ cm/s] kofeina in imidakloprida skozi vse 3 preiskovane vzorce kož

4.3.4 Oksibenzon

Poskus permeacije smo izvedli le na vzorcih tkiva, ki so bili zamrznjeni. Na 36 mesecev zamrznjenem tkivu smo s FC testirali 20 mM raztopino oksibenzona v Miglyolu 812. Do zadnjega vzorčenja se ni pri nobeni Franzovi celici v akceptorski medij sprostila zadostna količina oksibenzona, ki bi bila ustrezna za kvantifikacijo s HPLC. Pri koži, ki je bila zamrznjena le 1 mesec, pa smo oksibenzon kvantificirali v zadnjem 24-urnem vzorčenju. Koncentracija prisotnega oksibenzona v akceptorskem mediju je bila ob koncu poskusa $7,05E-08$ mol/L.

OKSIBENZON, koža zamrz. 1 mesec	število Franz. celic	P_{aap} [cm/s]	SD
	2	7,74E-10	2,87E-11

5 RAZPRAVA

5.1 Primerjava permeabilnosti različnih tkiv za kofein ter imidaklopid

V *Preglednicah 2, 3, 4, 7, 8, 9* so predstavljeni parametri, izračunani s pomočjo 1. Fickovega zakona. Za izračun teh smo potrebovali naklon linearnega dela prehajanja preiskovane spojine skozi kožo v odvisnosti od časa ($n(t)$). Kumulativna celota množine snovi, ki preide membrano do časovnih točk vzorčenja v prvih časovnih točkah nelinearno narašča ter v določeni točki vzpostavi linearen odnos absorpcije v odvisnosti s časom. Kot že omenjeno, je za vzpostavitev ravnotežnega koncentracijskega gradienta spojine skozi kožo potreben čas, t.i. *lag time*, ki variira glede na kožo, kot tudi pogoje izvedbe poskusa.

V območju linearnosti za vsako FC s pomočjo *Enačba 4* izračunamo fluks in nato z *Enačba 3* tudi navidezni permeabilnostni koeficient P_{app} . Ob primerjanju vrednosti P_{app} za permeacijo kofeina skozi različno shranjevana tkiva vidimo, da je bila najdlje zamrznjena koža (36 mesecev) najmanj prepustna za kofein ($\overline{P_{app}} = 6,07E-07$ cm/s). Sledi ji sveža koža s povprečno $\overline{P_{app}} = 1,13E-06$ cm/s in kot najbolj prepustna za kofein je koža zamrznjena 1 mesec s $\overline{P_{app}} = 1,59E-06$ cm/s.

Povprečja navideznih permeabilnostnih koeficientov glede na posamezno kožo so pri imidaklopidu v primerjavi s kofeinom višja. Iz *Preglednice 10* lahko razberemo, da je za imidaklopid najbolj permeabilna 1 mesec zamrznjena koža s $\overline{P_{app}} = 8,49E-06$ cm/s, sledi ji sveža koža s $\overline{P_{app}} = 7,21E-06$ cm/s. Kot najmanj prepustna se izkaže tri leta zamrznjena koža s $\overline{P_{app}} = 3,47E-07$ cm/s.

Če prehajanje imidakloprida primerjamo s kofeinom, je obnašanje tkiva oz. njegova permeabilnost podobna ne glede na shranjevanje kože. Navidezni permeabilnostni koeficienti kažejo, da shranjevanje kože sicer vpliva na njeno prepustnost za kofein ter imidaklopid, vendar ne enolično, saj je najstarejša ter najdlje zamrznjena koža ravno najmanj prepustna za kofein, medtem ko kratkotrajno zamrzovanje povzroči povečanje permeabilnostnih koeficientov.

Če statistično primerjamo permeacijo kofeina skozi svežo kožo in kožo, zamrznjeno 1 mesec, ugotovimo, da razlike med njima niso statistično značilne ($p = 0,10$; $p > 0,05$). Do podobnih ugotovitev nas pripelje primerjava sveže kože s 36 mesecev zamrznjeno, ki prav tako ne izkazuje statistično značilnih razlik ($p = 0,08$; $p > 0,05$). Za statistično značilno pa se je izkazala razlika v permeabilnosti za kofein med obema zamrznjenima tkivoma ($p < 0,05$). Rezultati potrjujejo odvisnost permeacije kofeina skozi kožo od shranjevanja tkiva, pri čemer uporaba sveže ali nekaj tednov zamrznjene kože ne vpliva značilno na rezultate, po drugi strani pa uporaba dolgotrajno zamrznjene kože kaže značilne razlike v vrednostih P_{app} .

S primerjavo varianc potrdimo, da enako kot pri kofeinu tudi pri imidaklopridu ne prihaja do značilnih razlik med permeacijo skozi svežo in nekaj tednov zamrznjeno kožo ($p = 0,599$). Statistično značilna pa je razlika med svežo ter 3 leta zamrznjeno kožo ($p = 0,003$; $p < 0,05$), kot tudi med obema zamrznjenima ($p = 0,004$).

Iz navedenih rezultatov lahko sklepamo, da dolgo shranjevanje (3 leta) ne vpliva na strukturo kože le s tvorbo kristalov, ki bi permeabilnost najverjetneje povečali. O vplivu drugih procesov staranja dolgotrajno zamrznjene kože npr. o vsebnosti vlage, ki bi lahko povzročila nasprotno učinke, žal lahko le ugibamo. Zaradi nepredvidljivosti posledic tako dolgega shranjevanja lahko torej sklenemo, da je smiselno uporabljati čim bolj sveže vzorce ter se izogibati dolgotrajnemu zamrzovanju tkiv.

Območje linearnosti fluksa stacionarne faze smo za vsako Franzovo celico posebej določali s pomočjo točkastih grafikonov in determinacijskega koeficienta R^2 . Pri vseh FC s kofeinom so bile vrednosti R^2 linearne delu višje od 0,98, kar kaže na dobro korelacijo med fluksom in časom. Linearnost se je pri zamrznjenih kožah vzpostavila po 4 urah, pri sveži koži pa po 5 uri vzorčenja. Govorimo o t.i. t_{lag} (*ang.* lag time), ki je pri odmrznjeni koži za kofein manjši, kot pri sveži koži. "Lag-time" je čas, ki je potreben, da spojina, ki prehaja iz donorskega dela skozi kožo vzpostavi ravnotežen koncentracijski gradient (21).

V povprečju je bil pri prehajanju imidakloprida determinacijski koeficient R^2 za območje linearnosti višji od 0,98. Ugotovili smo, da je vzpostavitev koncentracijskega gradienta pri 36 mesecev zamrznjeni koži potekala najpočasneje. Najdlje zamrznjeno tkivo (36 mesecev) je za vzpostavitev linearne odnosa med absorpcijo ter časom potrebovalo med 6 in 8 ur. Sledila ji je sveža koža, pri kateri se je gradient vzpostavil v povprečju 6-ih

ur. Najhitreje se je ravnotežni gradient vzpostavil pri 1 mesecu zamrznjeni koži, ki je potrebovala med 3-5 ur s R^2 nad 0,9.

Predvidevamo lahko, da je vzpostavitev ravnotežnega gradienta povezana s strukturo in debelino bariere SC, ki se med zamrzovanjem spremeni. Spremenjena lipidna ter celična struktura v epidermisu ima slabšo barierno funkcijo kot koža, ki je sveža, zato je lahko to razlog za hitrejšo vzpostavitev konstantnega fluksa J_{ss} .

Glede na podatke nekaterih študij smo pričakovali večjo permeabilnost za najdlje zamrznjeno kožo, vendar tega rezultati naših poskusov niso mogli potrditi. Koeficienti permeabilnosti kažejo ravno nasprotno. Iz *Slike 13* tako razberemo, da je bilo tri leta zamrznjeno tkivo najmanj permeabilno za kofein in imidaklopid.

Shranjevanje tkiva pred poskusom ni edini dejavnik, ki je vplival na rezultate naših testov dermalne absorpcije. Upoštevati moramo, da je lahko k takšnim vrednostim pripomogla priprava tkiva za poskus in razlike v prašičjih ušesih samih. Ušesa so se med seboj morfološko razlikovala, saj je sveže uho bilo za razliko od zamrznjenih precej večje, bolj poraščeno in bolj maščobno. Gostost dlačnih foliklov v veliki meri vpliva na permeabilnost modelnih spojin, kar sta ugotovila tudi avtorja Xin Liu in F. Grice (22). V raziskavi sta primerjala absorpcijo kofeina skozi netretiran SC in SC tretiran z metodo zapiranja lasnih foliklov. Absorpcijska konstanta preko SC z odprtimi lasnimi folikli je bila kar desetkrat višja od SC, ki je imel blokirano pot skozi lasne folikle. Iz tega vidika lahko na shranjevanje kože gledamo tudi kot način za zmanjševanje variabilnosti meritev, saj omogoča meritve na izvorno podobnejših ali celo enakih tkivih ob različnih časih (22).

V obzir moramo vzeti tudi pripravo tkiva, ki lahko zaradi človeške napake in nezadostne izkušenosti kaže v različno pripravljene vzorce. Vzorce smo pripravili s pomočjo skalpela, s katerim smo kožo ločili od hrustanca. Med samo pripravo bi lahko pripravili vzorce neenake debeline, s skalpelom in škarjicami bi lahko tkivo ranili oz. poškodovali na mikroskopski ravni. Vse omenjene spremembe imajo vpliv na hitrejšo ali počasnejšo permeacijo preizkušanih spojin, izrazijo pa se kot variabilnost meritev opravljenih pri nominalno istih pogojih z isto spojino.

Integriteta kože pomembno vpliva na rezultate permeabilnostnih študij, zato različne smernice kot so OECD 2004 priporočajo predhodno testiranje intaktnosti kože. Za testiranje barierne funkcije kože se najpogosteje uporabljajo fizikalne metode, kot so merjenje transepidermalne izgube vode oz. TEWL (*ang. transepidermal water loss*) in

meritve upornosti kože. Rezultati, ki se nato primerjajo s standardnimi vrednostmi iz omenjenih smernic OECD so indikator poškodovanosti membrane in njene integritete nasploh (23).

Priprava kože, predvsem ločevanje tkiva od hrustanca na prašičjem ušesu je potekalo ročno, kar lahko prispeva k variabilnosti rezultatov. V specializiranih laboratorijih za dermalno absorpcijo v ta namen uporabljajo t.i. dermatom. To orodje nam omogoča natančen, ponovljiv izrez tkiva, ki bo enake debeline. Z uporabo takšnega instrumenta bi se lahko izognili razlikam v permeabilnosti, če so bile te posledica razlik v debelini tkiva. Ob enem pa bi lahko standardizirana debelina vzorcev kože neenakovredno upoštevala vse plasti kože, ki se v debelini od vzorca do vzorca razlikujejo. Poleg dermatoma, bi za testiranje integritete kože lahko izvedli še meritve TEWL in za vsak vzorec določili vrednosti transepidermalne izgube vode ter jih primerjali z vrednostmi, predpisanimi v smernicah. S tem bi neprimerne vzorce, ki so bili med pripravo morebiti poškodovani ali neprimerno obravnavani, poškodb pa s prostim očesom nismo zaznali, izločili iz poskusa in onemogočili nadaljnjo nepravilno interpretacijo rezultatov.

5.2 Oksibenzon

Rezultati prehajanja oksibenzona skozi testirana tkiva kažejo, da barierna funkcija kože deluje, ne glede na shranjevanje tkiva, ki ga uporabimo v študiji. Oksibenzon v akceptorski medij ni prehajal skozi kožo najdlje zamrznjeno kožo, medtem ko smo ga pri 1 mesec zamrznjeni koži zaznali 24 ur po nanosu osnovne 20 mM raztopine v Miglyolu 812. Kljub temu, da je z ustrežno analizo metodo na HPLC nismo zaznali prisotnega oksibenzona, to ne pomeni, da je bila njegova koncentracija v akceptorskem delu ničelna. Če predpostavimo linearnost prehajanja oksibenzona od začetka do konca lahko rečemo, da je bila koncentracija v akceptorskem delu med poskusom manjša od $7,05E-08$ mol/L.

Kot že v uvodu navajamo, je oksibenzon pogosta spojina kozmetičnih pripravkov za varovanje pred soncem. UV-filtri delujejo na površini naše kože tako, da UV žarke odbijajo ali pa absorbirajo, nikakor pa UV-filtri niso primerni za vgrajevanje v KI v takšni obliki, ki bi omogočala difuzijo v globlje plasti epidermisa, saj tam niso potrebni. Rezultati tako potrjujejo, da preiskovana koža prašičjih ušes nudi ustrezno bariero ter onemogoča prehajanje oksibenzona tudi po zamrzovanju in odmrzovanju tkiva, ko le to ni več živo.

6 SKLEP

Proces zamrzovanja povzroči v tkivu histološke spremembe in se kaže v spremenjenih bariernih lastnostih prašičje kože. Permeabilnostna koeficienta (P_{app}) za kofein in za imidakloprid ne izkazuje statistično značilnih razlik med svežo in nekaj tednov zamrznjeno kožo. Značilno razliko s $p < 0,05$ pa izkazuje dolgotrajno zamrznjena koža v primerjavi s svežo in nekaj tednov zamrznjeno. Iz tega lahko sklenemo, da uporaba dalj časa zamrznjene kože, izkazuje statistično značilne razlike glede na referenčno svežo kožo in bi bilo uporabo takšne kože za študije dermalne absorpcije nujno omejiti s standardizacijo pogojev in časa shranjevanja za to namenjenega tkiva. Hkrati pa to ne pomeni popolne omejitve uporabe zamrznjene kože, saj rezultati P_{app} tako pri imidaklopridu kot pri kofeinu niso dajali statistično značilnih razlik med nekaj tednov zamrznjeno in svežo kožo.

Rezultati vzorčenj prehajanja oksibenzona skozi dve časovno različno zamrznjeni koži so pokazali, da koža ne glede na čas zamrzovanja ohranja barierno funkcijo. V obeh poskusih z zamrznjeno kožo je bila prisotnost oksibenzona v vzorcih nižja od meje detekcije. Zaznali smo ga le pri zadnjem 24-urnem vzorčenju prehajanja skozi nekaj tednov zamrznjeno kožo. Takšen rezultat kaže, da koža zanesljivo ovira prehajanje oksibenzona v globlje plasti kože, saj mora za svoje delovanje ostati na površju epidermisa.

Menimo, da bi bilo koristno študije permeabilnosti in odvisnosti koeficientov dermalne absorpcije opraviti še na veliko večji skupini spojin, ki bi se med seboj razlikovale v topnosti, $\log P$, velikosti molekule, naboju, lipofilnosti itd. Le tako bi lahko še bolj verodostojno ocenili, v kolikšni meri vpliva shranjevanje kože na njene permeabilnostne lastnosti. Že na osnovi naših rezultatov pa lahko ocenimo, da bi bilo nujno standardizirati pogoje shranjevanja kože za namen študij dermalne absorpcije vsaj znotraj našega laboratorija.

7 LITERATURA

1. Beck R, Guterres S, Pohlmann A: *Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for Skin Care*, Springer, Berlin: 3-7.
2. Godin B, Touitou E: *Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models*. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 11: 1152-61
3. Tan G1, Xu P, Lawson LB, He J, Freytag LC, Clements JD, John VT: *Hydration effects on skin microstructure as probed by high-resolution cryo-scanning electron microscopy and mechanistic implications to enhanced transcutaneous delivery of biomacromolecules*. *J Pharm Sci* 2010; 2: 730-40.
4. Simon GA, Maibach HI: *The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations--an overview*. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2000; 13(5): 229-34.
5. Michael Szycher: *High Performance Biomaterials. A Comprehensive Guide to Medical and Pharmaceutical Applications*. J R Soc Med, Lancaster, 1991.
6. <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/fedddocs/oced/ocedtg428-508.pdf>, dne 9. 8. 2016
7. Ahlstrom LA, Cross SE, Mills PC: *The effects of freezing skin on transdermal drug penetration kinetics*. *J Vet Pharmacol Ther* 2007; 456-63.
8. Dennerlein K, Schneider D, Göen T, Schaller KH, Drexler H, Korinth G: *Studies on percutaneous penetration of chemicals – Impact of storage conditions for excised human skin*. *Toxicol in Vitro* 2013; 27(2): 708-13.
9. Scientific Committee on Consumer Products: *Opinion on Benzophenone-3, COLIPA N. S38*. SCCP; 2008;
10. http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/11/Predmeti/Biofarmacija_s_farmakokinetiko_IF/Vaje/Topnost_hitrost_raztapljanja.pdf, dne 10. 8. 2016
11. Ilaš J, Žakelj S: *Instrumentalna analiza v kozmetiki*, Fakulteta za farmacijo Ljubljana, Ljubljana, 2013: 37-38.
12. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2519>, dne 20. 7. 2016
13. Herman A, Herman AP: *Caffeine's mechanisms of action and its cosmetic use*. *Skin Pharmacol Physiol* 2013; 26(1): 8-14.

14. Luo L, Lane ME: *Topical and transdermal delivery of caffeine*. International Journal of Pharmaceutics 2015; 490: 155-164.15.
15. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0327-07932010000300012, dne 30. 8. 2016
16. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4632>, dne 5. 8. 2016
17. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003519.pdf, dne 4. 9. 2016
18. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Imidacloprid>, dne 5.8. 2016
19. Couto A, Fernandes R, Cordeiro MN, Reis SS, Ribeiro RT, Pessoa AM: *Dermic diffusion and stratum corneum: a state of the art review of mathematical models*. J Control Release; 2014; 177: 74-83.
20. Moss G, Gullick D, Wilkinson S: *Predictive Methods in Percutaneous Absorption*, Springer, Berlin, 2015: 49.
21. Ajay K Banga: *Electrically Assisted Transdermal And Topical Drug Delivery*. Taylor and Francis Ltd, London, 2003: 7.
22. Xin Liu, Grice E Jeff: Hair follicles contribute significantly to penetration through human skin only at times soon after application as a solvent deposited solid in man. Br J Clin Pharmacol; 2011; 72(5): 768–774.
23. J. Kielhorn, I. Mangelsdorf, Stephanie Melching-Kollmuß: *Environmental Health Criteria 235- Dermal absorption*. World Health Organization; 46-47

8 Priloge

Preglednica 12: Franzove celice in njihove lastnosti

Zaporedna številka	V[mL]	Površina[cm ²]	Akceptorski del	Donorski del	Magnet
1	8,2	0,95	068/2011	062/2011	večji
2	7,8	0,95	064/2011	063/2011	manjši
3	6,7	0,79	061/2011	064/2011	manjši
4	8,4	0,64	065/2011	067/2011	večji
5	7,3	0,95	063/2011	069/2011	manjši
6	9,1	0,79	067/2011	/	večji
7	6,7	0,79	069/2011	/	manjši
8	8,7	0,95	/	/	srednji
9	8,6	0,95	/	/	srednji
10	9,0	0,79	/	/	srednji
11	9,2	0,95	/	/	srednji
12	9,1	0,95	/	/	srednji
13	8,3	0,95	/	/	srednji
14	9,0	0,95	/	/	srednji
15	8,9	0,79	/	/	srednji
16	8,6	0,79	/	/	srednji