

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JELENA MANDIĆ

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JELENA MANDIĆ

**VREDNOTENJE CITOTOKSIČNOSTI TEKOČIH KRISTALOV ZA DERMALNO
UPORABO NA CELIČNIH LINIJAH KERATINOCITOV IN FIBROBLASTOV**

**CYTOTOXICITY EVALUATION OF LIQUID CRYSTALS FOR DERMAL
APPLICATION ON KERATINOCYTE AND FIBROBLAST CELL LINES**

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko tehnologijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin in somentorstvom asist. dr. Mirjam Gosenca.

Zahvala

Iskrena hvala prof. dr. Mirjani Gašperlin, da mi je omogočila opravljanje diplomske naloge pod njenim mentorstvom.

Najlepše se zahvaljujem tudi somentorici asist. dr. Mirjam Gosenca za njeno dostopnost, pomoč in strokovne nasvete tako v laboratoriju kot pri pisanju diplome.

Hvala Janu Pelipenku, ki mi je bil pripravljen priskočiti na pomoč v laboratoriju.

Ne nazadnje gre zahvala tudi mojim najbližjim za vso spodbudo v času celotnega študija, še posebej hvala moji mami.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice prof. dr. Mirjane Gašperlin in somentorice asist. dr. Mirjam Gosenca.

Jelena Mandić

Ljubljana, 2013

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Janja Marc

Mentorica: prof. dr. Mirjana Gašperlin

Somentorica: asist. dr. Mirjam Gosenca

Član diplomske komisije: doc. dr. Tihomir Tomašič

Vsebina

Povzetek	1
Abstract	3
Seznam okrajšav	5
1 Uvod	6
1.1 Tekoči kristali	6
1.1.1 Liotropni tekoči kristali.....	7
1.1.2 Uporaba tekočih kristalov v farmaciji.....	7
1.2 Iritacija kože: nastanek in vrednotenje	9
1.2.1 Zgradba kože.....	9
1.2.2 Iritacija kože.....	10
1.2.3 Vrednotenje iritantov.....	12
1.2.4 Celične linije keratinocitov in fibroblastov ter proučevanje morfologije.....	14
2 Namen dela	18
3 Materiali in metode	19
3.1 Materiali	19
3.1.1 Sestavine za izdelavo tekočih kristalov.....	19
3.1.2 Gojenje celic in reagenti.....	20
3.1.3 Mikroskopiranje.....	20
3.2 Metode	21
3.2.1 Priprava tekočih kristalov in raztopin tekočih kristalov.....	21
3.2.2 Gojenje in presajanje celic.....	22
3.2.3 Vrednotenje citotoksičnosti.....	23
3.2.3.1 Proučevanje celične proliferacije s testom aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze.....	23
3.2.3.2 Proučevanje celic pod svetlobnim invertnim mikroskopom in štetje celic.....	24
3.2.3.3 Fluorescentna mikroskopija.....	25
4 Rezultati	27
4.1 Test aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze	27
4.2 Proučevanje celic pod invertnim svetlobnim mikroskopom	31
4.3 Štetje celic	35
4.4 Fluorescentna mikroskopija	37
4.4.1 Barvanje jeder in aktinskih vlaken.....	37
4.4.2 Barvanje membrane.....	43
5 Razprava	46
6 Sklep	52
7 Literatura	54

Povzetek

V diplomski nalogi smo na celičnih linijah keratinocitov in fibroblastov proučevali citotoksičnost lamelarnih tekočih kristalov za dermalno uporabo. Pripravili smo dva sistema tekočih kristalov iz netoksičnih in biokompatibilnih sestavin: lecitina, Tweena 80, izopropilmiristata in bidestilirane vode z različnim razmerjem oljne in vodne faze. Učinke smo proučevali po kratkotrajni (4h) in dolgotrajni (24h) izpostavitvi v koncentracijskem območju od 0,5 mg/ml do 5 mg/ml glede na kontrolne (netretirane) celice. Ugotovili smo, da je vpliv tekočih kristalov časovno in koncentracijsko odvisen. S testom aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze smo koncentracijo 0,5 mg/ml opredelili kot subtoksično, saj je bila celična proliferacija primerljiva s kontrolo. Odkrili smo, da se fibroblastom po 4h izpostavitve tekočim kristalom proliferacija sicer zniža, vendar se po dolgotrajnejši izpostavitvi pri najnižji koncentraciji (0,5 mg/ml) obnovi in je primerljiva s kontrolo. Vpliv tekočih kristalov na metabolno sposobnost celic v primerjavi z referenčnim iritantom SDS je bil značilno manjši (razen pri fibroblastih po 24h pri koncentraciji ≥ 2 mg/ml). Značilno razliko med sistemoma tekočih kristalov smo opazili le pri določenih koncentracijskih in časovnih točkah, in sicer je bila metabolna aktivnost višja za sistem z večjim deležem vode. Pri opazovanju morfoloških sprememb celic pod svetlobnim mikroskopom pri koncentraciji 0,5 mg/ml po 4h izpostavitve še nismo opazili sprememb, po 24h pa so bili posamezni keratinociti zaobljeni, gostota celic pa je bila še vedno enaka in celice so ohranile medsebojne povezave. Pri višjih koncentracijah so tako keratinociti kot fibroblasti postali bolj zaobljeni, začeli so se tudi odlepljati od podlage. Podobne značilnosti smo potrdili pod fluorescentnim mikroskopom, kjer smo opazovali celice s fluorescentno obarvanim jedrom in aktinom, kjer pa smo že pri koncentraciji 0,5 mg/ml opazili manjše morfološke spremembe v aktinskih vlaknih (odebeljeni mikrofilamenti). Rezultati štetja celic po barvanju s tripanskim modrilom se niso skladali z ostalimi rezultati, pri višjih koncentracijah oz. daljšem času izpostavitve je bil delež tako živih kot mrtvih celic majhen, opazili pa smo tudi razpadne fragmente celic. Pri fluorescentnem barvanju membrane smo zaznali opazne spremembe že pri konc. 0,5 mg/ml, vendar je potrebna nadaljnja optimizacija izvedbe zaradi težav pri proučevanju živih celic. Zaključimo lahko, da so rezultati diplomskega dela obetavni predvsem z vidika, da so celične linije občutljivejši eksperimentalni modeli v primerjavi z aplikacijo na koži. Zmanjšanje metabolne sposobnosti ter morfološke spremembe celic pri višjih koncentracijah tekočih kristalov pa so najverjetneje posledica delovanja površinsko aktivnih snovi, tj. poškodb

membrane ter denaturacije aktina ob prehodu v notranjost celic. Smiselno bi bilo nadaljnje vrednotenje biološke sprejemljivosti tekočih kristalov na rekonstruiranih kožnih modelih.

Ključne besede: lamelarni tekoči kristali, citotoksičnost, keratinociti in fibroblasti, fluorescentna mikroskopija, morfologija celic

Abstract

In diploma we evaluated the cytotoxicity of lamellar liquid crystals for dermal application on keratinocyte and fibroblast cell lines. Two systems of liquid crystals were made using non-toxic and biocompatible components: lecithin, Tween 80, isopropyl myristate and bidistilled water at different ratios. The effects were evaluated after short-term (4h) and long-term (24h) exposure in concentration range of 0,5 – 5 mg/ml and compared to control (untreated) cells. The observed effects were time and concentration dependent. Using mitochondrial dehydrogenase activity assay the concentration 0,5 mg/ml was confirmed as sub-toxic since the cell proliferation was comparable to control cells. The cell proliferation was lower for fibroblasts following 4h exposure to liquid crystals however the complete recovery was obtained following long-term treatment at lowest concentration (0,5 mg/ml) tested. Liquid crystals' influence on metabolic activity was significantly lower when compared to sodium dodecyl sulfate, i.e. reference irritant (except for fibroblasts after 24h exposure at concentrations ≥ 2 mg/ml). Significant difference between the two systems of liquid crystals was observed only at certain concentration and time points where metabolic activity was higher for system containing more water. No changes were observed under inverted light microscope at concentration 0,5 mg/ml following 4h of treatment, whereas after 24h some keratinocytes were more rounded nonetheless no changes in cell numbers and intercellular connections were observed. At higher concentrations increasing curvaceousness and detachment of both keratinocytes and fibroblasts was observed. Using fluorescent dyes for nucleus and actin fibers similar changes were observed under fluorescent microscope, however slight morphologic changes in actin filaments (thicker microfilaments) were noticed already at concentration 0,5 mg/ml. Results of cell count assay (using trypan blue stain) were not consistent with results of other assays – at higher concentrations or long-term treatment the ratio of live and dead cells was low, also fragments of cells were observed. Changes of cell membrane were observed under fluorescent microscope at concentration 0,5 mg/ml but further optimization of procedure is needed due to difficulties that arise from observing live cells. The results appear to be promising when considering the facts that irritant responses in cell lines are much higher than *in vivo* and that morphologic changes can most likely be attributed to cell membrane damage due to surfactants causing the penetration inside the cell and consequently denaturation of actin. Further evaluation of skin compatibility of liquid crystals on reconstructed human epidermis is logical continuation of the research.

Key words: lamellar liquid crystals, cytotoxicity, keratinocytes and fibroblasts, fluorescent microscopy, cell morphology

Seznam okrajšav

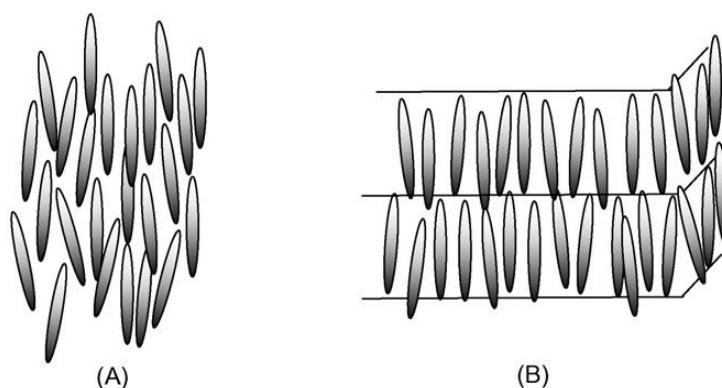
3D	tridimenzionalni
AFM	mikroskop na atomsko silo
ATP	adenozin trifosfat
DMSO	dimetilsulfoksid
DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija
IL	interlevkin
IR	infrardeče
LDH	laktat-dehidrogenaza
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2 <i>H</i> - tetrazolij
PAS	površinsko aktivna(e) snov(i)
RHE	rekonstruiran človeški kožni model
SDS	natrijev dodecilsulfat
SEM	vrstični (»scanning«) elektronski mikroskop
SIT	skin irritation test (test iritacije kože)
TEM	presevni (transmisijski) elektronski mikroskop
TK	tekoči kristali
TNF	tumorje nekrotizirajoči faktor

1 Uvod

1.1 Tekoči kristali

Tekoči kristali predstavljajo vmesno stanje med trdnim in tekočim, imenujemo jih tudi mezofaze. Izkazujejo tako lastnosti tekočin (pretok) kot kristalov (dvolomnost, urejenost, mehanska stabilnost). Molekule, ki tvorijo mezofaze, imenujemo mezogeni. Mezogeni so pogosto pomožne snovi, kot so površinsko aktivne snovi, pa tudi nekatere zdravilne učinkovine npr. soli organskih kislin ali baz. Celične membrane imajo strukturo tekočih kristalov, slednjo izkazujejo tudi lipidne oblike v živčevju ter možganih (1-3).

Glede na način nastanka jih delimo na termotropne in liotropne. Medtem ko liotropni tekoči kristali nastanejo z dodajanjem topila trdni snovi, termotropni tekoči kristali nastanejo pri segrevanju, ki mu sledi nadzorovano ohlajanje. Termotropni tekoči kristali so navadno enokomponentni sistemi, ki jih glede na razporeditev molekul delimo v dve podskupini: smektične ter nematične. Pri nematičnih so molekule linearno orientacijsko urejene in enako usmerjene, pri smektičnih pa so dvodimenzionalno orientacijsko urejene in se združujejo v plasti (slika 1). Kiralni mezogeni se zaradi steričnega učinka orientirajo v vijačnico, kar imenujemo holesterična nematična faza. Nematični tekoči kristali so občutljivi na električni tok, zato se uporabljajo v LCD zaslonih. Zaradi anizotropnih lastnosti lahko na njihovo orientacijo vpliva že šibko električno ali magnetno polje, kar je osnova zaslonov na digitalnih urah, žepnih računalnikih, televizijskih in računalniških zaslonov. Smektični kristali imajo večji pomen v farmaciji (1, 4, 5).



Slika 1: Prikaz razporeditve molekul v (A) nematični in (B) smektični mezofazi (4).

1.1.1 Liotropni tekoči kristali

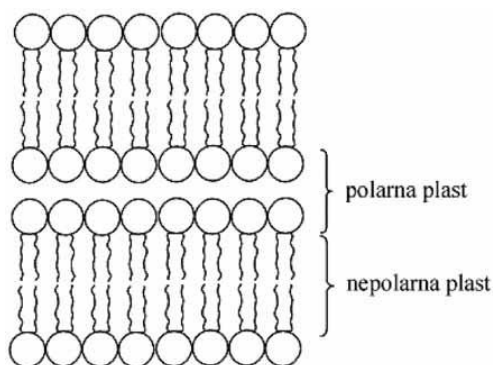
Liotropni tekoči kristali nastanejo z dodajanjem določenega topila zaradi interakcij med komponentami, ki so običajno voda, olje in PAS, ki morajo biti v ustreznem razmerju, kar lahko določimo s pomočjo trikomponentnega faznega diagrama. Molekule, ki tvorijo liotropne tekoče kristale, so podolgovate in največkrat amfifilne. V vodi se orientirajo tako, da so s hidrofilnimi glavami v stiku z medijem, hidrofobni repi pa so obrnjeni navznoter zaradi hidrofobnih interakcij. Pri različnem razmerju komponent nastanejo različne faze tekočih kristalov, fazne prehode pa lahko dodatno povzroči tudi spreminjanje temperature. Pri liotropnih tekočih kristalih ne tvorijo mezogenov same molekule, temveč njihovi hidrati oziroma solvati, ki so lahko različnih oblik, npr. cilindri ali stožci. Cilindri se uredijo v plasti, kar vodi do nastanka lamelarnih tekočih kristalov, kjer se izmenjujejo polarni in nepolarni sloji. Voda in vodne raztopine učinkovin se lahko vključijo v polarni sloj, nepolarne molekule pa v nepolarni sloj. S povečevanjem koncentracije topila se paličasta oblika solvatirane molekule spremeni v stožčasto, kar spremeni obliko mezofaze v heksagonalno ali inverzno heksagonalno, odvisno od polarnosti molekule in topila. Pri tem se oblikujejo miceli (polarne skupine molekul so lahko obrnjene navzven ali navznoter), ki se heksagonalno uredijo. Z nadaljnjim dodajanjem topila pride do nastanka kubičnih ali inverznih kubičnih faz. Med prehodom iz lamelarne v (inverzno)heksagonalno fazo pa lahko pride tudi do nastanka drugih struktur. To je odvisno od same molekule in koncentracije mezogena ter lipofilnih oz. hidrofilnih lastnosti topila. Mezofaze so glede na konsistenco poltrdne ali pa viskozne tekočine (1-4, 6). Njihova izdelava je relativno enostavna, nastanejo ob majhnemu vnosu energije in so termodinamsko stabilne, torej tudi po daljšem času ne pride do ločitve faz (7).

1.1.2 Uporaba tekočih kristalov v farmaciji

Tekoči kristali spadajo med koloidne disperzne sisteme z velikostjo struktur 10 – 400 nm. V farmaciji se uporabljajo kot nosilni sistemi za oralno, nazalno, rektalno, vaginalno, dermalno in transdermalno ter parenteralno uporabo. Kubične faze liotropnih tekočih kristalov so primerne za dostavo ne le manjših molekul zdravilnih učinkovin temveč tudi večjih proteinov (8, 9). Tudi reverzne heksagonalne faze imajo velik potencial za dostavo peptidnih učinkovin (10).

Tekoči kristali so pogosto del mikrostrukture pripravkov za dermalno uporabo (11). Površinsko aktivne snovi, ki se uporabljajo kot emulgatorji, namreč tvorijo micelle, pri višjih koncentracijah pa se miceli preoblikujejo v tekoče kristale (4). Tekoči kristali se uporabljajo tudi za zaščito občutljivih substanc, kot so vitamini, antioksidanti in olja, saj se molekule vgradijo med lamelarne plasti in so tako zaščitene pred svetlobo. Izboljšajo fizikalno stabilnost krem, ker se poveča viskoznost in zato zmanjša flokulacija, flotacija in agregacija (11).

Lamelarni liotropni tekoči kristali so termodinamsko stabilni ter strukturno podobni lipidnim dvoplastem med korneociti v koži (slika 2), zato predstavljajo enega izmed novejših dermalnih in/ali transdermalnih dostavnih sistemov. Z uporabo neionskih PAS lahko reverzibilno povečamo dermalno absorpcijo skozi kožo, ne da bi povzročili ireverzibilno iritacijo. V določenih primerih lahko povečajo topnost učinkovin, ki so sicer netopne ali slabo topne v vodi, saj PAS omogočijo njihovo solubilizacijo (7). Sproščanje vgrajenih učinkovin iz lamelarnih faz poteka z difuzijo. Hitra sprostitvev učinkovine iz oljne faze je onemogočena, ker so tekoči kristali večplastni, z izmenjavajočimi se hidrofilnimi in hidrofobnimi sloji (12). Zaradi lamelarne strukture se večina vode vgradi med plasti v hidrofilna področja, kar povzroči manjše izhlapevanje vode kot v tradicionalnih hidrofilnih kremah, to pa omogoča dolgotrajnejšo hidratacijo kože po nanosu. Tekoči kristali imajo tudi primerno konsistenco za dermalno uporabo ter privlačen izgled (7).



Slika 2: Lamelarna struktura tekočih kristalov: shematski prikaz ureditve molekul v izmenjavajoče se plasti.

Patentiranih ali v postopku patentne priprave je že nekaj tekočih kristalov za dermalno uporabo:

- Tekoči kristali emulzijskega tipa, ki vsebujejo ciklosporin in bi se lahko uporabljali za zdravljenje kožnih bolezni, kot sta luskavica in atopijski dermatitis (US Patent Application No: 2010/0190,695). Sestavine teh tekočih kristalov so: neionska

hidrofilna in hidrofobna PAS, olje, maščobna kislina in maščobni alkohol ter vodotopni poliol.

- Tekoči kristali v obliki gela, iz polioksietilengliceriltriolatea, propilenglikola, IPM in soli hialuronske kisline, namenjeni za transdermalno aplikacijo hormonske nadomestne terapije (US 10/575,145) (12).

1.2 Iritacija kože: nastanek in vrednotenje

1.2.1 Zgradba kože

Koža predstavlja glavni organ za zaščito telesa. Preprečuje namreč vstop škodljivim mikroorganizmom in tujim snovem v telo ter ga varuje pred izgubo telesne tekočine. Sestavljena je iz dveh plasti: zunanje vrhnjice ali epidermisa in debelejšje vezivne usnjice ali dermisa, ki leži pod njo. Pod njima je podkožje iz rahlega veziva, ki vsebuje veliko maščobnih celic, krvno in limfno žilje ter živce.

Koža je zgrajena iz večskladnega ploščatega poroženevajočega epitelija. Glavne epiteljske celice so keratinociti, med katerimi najdemo še melanocite, Langerhansove in Merkllove celice. Najštevilnejše celice v usnjici so fibroblasti, maščobne celice in makrofagi. Med njimi so kolagenska, elastična in retikulinska vlakna. V tej plasti se nahajajo tudi krvne in limfne žile, živčni končiči, lasni folikli in kožne žleze (znojnice, dišavnice in lojnice) (13).

Vrhnjica je debela le 15 – 20 μm , a predstavlja učinkovito bariero za dermalno absorpcijo (14). Sestavlja jo 12-20 plasti keratinocitov, ki se premikajo iz temeljne plasti proti površini kože in se pri tem diferencirajo. V temeljni plasti (*stratum basale*) se celice delijo in omogočajo obnavljanje kože. Premikajo se proti površini in preidejo v trnasto plast (*stratum spinosum*), nato v zrnato plast (*stratum granulosum*), kjer keratinociti izgubijo celične membrane in jedra (15, 16). Zunanja rožena plast (*stratum corneum*) predstavlja glavno bariero za difuzijo skozi kožo. Sestavljajo jo korneociti, ki so mrtvi keratinociti, ploščate heksagonalne oblike, bogati s filamentom keratinom. Urejeni so po principu opek v lamelnem kristaliničnem matriksu lipidov, ki jih sintetizirajo keratinociti v spodaj ležeči zrnati plasti (15). Lipidni dvosloj je zgrajen iz ceramidov, maščobnih kislin ter holesterola in njegovih estrov in tvori gelska in semikristalinična področja ter domene tekočih kristalov (17). Zaradi take urejenosti korneocitov v lipidnem matriksu je rožena plast 1000-krat manj permeabilna kot ostale biološke membrane (18). Preprečuje vdor tujih snovi v kožo in izhlapevanje vode skozi kožo ter delno varuje pred UV sevanjem (16).

1.2.2 Iritacija kože

Ob stiku kože z dražečimi snovmi pride do vnetne reakcije, imenovane kontaktni dermatitis, ki je ena najbolj pogostih kožnih bolezni (19, 20). Tako pri iritativnem kontaktnem dermatitisu kot tudi pri alergijskem kontaktnem dermatitisu lahko pride do eritema, edema, suhe in razpokane kože, luščenja kože, srbenja in bolečine. Nekateri od teh znakov so posledica vnetne reakcije in spremenjene homeostaze. Najbolj pogost vzrok vnetne reakcije v koži je iritacija, ki je lokalna neimunogena vnetna reakcija, pri čemer se aktivirajo imunski mehanizmi, ne pa tudi spominske T-celice ali antigensko specifični imunoglobulini kot pri alergijskem kontaktnem dermatitisu (19, 21). Iritativni kontaktni dermatitis je lokalizirano vnetje kože zaradi stika s toksičnimi substancami, kot so kovine, čistilna sredstva, detergenti, kozmetična sredstva, industrijske kemikalije in lateks. Glede na čas nastanka reakcije lahko iritacijo opredelimo kot akutno ali kronično (20). Akutni iritativni kontaktni dermatitis se razvije že po kratkotrajnejši izpostavitvi iritantu. Patološke spremembe so omejene na predel kože, ki je bila v stiku z njim. Pojavi se eritem, včasih tudi mehurčki, ki se lahko spremenijo v plitve ulkuse ali nekroze. Vnetje se odraža s pekočim občutkom ali zbadanjem. Kronični iritativni kontaktni dermatitis pa se razvije po dolgotrajni ali ponavljajoči izpostavitvi kože blagim iritantom. Izpostavljena področja kože se izsušijo, razpokajo in vnamejo (19).

Površinsko aktivne snovi kot iritanti

Iritacija kože je odvisna od mnogih faktorjev: koncentracije, časa in pogostosti izpostavitve, mesta izpostavitve na koži, stopnje penetracije in intrinzičnega toksičnega potenciala snovi.

Snovi v pripravkih za dermalno uporabo, ki najpogosteje povzročijo neželene učinke na koži, so površinsko aktivne snovi (npr. emulgatorji ali solubilizatorji), ki interagirajo z lipidi v koži. Sposobnost PAS, da povzročijo iritacijo, je povezana s kemijsko strukturo molekule (21). V splošnem je sposobnost snovi za povečanje absorpcije premosorazmerna s sposobnostjo, da poškoduje kožo. Poruši namreč urejenost lipidnih dvoslojev v roženi plasti ali poškoduje keratinocite. Rožena plast je fiziološko mrtev del kože, vendar se hkrati s spremenjeno ureditvijo lipidnega dvosloja zmanjša barierna vloga kože, zato lahko snovi prehajajo v globlje plasti epidermisa, kjer pridejo v stik z živimi keratinociti in delujejo citotoksično. Zmanjšana barierna funkcija kože se lahko odraža tudi kot povečana transepidermalna izguba vode (21-23).

V imunskem odzivu vrhnjice igrajo pomembno vlogo keratinociti. Po stiku z iritantom se iz keratinocitov začnejo sproščati vnetni citokini ali vnetni mediatorji, kot so ATP in prostaglandini. Vnetno reakcijo povzroči kaskada arahidonske kisline in citokini, ki se sproščajo iz viabilnih keratinocitov in fibroblastov. Vnetni mediatorji aktivirajo celice imunskega odziva in povzročijo dilatacijo kapilar, zato se iritacija kože kaže tudi kot rdečica in edem. Uravnavanje vnetnega odziva zavisi od komunikacije med keratinociti in fibroblasti.

PAS lahko porušijo strukturo celične membrane in tako povzročijo iztekanje citoplazme. V citoplazmi keratinocitov se nahaja vnetni citokin IL-1 α , ki je začetni sprožilec vnetne kaskade. Ob sprostitvi iz celice povzroči indukcijo ostalih citokinov (IL-6 ter IL-8) in aktivira fosfolipazo A2, ki je glavni encim v kaskadi arahidonske kisline. Pri regulaciji vnetnega odziva sodeluje tudi kalcij, ki posredno aktivira kaskado arahidonske kisline preko translokacije fosfolipaze A2 iz citoplazme na membrano. Iritanti, ki ne poškodujejo celične membrane, pa najverjetneje ne sprožijo vnetnega odziva samo preko sprostitve IL-1 α , temveč tudi preko nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti, ki povzročijo oksidacijo nukleinskih kislin, proteinov in lipidov v membrani, zato pride do spremenjene ekspresije genov in citotoksičnih učinkov (20, 21, 24-26).

Neionske PAS so pri dermalni aplikaciji manj problematične kot kationske in anionske, kar so potrdili tako z *in vitro* kot *in vivo* študijami (27). Najpogosteje uporabljane PAS v pripravkih za dermalno uporabo so fosfolipidi (lecitin) z zelo nizko toksičnostjo in pa mnoge neionske PAS, kot so polisorbati (Tweeni[®]), estri sorbitana (Spani[®]) in poligliceril-6-izostearat (Plurol Isostearique[®], Plurol Oleique[®]) (14). V prihodnosti se bodo morda uveljavile tudi druge novejšje PAS, za katere so v *in vitro* ter *in vivo* študijah dokazali, da ne povzročajo iritacije. Savić in sodelavci so proučevali nove formulacije za dermalno uporabo, pri katerih so kot emulgator uporabili emulgirajoči vosek naravnega izvora – mešanico cetearilglukozida in cetearil alkohola. Vgradili so tudi dve modelni učinkovini; natrijev diklofenak in kofein. Formulacije so se izkazale kot perspektivne za uporabo v farmaciji, z MTT testom na kožnem modelu ter *in vivo* študiji na 10 zdravih prostovoljках pa so pokazali, da so varne za dermalno uporabo (28).

Lecitin se pogosto uporablja za stabilizacijo emulzij. Weyenberg in sodelavci so z uporabo MTT testa dokazali, da submikronske emulzije z lecitinom po 18h izpostavitvi ne povzročajo citotoksičnosti na celičnih linijah keratinocitov in fibroblastov (27). Santos Maia in sodelavci so ugotovili, da Lipoid S75 (lecitin) ne vpliva signifikantno na viabilnost

fibroblastov in keratinocitov po 24h izpostavitvi (29). Dreher in sodelavci so izvedli študijo, v kateri so proučili mikroemulzijski gel iz lecitina, izopropilpalmitata in vode za transdermalno aplikacijo indometacina in diklofenaka. *In vivo* test na človeški koži ni pokazal značilne iritacijske reakcije v času aplikacije 1-5 dni, z *in vitro* testom na roženi plasti človeške kože pa so s pomočjo IR spektroskopije s Furierjevo transformacijo in DSC ugotovili, da že po 1 dnevu pride do prerazporeditve medceličnih lipidov, predvsem zaradi izopropilpalmitata. SEM pri nizkih temperaturah je po petih dneh izpostavitve testiranemu gelu pokazala opazne spremembe strukture medceličnih lipidov, morfologija korneocitov pa je ostala nespremenjena. S sproščanjem skozi Franzove difuzijske celice so ugotovili, da je hitrost difuzije obeh učinkovin iz pripravljenega gela ustrezna in gel primeren za (trans)dermalno dostavo učinkovin, prerazporeditev lipidov pa omogoči povečano absorpcijo (30).

Tornier in sodelavci so izvedli *in vitro* test na rekonstruiranem kožnem modelu SkinEthic, kjer so preverjali iritabilnost različnih snovi z MTT testom, meritvami sproščanja IL-1 α ter proučevanjem histologije. Med drugim so testirali Tween 80 (Sigma) in ga opredelili kot neiritabilno snov, saj so meritve odražale visoko viabilnost celic in normalno histologijo, prav tako niso opazili povečanega sproščanja IL-1 α (31).

1.2.3 Vrednotenje iritantov

Za vrednotenje iritantov so včasih uporabljali Draizov test na zajcih in morskih prašičkih. Testirano snov pri tem testu nanesejo 3 živalim na obrat predel kože na hrbtu, pokrijejo z obližem za 4 ure in spremljajo klinične znake po 24h, 48h in 72h. Ta test je mnogokrat boleč in škodljiv za živali, kar poudarjajo tudi organizacije, ki se zavzemajo za pravice živali. Dejstvo je tudi, da odziv na živalski koži ni nujno enak odzivu na človeški koži. Po 6. amandmaju kozmetične direktive Evropske unije (93/35/EEC) je zato sledil pospešen razvoj alternativnih modelov za proučevanje iritacije, korozivnosti in fototoksičnosti. Draizov test so tako nadomestile *in vitro* metode na enoplastnih celičnih linijah ter na rekonstruiranih človeških kožnih modelih (3D kožnih modelih) (21, 22, 26, 32-35).

Pri razvoju *in vitro* metod za testiranje iritacije so se osredotočili na keratinocite, saj imajo te celice pomembno vlogo v začetni stopnji iritacije kože in tudi pri uravnavanju in prilagajanju tega procesa (35). Ker pri *in vitro* testiranju ne moremo oceniti vidnih simptomov, je za ocenjevanje iritacije potrebno izbrati ustrezne parametre (21). Za oceno iritacije se pri *in vitro* modelih določa sproščene citokine (IL1 α , TNF α) v supernatantu s

pomočjo ELISE in/ali preverja citotoksičnost s proučevanjem proliferacije keratinocitov oziroma izgube integritete celične membrane.

Pogosti parametri, s katerimi merimo citotoksičnost, so (20, 36, 37):

- *privzem barvila v celico, npr. nevtralnno rdečega*: Žive celice s pomočjo aktivnega transporta barvilo privzamejo v celico in ga vgradijo v lizosome. Sposobnost proliferacije celic določimo posredno preko merjenja absorbance.
- *sproščanje encimov, npr. laktat-dehidrogenaze (LDH)*: Celice s poškodovano membrano sproščajo v okolico LDH. Z dodatkom ustreznega reagenta lahko določimo število poškodovanih celic tako, da izmerimo fluorescenco nastalega produkta.
- *MTT redukcijski test, ki odraža aktivnost mitohondrijske dehidrogenaze*: Celična poškodba se odrazi tudi v izgubi celične metabolne aktivnosti, zato lahko za preverjanje citotoksičnosti uporabimo test redukcije MTT (27). Viabilne celice proizvajajo NADH in NADPH molekule, ki omogočijo redukcijo tetrazolijeve spojine v obarvan produkt, ki ga kolorimetrično določimo. MTS tetrazolij je spojina, podobna MTT tetrazoliju, vendar je produkt, ki nastane po redukciji, topen v celičnem mediju, zato ni potreben dodatek izopropanola, ki poveča topnost nastale soli, kot je to v primeru MTT tetrazolija (37). MTT test za vrednotenje citotoksičnosti je preprost, uporaben in cenovno ugoden test za pridobitev osnovnih informacij o iritabilnosti snovi oz. preiskovanih sistemov, kljub temu da rezultati niso povsem skladni z rezultati testiranja na 3D modelih (36, 38).

Evropski center za validacijo alternativnih metod (ECVAM) je potrdil uporabo *in vitro* testov na rekonstruiranih kožnih modelih kot ustrezne modele za predvidevanje iritacije na koži in kot ustrezno zamenjavo testiranju na živalih. Odobreni modeli za testiranje so: *EpiSkin SIT*, *EpiDerm SIT*, *Modified EpiDerm SIT* in *SkinEthic RHE* (20, 39, 40). Rekonstruiran kožni model je večplasten model diferenciranih človeških keratinocitov, ki posnema zgradbo človeškega tkiva (41). Keratinociti rastejo na sintetičnem matriksu ali na kolagenskem matriksu s fibroblasti. Na stiku medija z zrakom se razvije rožena plast, ki predstavlja funkcionalno bariero (21). Nekateri so razvili celo modele, ki poleg zgradbe posnemajo tudi biološki odziv kože. Model StrataTest vsebuje tako povrhnjico iz keratinocitov kot tudi usnjico iz fibroblastov, ki sta ločeni z intaktno bazalno membrano. Med celicami povrhnjice in usnjice je omogočena parakrina signalizacija. Rekonstruiran kožni model po protokolu izpostavimo proučevani substanci, nato pa lahko celično

proliferacijo proučujemo na različne načine, npr. z merjenjem aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze ali merjenjem sproščenih vnetnih citokinov, kot je IL-1 α . (42).

Testiranje na rekonstruiranem kožnem modelu daje primerljive rezultate s testiranjem iritantov *in vivo* (33). *In vivo* študije akutne iritacije kože se izvajajo klinično na koži prostovoljcev s pomočjo obližev, kot pozitivno kontrolo uporabimo SDS (41). Pri tem je potrebno omeniti, da je prodiranje snovi v globlje plasti pri rekonstruiranem kožnem modelu 10 – 30 \times hitreje kot *in vivo*, kar je slabost za testiranje sistemov, ki so blažji iritanti. Za ocenjevanje vidnih simptomov iritacije je prav tako bistvena interakcija z endotelijem, vnetnimi celicami, živčnimi končiči itd., kar je pomanjkljivost rekonstruiranih kožnih modelov (21).

Rezultati, ki jih dobimo pri testiranju citotoksičnosti na enoplastnih celičnih kulturah in pri testiranju iritacije na rekonstruiranem kožnem modelu, niso povsem enaki, saj so celične kulture bolj občutljiv sistem, ker ni prisotne poroženele plasti, ki ima vlogo zaščitne bariere. Testi citotoksičnosti pa lahko dajo bolj realen rezultat potencialne iritabilnosti v primeru, ko je koža poškodovana in zato barierna funkcija okrnjena (24, 29). Bistvena prednost 3D modela je predvsem v tem, da lahko testiramo iritabilnost formulacij v enaki obliki, kot bi jih aplicirali na kožo (36). A vendar je te modele težje pripraviti in so dražji kot celične linije, zato se celične kulture pogosteje uporabljajo v začetnih testiranjih (24, 36).

Kumulativno iritacijo je *in vitro* težko proučevati, saj *in vitro* modeli ne živijo dovolj dolgo, da bi lahko nanos testirane snovi večkrat ponovili, manjka pa tudi luščenje vrhnjice na 3D kožnih modelih (36).

1.2.4 Celične linije keratinocitov in fibroblastov ter proučevanje morfologije

Fibroblasti so celice veziva, vretenaste ali zvezdaste oblike, z velikim, ovalnim jedrom, ki tvorijo kolagenska, retikulinska in elastična vlakna ter proteoglikane (43). V 2D celičnih modelih, torej enoplastnih celičnih kulturah, so fibroblasti sploščeni (44). So podolgovati, vretenaste oblike, z izrazitim jedrom, meje celic pa ne moremo jasno razločiti (45). Oblika in morfologija pa sta odvisni tudi od podlage, na kateri celice rastejo (46).

Keratinociti so glavne celice vrhnjice. V celičnih kulturah rastejo v kolonijah in se namnožijo v več plasteh. Celice so sploščene, poligonalne oblike in ne tvorijo zrnate in rožene plasti. Celični cikel traja okoli 22h, zato so taki sistemi nagnjeni k hiperproliferaciji (45).

Citotoksični učinki na celicah po izpostavitvi določeni snovi nastanejo, ker le-ta zmoti celično strukturo oziroma celične procese, ki so bistveni za preživetje, delovanje ali proliferacijo celic. S kvantitativnimi *in vitro* testi lahko spregledamo komaj opazne celične spremembe, npr. v strukturi celic oz. celičnih organelih, ki so bistvene za normalno delovanje celice in lahko sčasoma vodijo do okvar v znotrajceličnih procesih. Zato je potrebno citotoksične učinke proučevati tudi na ravni morfologije celic, kar nam omogočajo različne mikroskopske tehnike. Večje spremembe, kot so nastanek mehurčkov ali sprememba oblike celic, lahko v enoplastnih kulturah opazimo že pod invertnim svetlobnim mikroskopom. Manjše spremembe v celici, kot je npr. preoblikovanje citoskeleta, pa lahko proučujemo z uporabo specifičnih fluorescentnih barvil. Druge možne mikroskopske tehnike so še TEM, ki je tudi edina metoda za opazovanje nabrekanja mitohondrijev, ki je znak hude poškodbe celice, ter SEM, s katero lahko proučujemo spremembe na površini celic, kot so nastanek mehurčkov, izguba mikrovilov, tvorba filopodijev in skrčenje celic. Te spremembe so odraz ireverzibilne poškodbe plazemske membrane in vodijo v porušenje celične homeostaze ter sčasoma v smrt celice. Apoptotičnim celicam se zmanjša adhezivnost, oblika postane okrogla in površina celice gladka (47). Mikroskopska metoda, ki se je izkazala kot uporabna za proučevanje korneocitov, je tudi mikroskopija na atomsko silo, s pomočjo katere lahko proučujemo topologijo in rigidnost celic (48).

Citoskelet celice je dinamična struktura, bistvena za ohranitev celične morfologije in funkcije (49). Pomembno vlogo v celičnih procesih, kot so migracija, morfogeneza, endocitoza in fagocitoza, ima aktin (50). Aktin je protein, ki je v velikih količinah prisoten v številnih evkariontskih celicah. Obstaja v dveh oblikah: monomerni (globularne oblike, zato G-aktin) ter polimerni (filamentni, zato F-aktin) (51). F-aktin je glavna komponenta v citoskeletu lamelipodijev in filopodijev. Nahaja se tik pod plazemsko membrano keratinocitov, s katero je tudi povezan in zato vpliva na gibanje celic (52).

Pri proučevanju citotoksičnosti šest valentnega kroma, ki sicer povzroča kožne ulceracije in alergijski dermatitis, so na celičnih linijah človeških dermalnih fibroblastov ugotovili, da povzroči skrčenje celic, reorganizacijo citoskeleta in izgubo gibalne aktivnosti, te spremembe pa so časovno in koncentracijsko odvisne. Poleg sprememb v F-aktinskih vlaknih, je prišlo tudi do sprememb v jedru. Pri višjih koncentracijah povezav med posameznimi celicami praktično ni bilo opaziti (53).

Fluorescentna mikroskopija

Pri fluorescentni mikroskopiji opazujemo vzorce, ki vsebujejo molekule s sposobnostjo fluorescence. Take molekule imenujemo fluorokromi. Ko fluorokrom obsevamo s svetlobnim žarkom ustrezne valovne dolžine, pride v atomu do vzbujanja elektronov na višje energijske nivoje. Zelo hitro se elektroni vrnejo na nižje energijske nivoje, pri čemer oddajo svetlobo z manjšo energijo, torej večjo valovno dolžino, v vidnem delu spektra. Čas med absorpcijo in emisijo fotona je navadno krajši od mikrosekunde. Da dosežemo maksimalno jakost fluorescence, fluorokrom ekscitiramo pri valovni dolžini blizu vrha ekscitacijske krivulje. To omogoča filter, ki prepušča eksitacijsko svetlobo zelene valovne dolžine. Tudi emitirana svetloba potuje skozi filter, ki prepušča večji spekter valovnih dolžin, vključno z valovno dolžino emitacijskega maksimuma. Zaradi teh filtrov skozi okular na črnem ozadju vidimo le tiste strukture, ki fluorescirajo. Fluorescentni mikroskopi so povezani z računalnikom, kar omogoča bolj sofisticirano uporabo in hitro pridobivanje digitalnih posnetkov vzorca.

Za proučevanje celičnih struktur uporabimo fluorescentna barvila, ki se specifično vežejo na celične strukture in imajo značilno razmerje absorpcije in emisije fotonov. Uporaba različnih fluorokromov nam omogoča hkratno vizualizacijo različnih celičnih komponent, ki same po sebi nimajo sposobnosti fluoresciranja (54, 55).

Tako so pri proučevanju morfoloških sprememb na celični liniji iz opičje ledvice po izpostavitvi snovem, ki povzročajo onesnaženje, npr. pentaklorofenolu (PCP), omogočili opazovanje več celičnih organelov z uporabo fluorescentnih barvil za mitohondrij (rodamin), endosome (akridin oranžno), aktinska vlakna (phalloidin-TRITC), mikrotubule (anti α -tubulin-FITC) ter centromere (anti CENP-E-TRITC). Odkrili pa so, da se celice po izpostavitvi PCP zaradi prerazporeditve citoskeleta zaobljijo in odlepijo od podlage (47).

V študiji, kjer so opazovali vpliv nanodelcev ZnO in TiO₂ na celični liniji keratinocitov po 3 mesecih izpostavljenosti, so morfološke spremembe proučevali s pomočjo fluorescentne mikroskopije in SEM. Fluorescentna mikroskopija je pokazala, da so imele celice po izpostavitvi 0,5 $\mu\text{g/ml}$ nanodelcev ZnO spremenjena aktinska vlakna v primerjavi s kontrolo. Namesto dolgih vlaken, so bile vidne aktinske »pike«. Pri visokih koncentracijah TiO₂ (10 $\mu\text{g/ml}$) je bilo manj povezav med celicami, pri ZnO pa je število celic močno upadlo, tako da so na preparatu težko našli celice za opazovanje. Jedro se je zgostilo, aktinskih vlaken pa skorajda ni bilo videti. Sklepali so, da je do spremembe aktina prišlo zaradi depolimerizacije ali pa je bila tvorba vlaken inhibirana, kar se kaže v spremenjeni

morfologiji in slabši adhezivnosti celic. Slike površine celic, posnete s SEM, so pokazale, da se je pri celicah, ki so bile 3 mesece izpostavljene nanodelcem s koncentracijo 5 $\mu\text{g/ml}$, povečalo število nanotubularnih povezav med celicami glede na kontrolo (56).

2 Namen dela

Namen diplomskega dela bo ovrednotiti citotoksičnost tekočih kristalov za dermalno uporabo na celičnih linijah keratinocitov in fibroblastov. Tekoči kristali na osnovi lecitina so bili razviti in strukturno ovrednoteni v okviru predhodnih raziskav na Katedri za farmacevtsko tehnologijo kot novi dermalni nosilni sistemi. V raziskavi nas bo zanimal vpliv dveh različnih sistemov tekočih kristalov, ki se razlikujeta v deležu oljne (izopropilmiristat) in vodne faze, medtem ko je delež emulgatorske zmesi (lecitin / Tween 80 = 1 / 1) enak. Oba sistema imata značilno lamelarno strukturo. Učinke tekočih kristalov na celicah bomo proučevali v koncentracijskem območju od 0,5 mg/ml do 5 mg/ml po kratkotrajni (4h) in po dolgotrajni (24h) izpostavitvi.

Potencialno citotoksičnost bomo vrednotili z različnimi parametri. S testom aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze bomo določili proliferacijo celic po izpostavitvi tekočim kristalom in SDS kot pozitivni kontroli. Preživetje celic bomo proučevali z uporabo tripanskega modrila in določili delež živih celic glede na kontrolo. Rast in spremembo oblike celic v kulturi bomo spremljali pod invertnim svetlobnim mikroskopom, vpliv na morfološke spremembe oblike celic in celičnih organelov pa bomo vrednotili s pomočjo fluorescentne mikroskopije. Pripravili bomo mikroskopske preparate, za katere bomo uporabili fluorescentna barvila za jedro, aktin in membrano ter spremembe spremljali glede na kontrolne netretirane celice.

3 Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1 Sestavine za izdelavo tekočih kristalov

- Tween 80 (Sigma-Aldrich Co., Nemčija)

Tween 80 z nelastniškim imenom polisorbat 80 je kemijsko polioksietilen 20 sorbitan monooleat; pridobivajo ga iz sorbitola, oleinske kisline in etilenoksida. Je hidrofilni neionski emulgator. Pogosto se uporablja v kozmetiki, prehrambni industriji ter v farmaciji za pripravo parenteralnih in dermalnih farmacevtskih pripravkov. Velja za netoksično in nedražečo snov pri dermalni uporabi, lahko pa povzroči draženje oči. Ima GRAS status, kar pomeni, da ga je Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA) opredelila kot varno snov (57, 58).

- Izopropilmiristat (Sigma-Aldrich Co., Nemčija)

Je ester miristinske kisline in propan-2-ola. Deluje emolientno in pospešuje absorpcijo skozi kožo. Uporablja se kot oljna faza poltrdnih sistemov ter kot topilo za nekatere snovi za dermalno uporabo. Je netoksičen in nedražeč, zato je pogosta sestavina kozmetičnih pripravkov in farmacevtskih pripravkov za dermalno uporabo. Najdemo ga npr. v kremah, losjonih, ličilih, suspenzijah za aplikacijo v uho, vaginalnih kremah (14, 57).

- Lipoid S-100 (Lipoid GmbH, Nemčija) – lecitin

Ime lecitin označuje kompleksno zmes fosfatidov, sestavljeno pretežno iz fosfatidilholina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina in fosfatidilinozitola, ter ostalih snovi, kot so trigliceridi, maščobne kisline in ogljikovi hidrati, njihov delež pa je odvisen od izvora in stopnje čistote lecitina (57, 59). Lecitin je komponenta celičnih membran, pridobivajo ga predvsem iz rastlinskih olj, najpogosteje iz sojinih semen, ter iz jajčnega rumenjaka. Uporablja se v prehrambni industriji in kozmetiki ter v farmaciji kot emulgator in stabilizator v parenteralnih in dermalnih pripravkih. V inzulinskih pripravkih za intranazalno aplikacijo poveča absorpcijo inzulina. Je biokompatibilen, pri dermalni uporabi pa ne povzroča draženja. Ima GRAS status (57).

Lipoid S-100 je prečiščena vrsta sojinega lecitina, ki vsebuje vsaj 94 % fosfatidilholina, v manjših količinah pa še fosfatidiletanolamin, lizofosfatidilholin, trigliceride, D-1- α -tokoferol in vodo (60).

- Bidestilirana voda

Bidestilirana voda je pridobljena s postopkom dvojne destilacije na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za farmacijo.

3.1.2 Gojenje celic in reagenti

- Celična kultura:
 - Keratinociti (NCTC2544), ICLC, (Univerza v Genovi, Italija)
 - Fibroblasti (149BR), ECACC / HPA
- Medij za gojenje keratinocitov in fibroblastov:

Minimum Essential Medium Eagle (Sigma-Aldrich Co., Nemčija) z dodatki:

 - 10 % fetalni goveji serum (Gibco[®], Life Technologies corporation, ZDA)
 - 1 % 2 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich Co., Nemčija)
 - 1 % neesencialne aminokislina (Sigma-Aldrich Co., Nemčija)
 - 1 % antibiotik (penicilin in streptomycin) in antimikotik (amfotericin B) (Sigma-Aldrich Co., Nemčija)
- Fosfatni pufer

Pripravili smo ga tako, da smo natehtali 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3,63 g Na₂HPO₄×12H₂O in 0,24 g KH₂PO₄. Soli smo raztopili v 800 ml bidestilirane vode, uravnali pH na 7,4 in nato dopolnili z vodo do 1 l. Raztopino smo sterilizirali v avtoklavu (Kambič Laboratorijska oprema, Semič, Slovenija) 20 min pri 121°C.
- Tripsin (0,25 % vodna raztopina) × EDTA (Promega Corporation, ZDA)

Tripsin je proteolitični encim (59), ki ga uporabljamo pri presajanju celic, da se celice odlepijo od podlage.
- MTS reagent: The CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent (Promega Corporation, ZDA)

Reagent vsebuje tetrazolijevo sol (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij) in reagent za sklapljanje elektronov (fenazin etosulfat) (61).

3.1.3 Mikroskopiranje

- Tripansko modrilo (Sigma, Nemčija)

Nepoškodovane žive celice barvila ne absorbirajo, poškodovane ali mrtve celice pa se obarvajo modro, saj barvilo z difuzijo prehaja v citoplazmo, kar omogoča ločevanje živih

in mrtvih celic oziroma štetje celic pod invertnim svetlobnim mikroskopom (62).

- Barvilo za jedra: *Hoechst (bisbenzimid H33342)* (Riedel de Haen, Nemčija)

Hoechst je barvilo, ki prehaja skozi celično membrano, se interkalira v mali žleb DNA in omogoča vizualizacijo jeder tako živih kot fiksiranih celic pod fluorescentnim mikroskopom. Barvilo eksitiramo z ultravijolično svetlobo, emitira pa modro svetlobo, kar opazujemo pod fluorescentnim mikroskopom s filtrom DAPI. Eksitacijski maksimum barvila je pri 350 nm, emisijski pa pri 461 nm (63).

- Barvilo za aktin: *Phalloidin, Fluorescein isothiocyanate labeled* (Sigma, Nemčija)

Fluorescentno barvilo fluorescein izotiocianat (FITC) je konjugirano na faloidin – toksin, izoliran iz gobe *Amanita phalloides*, ki se veže na polimerna in oligomerna aktinska vlakna, ne pa na monomerno obliko. Barvilo eksitiramo s svetlobo valovne dolžine okoli 495 nm, emitirano svetlobo pa opazujemo s filtrom FITC. Barvilo ima eksitacijski maksimum pri 495 nm, emisijski pa pri 520 nm, zato pod fluorescentnim mikroskopom vidimo aktinska vlakna zeleno obarvana (64).

- Barvilo za membrane: *CellMask™ Deep Red plasma membrane stain* (Invitrogen, Nemčija)

Molekula barvila je amfifilna, lipofilni del je odgovoren za vgradnjo molekule v celično membrano, negativno nabiti hidrofilni del pa je fluorokrom, ki omogoča vizualizacijo celične membrane pod fluorescentnim mikroskopom. Barvilo enakomerno obarva celično membrano, podatke pa je potrebno pridobiti v kratkem času (približno 30 min), saj v živih celicah sčasoma pride do vstopa barvila v celico. Eksitacijski maksimum barvila je pri 649 nm, emisijski pa pri 666 nm. Barvilo je raztopljeno v DMSO, s koncentracijo 5 mg/ml (65).

3.2 Metode

3.2.1 Priprava tekočih kristalov in raztopin tekočih kristalov

Na analitski tehtnici smo v erlenmajerico natehtali lecitin, Tween 80 in izopropilmiristat ter mešali na magnetnem mešalu, dokler nismo dobili homogene zmesi. Nato smo dodali ustrezno količino bidestilirane vode in zopet mešali na magnetnem mešalu do nastanka tekočih kristalov. Sestava obeh tekočih kristalov (1 in 2) je navedena v preglednici I.

Preglednica I: Sestava TK1 in TK2 (% (m/m)).

	TK1	TK2
lecitin	22,5 %	22,5 %
Tween 80	22,5 %	22,5 %
izopropilmiristat	30 %	17,5 %
bidestilirana voda	25 %	37,5 %

Raztopine tekočih kristalov smo pripravili tako, da smo v bučko natehtali ustrezno količino tekočih kristalov in do oznake dopolnili z medijem za keratinocite oziroma fibroblaste ter mešali na magnetnem mešalu, dokler se tekoči kristali niso povsem raztopili. Za testiranje tekočih kristalov na celičnih linijah smo pripravili raztopine z naslednjimi koncentracijami: 1 mg/ml; 2 mg/ml; 4 mg/ml ter 10 mg/ml. V posamezno vdolbinico s celicami v rastnem mediju smo dodali ustrezen volumen posamezne raztopine do končne koncentracije 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml oz. 5 mg/ml. Za končno koncentracijo 0,5 mg/ml smo tako v vdolbinico s 50 μ l medija dodali 50 μ l raztopine s koncentracijo 1 mg/ml in enako za ostale koncentracije.

3.2.2 Gojenje in presajanje celic

S celicami smo delali v čistih pogojih razreda 4 v komori z laminarnim pretokom zraka (LAF; Iskra PIO, tip M 12), ki je postavljena v prostoru, ki zagotavlja aseptične pogoje dela. Pretok zraka je bil 0,4 m/s, dimenzija filtra 1220 \times 610 \times 69mm. Pred začetkom dela smo vse površine v LAF komori obrisali s 70 % (v/v) etanolom, prav tako tudi vse potrebščine, ki smo jih uporabljali pri delu v komori.

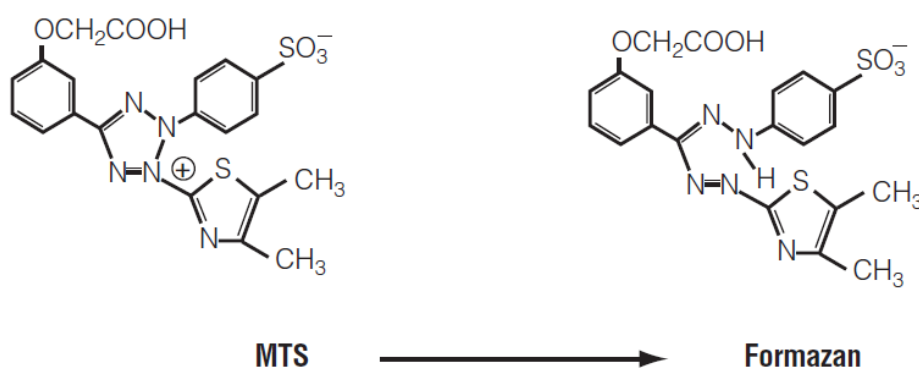
Celične kulture smo gojili v ustreznem mediju v polistirenski plošči s površino 75 cm² (TPP[®] Techno Plastic Products, Transadingen, Švica) v inkubatorju (Sorvall[®] Heraeus, Kendro Laboratory Products, Nemčija) pri 37°C v vlažni atmosferi s 5 % CO₂. Ko so se namnožile do te mere, da so zasedle okoli 85 % razpoložljive površine, smo jih presadili. S celične kulture keratinocitov oz. fibroblastov, ki so rasli pritrjeni na podlago, smo najprej odlili star medij ter površino dvakrat sprali z 1ml fosfatnega pufra. Nato smo dodali 1ml tripsina, ki prekine medcelične povezave in celice loči od podlage, kar smo spremljali pod invertnim svetlobnim mikroskopom (Olympus CKX41, Tokio, Japonska). Tripsin smo deaktivirali z dodatkom 4ml medija. Suspenzijo celic smo kvantitativno prenesli v 15 ml

centrifugirko in jo s pipeto homogenizirali. Celice smo prešteli s pomočjo hemocitometra (Neubauer 0,0025 mm², Brand, Nemčija) pod invertnim svetlobnim mikroskopom in izračunali njihovo koncentracijo. Nadalje smo suspenzijo centrifugirali v centrifugi (Centric 322A, Tehtnica, Slovenija), 5 min pri 1300 obratov/min. Supernatant smo odlili in celice resuspendirali v 1 ml svežega medija. Ustrezen volumen suspenzije (slednjega smo izračunali glede na zeleno število celic, upoštevajoč predhodno določeno koncentracijo celic) smo odpipetirali v novo polisirensko ploščo z 10 ml medija oziroma v vdolbinice ustreznih plošč za poskuse (TPP[®] Techno Plastic Products, Transadingen, Švica).

3.2.3 Vrednotenje citotoksičnosti

3.2.3.1 Proučevanje celične proliferacije s testom aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze

S testom celične proliferacije lahko določimo število živih celic; slednje namreč s pomočjo mitohondrijske dehidrogenaze reducirajo reagent MTS v obarvan formazan, ki je topen v mediju in ga lahko kolorimetrično določimo. Reakcija je prikazana na Sliki 3. Pretvorbo omogočata NADPH ali NADH, ki ju tvorijo dehidrogenazni encimi v metabolno aktivnih celicah, ki morajo biti v stiku z MTS reagentom od 1 do 4 ur. Izmerjena absorbanca pri valovni dolžini 490 nm je premosorazmerna številu živih celic v kulturi (61).



Slika 3: Reakcija pretvorbe reagenta MTS v obarvan formazan, prikazana s strukturnimi formulami (61).

Proliferacijo keratinocitov in fibroblastov smo proučevali po 4 in 24-urni izpostavitvi raztopinam tekočih kristalov TK1 in TK2 v koncentracijah 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml ter 5 mg/ml, fibroblaste pa še po 72h pri koncentracijah TK 0,5 mg/ml in 1 mg/ml. Kot

pozitivno kontrolo smo uporabili raztopino SDS v celičnem mediju (0,5 mg/ml oz. 5 mg/ml po 4h in 24h izpostavitve), ki je splošno znan iritant (21, 66).

V mikrotitrsko ploščo s 96-imi vdolbinicami smo za vsak vzorec nasadili 3 vdolbinice z $0,1 \cdot 10^5$ celicami v 50 μ l medija. Enako koncentracijo celic smo nasadili v 3 vdolbinice za določitev absorbance celic. Ker na absorbanco vpliva tudi raztopina tekočih kristalov oz. medij, smo za določitev absorbance posameznega vzorca tekočih kristalov in medija v 3 vdolbinice odpipetirali 50 μ l medija brez celic. Ploščo smo inkubirali 24h pri 37°C v vlažni atmosferi s 5 % CO₂, da so se celice pritrdile na podlago. Nato smo v vse vdolbinice – tiste s celicami in brez – dodali po 50 μ l raztopine vzorca oziroma medija. Absorbanca je premosorazmerna z dolžino poti svetlobe skozi raztopino, zato je pomembno, da je bil v vseh vdolbinicah volumen enak (100 μ l). Po 2 oz. 22 urah izpostavitve tekočim kristalom smo dodali 10 μ l MTS reagenta ter z mikrotitrskim čitalcem (Safire™, Tecan, Švica) izmerili absorbanco pri 490 nm po celokupno 4 oz. 24 urah. Rezultate testa proliferacije celic smo podali relativno glede na kontrolo, tj. netretirane celice.

Proliferacijo celic smo izračunali po enačbi:

$$\text{proliferacija celic} = \frac{(A_S - A_{S0})}{(A_C - A_{C0})}$$

A_S	absorbanca celic po dodatku vzorca
A_{S0}	absorbanca medija po dodatku vzorca
A_C	absorbanca kontrolnih celic
A_{C0}	absorbanca medija

Enak postopek smo uporabili pri proučevanju proliferacije celic po izpostavitvi SDS, le da smo namesto raztopine tekočih kristalov dodali ustrezne raztopine SDS.

Rezultate smo statistično ovrednotili, in sicer smo preverili ali obstaja značilna razlika med citotoksičnostjo obeh tekočih kristalov ter glede na SDS pri enaki koncentraciji. MTS test smo izvedli v treh bioloških ponovitvah. Z F-testom smo preverili podobnost varianc in izvedli dvostranski Studentov t-test s stopnjo tveganja $P = 0,05$.

3.2.3.2 Proučevanje celic pod svetlobnim invertnim mikroskopom in štetje celic

Celice smo proučevali pod svetlobnim invertnim mikroskopom po 4-urni in 24-urni izpostavitvi tekočim kristalom v koncentracijah 0,5 mg/ml, 2 mg/ml in 5 mg/ml, šteli pa po 4-urni in 24-urni izpostavitvi koncentracijam 0,5 mg/ml in 2 mg/ml.

Celice smo nasadili v ploščo s 6 vdolbinicami, in sicer je bilo v posamezni vdolbinici ali $1,5 \times 10^5$ keratinocitov ali 2×10^5 fibroblastov v 2ml medija. Celice smo pustili čez noč v inkubatorju pri 37°C v vlažni atmosferi s 5 % CO_2 , da so se pritrdele na podlago, in naslednji dan dodali raztopino tekočih kristalov. Celice smo opazovali pod svetlobnim invertnim mikroskopom (Olympus CKX41, Tokyo, Japan) in posneli slike pri $10\times$, $20\times$ in $40\times$ povečavi. Nato smo s pipeto pobrali medij iz posamezne vdolbinice in ga prenesli v označeno centrifugirko. Pritrjene celice smo sprali s 300 μl PBS. Puffer smo prenesli v isto centrifugirko in dodali v luknjico 300 μl tripsina ter počakali, da so se celice ločile od podlage. Nato smo delovanje tripsina nevtralizirali z dodatkom 1200 μl medija, ter medij s celicami kvantitativno prenesli v centrifugirko. Disperzijo celic smo centrifugirali 5 min pri 1300 obratih. Supernatant smo odlili in celice resuspendirali v 500 μl medija. Zatem smo v epici homogeno premešali 100 μl resuspendiranih celic ter 100 μl tripanskega modrila ter s pomočjo hemocitometra pod invertnim svetlobnim mikroskopom prešteli žive in mrtve celice v vseh štirih kvadrantih. Razlikovali smo jih glede na modro obarvano citoplazmo, značilno za mrtve celice.

Število celic smo izračunali po formuli:

$$\text{Št. celic} = n \times F \times 10^4 \times V$$

n	povprečno število živih ali mrtvih celic v enem kvadrantu
F	faktor redčenja
10^4	konstanta hemocitometra
V	volumen (ml), v katerem določamo število celic

Štetje celic smo izvedli v treh ponovitvah. Število živih celic smo izrazili relativno glede na število živih celic v kontroli, delež mrtvih celic pa smo izračunali glede na vse celice v vdolbinici (živih in mrtvih) ter glede na mrtve celice v kontroli – slednje prikazuje relativno povečanje mrtvih celic po izpostavitvi TK.

3.2.3.3 *Fluorescentna mikroskopija*

Preparate za fluorescentno mikroskopijo smo pripravili tako, da smo v posamezno vdolbinico plošče s 6 vdolbinicami dali sterilizirano krovno stekelce s površino 1 cm^2 . Nato smo dodali ustrezno količino medija in suspenzije celic, tako da je bilo v posamezni vdolbinici $1,5 \times 10^5$ celic v 2 ml medija. Celice smo čez noč pustili v inkubatorju pri 37°C v

vlažni atmosferi s 5 % CO₂, da so se pritrdile na podlago, nato smo dodali raztopino vzorcev.

Barvanje in opazovanje jeder in aktinskih vlaken:

Po 4 oziroma 24 urni izpostavitvi tekočim kristalom smo odpipetirali medij in celice v posamezni luknjici sprali s 500 µl PBS. Celice smo fiksirali z 4 % formaldehidom (500 µl) za 10 min, jih sprali s 500 µl bidestilirane vode in dodali 400 µl 0,25 % Triton-X100 za permeabilizacijo. Po 10 min smo ga odstranili in celice ponovno sprali z bidestilirano vodo. Nato smo dodali 500 µl raztopine barvila za jedra s koncentracijo 5 µg/ml za 30 min, zaščiteno pred svetlobo. Potem smo celice sprali z bidestilirano vodo in dodali 500 µl raztopine barvila za aktin s koncentracijo 0,1 mg/ml. Ploščo smo zaščitili pred svetlobo in po 30 min dvakrat sprali z bidestilirano vodo. Ko se je krovno stekelce posušilo, smo ga položili na objektno stekelce in robove polakirali. Preparate smo nato gledali pod fluorescentnim mikroskopom Olympus IX 81 (Tokio, Japonska) pod 60× povečavo in proučevali morfologijo celic. Uporabili smo filtre DAPI za jedro in FITC za aktinska vlakna. Jedra smo videli modro obarvana, aktinska vlakna pa zeleno.

Barvanje in opazovanje membrane:

Po 4-urni izpostavitvi keratinocitov tekočim kristalom v koncentraciji 0,5 mg/ml in mediju kot kontroli smo odpipetirali medij in raztopino TK in nato celice v posamezni vdolbinici sprali s 500 µl PBS. Za posamezno vdolbinico smo pripravili raztopino barvila neposredno pred barvanjem, tako da smo 1 µl raztopine barvila za membrane raztopili v 500 µl PBS. Pripravljeno raztopino smo odpipetirali v vdolbinico s celicami in pustili stati 5 min pri sobni temperaturi, zaščiteno pred svetlobo. Stekelce smo nato sprali s 500 µl PBS, počakali da se je posušilo, ga položili na objektno stekelce in robove polakirali. Tako pripravljen preparat smo opazovali s fluorescentnim mikroskopom Axio Zoom V16 (Zeiss, Nemčija) pod 40× povečavo ter posneli digitalne slike. Za ekscitacijo smo uporabili valovno dolžino 543 nm (Argon rdeč), kot emitacijski filter pa 555 nm (Alexa Fluor).

4 Rezultati

V okviru diplomskega dela smo na celičnih linijah človeških keratinocitov in fibroblastov vrednotili citotoksičnost dveh sistemov tekočih kristalov (TK), ki smo jih pripravili iz lecitina, izopropilmiristata, Tweena 80 in bidestilirane vode. Posamezne sestavine tako PAS kot tudi oljna faza (IPM) so sicer biokompatibilne in biorazgradljive, kljub temu pa je potrebno na koži ovrednotiti učinke celotnega dermalnega sistema. Podatkov o citotoksičnosti takega sistema v literaturi še ni, najdemo pa podatke za posamezne sestavine oziroma disperzne sisteme (npr. emulzije), sestavljene iz podobnih komponent (poglavje 1.2.4).

4.1 Test aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze

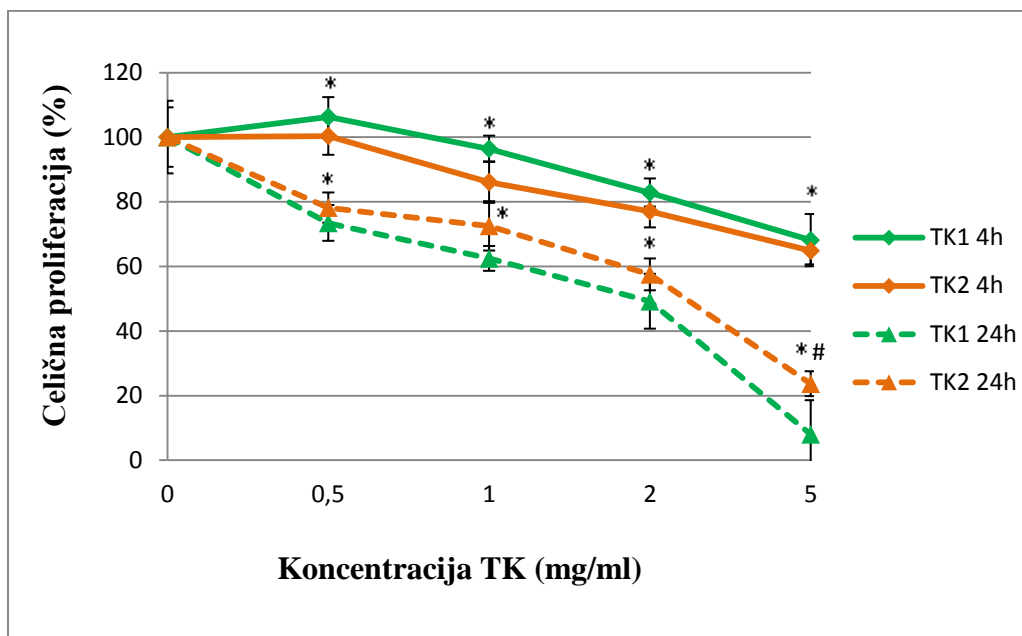
S testom aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze smo ovrednotili vpliv TK na proliferacijo keratinocitov in fibroblastov in s tem posredno potencialno iritabilnost. Oba sistema TK sta sestavljena iz enakih komponent (preglednica I), vendar je delež vode v TK2 večji (37,5 % napram 25 % pri TK1). Celice v enoplastni kulturi smo za 4h oz. 24h izpostavili naslednjim koncentracijam TK: 0,5 mg/ml; 1 mg/ml; 2 mg/ml ter 5 mg/ml. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili raztopino SDS v mediju za gojenje celic; SDS se namreč uporablja kot referenčni iritant v študijah iritacije kože (66).

Keratinociti

Na sliki 4 so predstavljeni rezultati celične proliferacije po 4h in 24h izpostavitve TK. Celice so po 4-urni izpostavitvi izkazovale visoko sposobnost proliferacije pri vseh testiranih koncentracijah. Pri koncentraciji 0,5 mg/ml nismo opazili zmanjšanja proliferacije, saj je proliferacija znašala 106 % za sistem TK1 in 100 % za TK2. Pri 1 mg/ml je bila proliferacija nižja za TK2, pri TK1 je bila še vedno primerljiva s kontrolo, in ta trend se je nadaljeval tudi pri višjih koncentracijah. Čeprav je bila torej proliferacija pri vseh koncentracijah višja v primeru TK1, med obema sistemoma ni bilo statistično značilne razlike. Pri najnižji koncentraciji pri nobenem od obeh sistemov torej še nismo opazili vplivov na proliferacijo keratinocitov, pri višjih koncentracijah pa je sicer prišlo do padca celične proliferacije, vendar je bila še vedno precej visoka; okoli 80 % pri 2 mg/ml oz. nad 60 % pri 5 mg/ml za oba sistema TK.

Po 24-urni izpostavitvi keratinocitov se je pri vseh koncentracijah celična proliferacija zmanjšala, že pri najnižji (0,5 mg/ml) je bila manjša od 80 % za oba sistema TK. Vplivi

TK na celično proliferacijo so bili najbolj opazni pri najvišji koncentraciji (5 mg/ml), kjer je znašala samo 7,9 % za TK1 in 24 % za TK2, oba sistema sta torej že močno uničila celice. Glede na 4-urno izpostavitvev je bil trend ravno obraten – po 24h je bila proliferacija pri vseh koncentracijah višja pri sistemu TK2, značilno razliko pa smo uspeli potrditi le pri 5 mg/ml.



Slika 4: Odstotek proliferacije keratinocitov glede na kontrolo po 4-urni in 24-urni izpostavitvi različnim koncentracijam tekočih kristalov.

* statistično značilna razlika v primerjavi z SDS ($P < 0,05$)

statistično značilna razlika med sistemoma TK1 in TK2 ($P < 0,05$)

Rezultati celične viabilnosti po izpostavitvi SDS so podani v preglednici II. Celice smo izpostavili SDS v koncentracijah 0,5 mg/ml ter 5 mg/ml. Testa nismo izvedli pri vmesnih koncentracijah, saj se je že koncentracija 0,5 mg/ml izkazala za zelo toksično – proliferacija ni bila večja od 6 %, prav tako praktično ni razlik med obema koncentracijama.

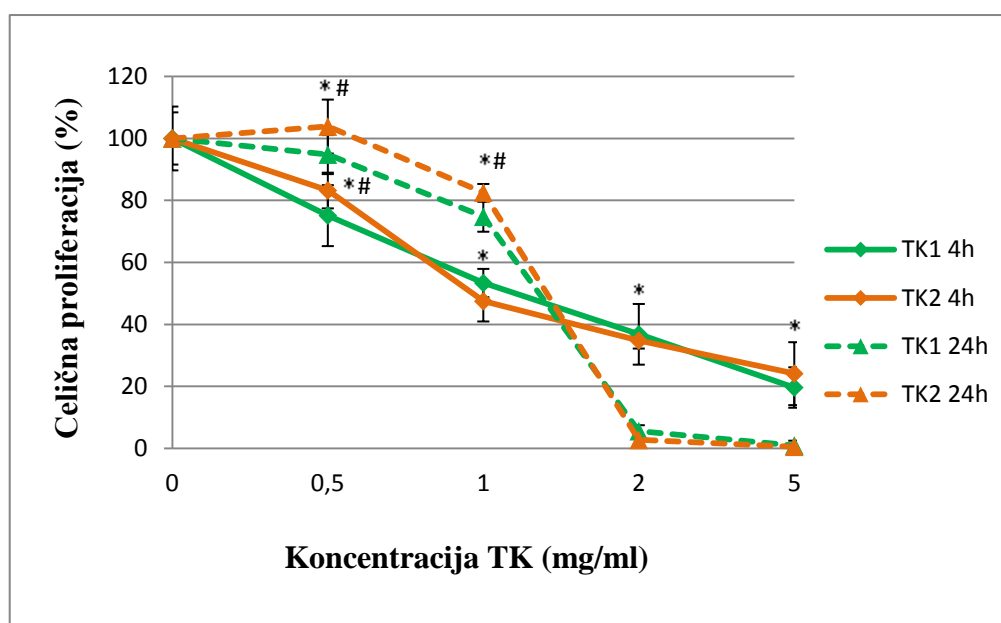
Preglednica II: Odstotek celične proliferacije keratinocitov po 4h in 24h izpostavitvi SDS

	0,5 mg/ml	5 mg/ml
4h	5,9 %	5,8 %
24h	1,4 %	1,0 %

Če primerjamo celično proliferacijo celic, tretiranih s TK, glede na SDS, je pri TK statistično značilno višja tako po 4h kot po 24h izpostavitvi.

Fibroblasti

Kot je prikazano na sliki 5, so fibroblasti že po 4-urni izpostavitvi pri vseh koncentracijah TK izkazovali nižjo proliferacijo v primerjavi s kontrolo (netretirane celice). Pri koncentraciji 0,5 mg/ml je bila metabolna aktivnost še dokaj visoka (pri TK1 75 %, pri TK2 83 %), in tudi značilno različna med obema sistemoma, že pri 1 mg/ml pa se je vrednost skoraj prepolovila (53 % (TK1) ter 47 % (TK2)), z večanjem koncentracije pa se je še bolj zmanjšala (do ~ 20 % pri 5 mg/ml). Presenetljivo so po 24h izpostavitvi fibroblasti pri nižjih dveh koncentracijah izkazovali višjo proliferacijo kot po kratkotrajni izpostavitvi. Pri koncentraciji 0,5 mg/ml skorajda ni bilo bistvene razlike glede na kontrolo (pri TK1 95 %, pri TK2 104 %), proliferacija pa je bila značilno nižja za TK1 primerjavi s TK2 pri 0,5 mg/ml ter 1 mg/ml. Pri višjih dveh koncentracijah pa je bila metabolna sposobnost praktično neizražena (~ 0 %).



Slika 5: Odstotek proliferacije fibroblastov glede na kontrolo po 4-urni in 24-urni izpostavitvi različnim koncentracijam tekočih kristalov.

* statistično značilna razlika v primerjavi z SDS ($P < 0,05$)

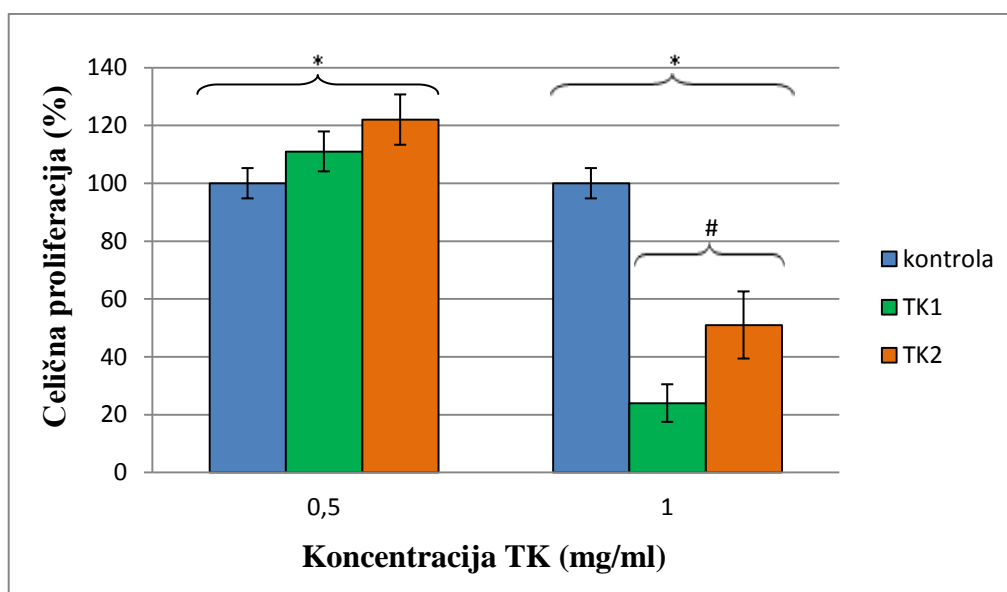
statistično značilna razlika med sistemoma TK1 in TK2 ($P < 0,05$)

Po izpostavitvi SDS je bila metabolna aktivnost fibroblastov nična (preglednica III). Po 4h izpostavitve je bila celična proliferacija pri vseh koncentracijah obeh sistemov TK značilno višja kot pri SDS, po 24h pa je bila pri najvišjih dveh koncentracijah TK metabolna sposobnost tako prizadeta, da tudi razlike s SDS niso bile več statistično pomembne.

Preglednica III: Odstotek celične proliferacije fibroblastov po 4h in 24h izpostavitvi SDS

	0,5 mg/ml	5 mg/ml
4h	1,8 %	1,4 %
24h	0 %	0 %

Glede na to, da je bila proliferacija fibroblastov pri koncentracijah 0,5 mg/ml in 1 mg/ml po 24h izpostavitve višja kot po 4h, smo nadalje hoteli ugotoviti, ali morda nižje koncentracije TK po kratkotrajni izpostavitvi povzročijo minimalne poškodbe celic, ki začasno sicer zmanjšajo celično proliferacijo, vendar si po določenem času celice opomorejo in povrnejo sposobnost proliferacije do enake mere, kot jo imajo kontrolne celice. Da bi preverili navedeno hipotezo, smo naredili test aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze po 72h izpostavitve TK1 in TK2 v koncentracijah 0,5 mg/ml in 1 mg/ml. Pri najnižji koncentraciji (0,5 mg/ml) tako pri TK1 kot TK2 nismo določili zmanjšane celične proliferacije glede na kontrolo (slika 6), med sistemoma tudi ni bilo signifikantne razlike. Pri 1 mg/ml pa se je proliferacija znižala na 24 % (TK1) oz. 55 % (TK2), z značilno razliko med sistemoma.



Slika 6: Odstotek proliferacije fibroblastov glede na kontrolo po 72-urni izpostavitvi nižjima koncentracijama tekočih kristalov (0,5 mg/ml in 1 mg/ml).

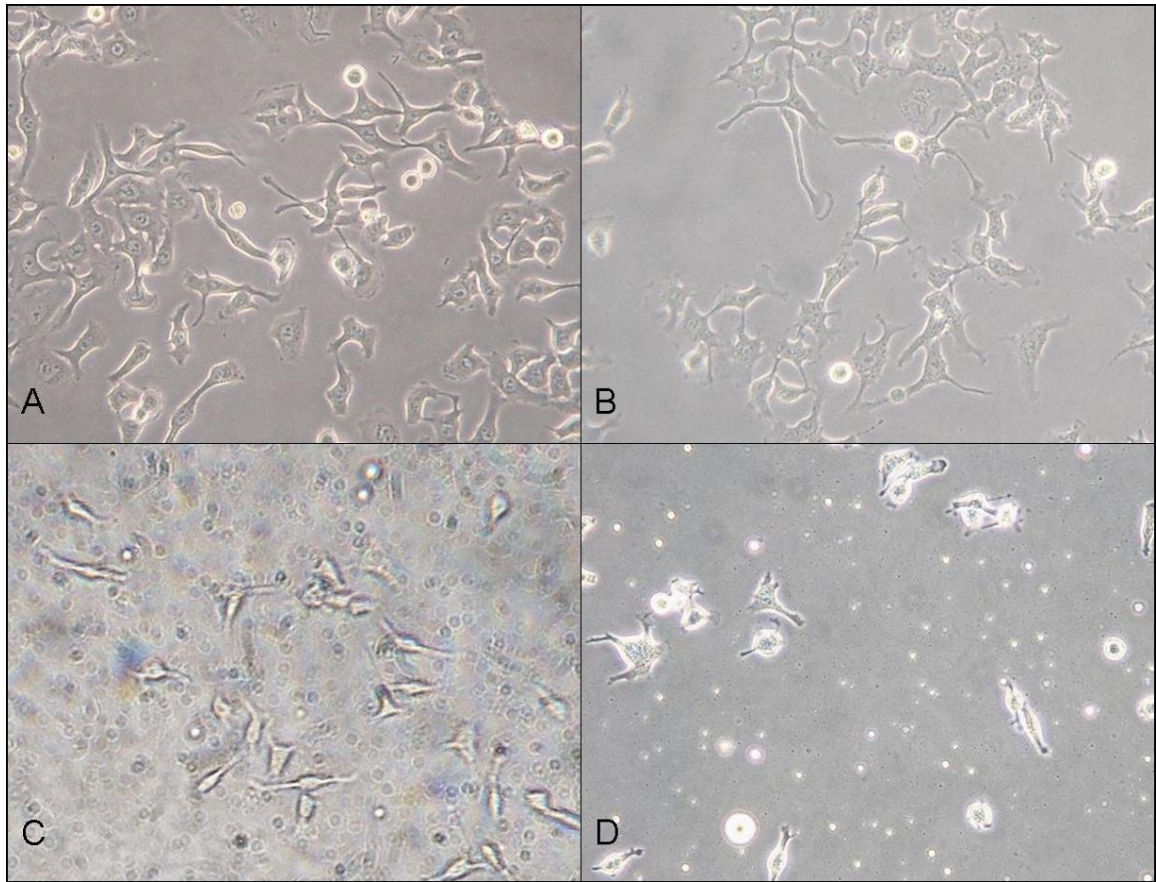
* statistično značilna razlika v primerjavi z SDS ($P < 0,05$)

statistično značilna razlika med sistemoma TK1 in TK2 ($P < 0,05$)

4.2 Proučevanje celic pod invertnim svetlobnim mikroskopom

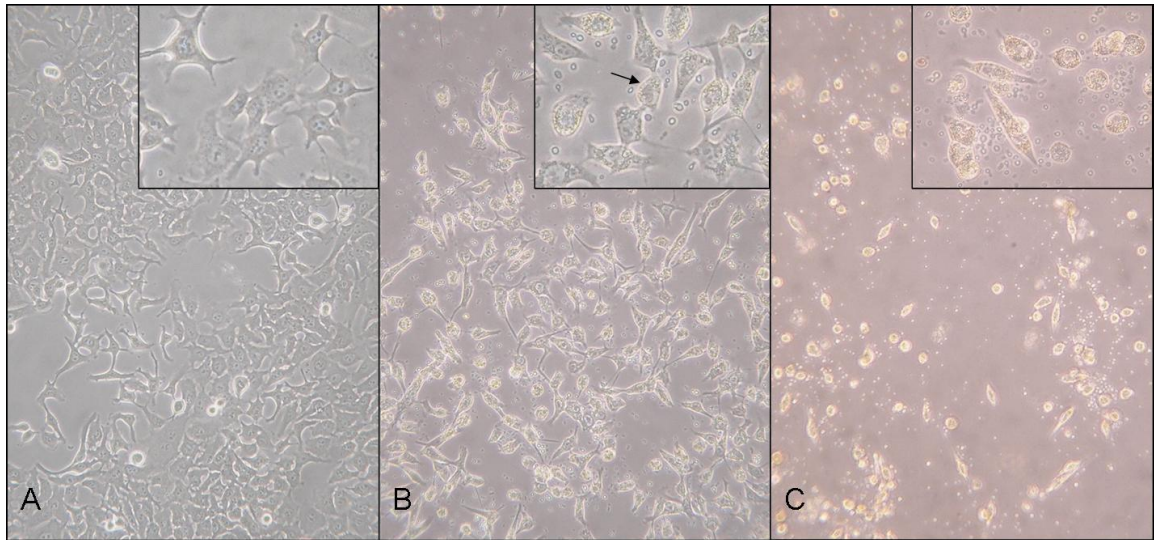
Rast in spremembo oblike celic v kulturi smo spremljali pod invertnim svetlobnim mikroskopom po 4-urni in 24-urni izpostavitvi TK v koncentracijah 0,5 mg/ml, 2 mg/ml in 5 mg/ml. Opazovali smo obliko celic, njihovo gostoto in medcelične povezave (slike 7-10). Zgolj z opazovanjem pod svetlobnim mikroskopom nismo opazili razlik med sistemoma TK1 in TK2 niti pri keratinocitih niti pri fibroblastih, zato so za posamezno točko predstavljene slike le za en sistem TK.

Keratinociti po 4h izpostavitve so prikazani na sliki 7. V kontroli (celice v rastnem mediju, brez dodatka TK) so bile celice poligonalne, zvezdaste oblike z veliko povezavami med sosednjimi celicami, opazno je bilo tudi okroglo jedro. Po 4h izpostavitve TK s koncentracijo 0,5 mg/ml nismo opazili nobene razlike s kontrolo niti v obliki niti v gostoti celic. Pri 2 mg/ml je bila gostota celic manjša, celice so se skrčile, še so se povezovale in ostale večinoma poligonalne oblike, nekatere so postale bolj podolgovate, med njimi je bilo manj stikov. Nekaj celic je bilo že odlepljenih, bile so namreč okrogle oblike in so plavale v mediju. Pri 5 mg/ml je bilo prilepljenih celic občutno manj, le-te so bile večinoma okrogle oblike, nekatere so še imele podaljške za stik s sosednjimi celicami, a le-teh skorajda ni bilo več opaziti. Večina celic je bila odlepljenih od podlage.



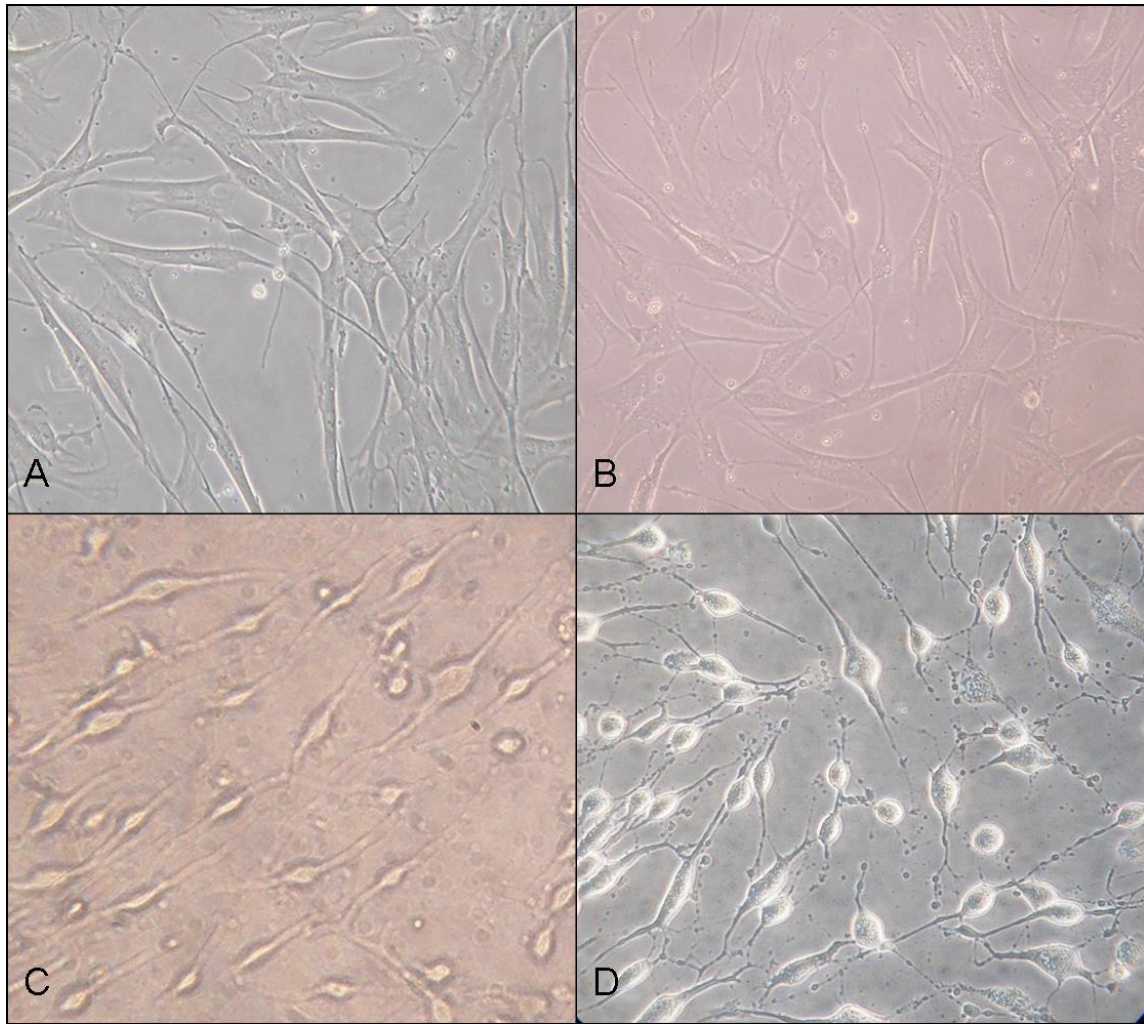
Slika 7: Keratinociti pod invertnim svetlobnim mikroskopom pri 20x povečavi po 4h TK1: kontrola (A), 0,5 mg/ml (B), 2 mg/ml (C) in 5 mg/ml (D).

Po 24h izpostavitve celic sistemoma TK s koncentracijo 0,5 mg/ml je bila gostota celic še vedno enaka, bile so poligonalne oblike, vendar pa so nekatere celice bile že bolj zaobljene in so imele manj stikov s sosednjimi celicami. Pri 2 mg/ml je bila že večina celic odlepljenih, pritrjene pa so izgubile značilno obliko; bile so večinoma okrogle, brez stikov s sosednjimi celicami, le posamezne so bile podolgovate in so imele podaljške (slika 8). Pri 5 mg/ml so bile praktično vse celice odlepljene, videti je bilo le drobne pikice, kar bi lahko bili fragmenti celic.



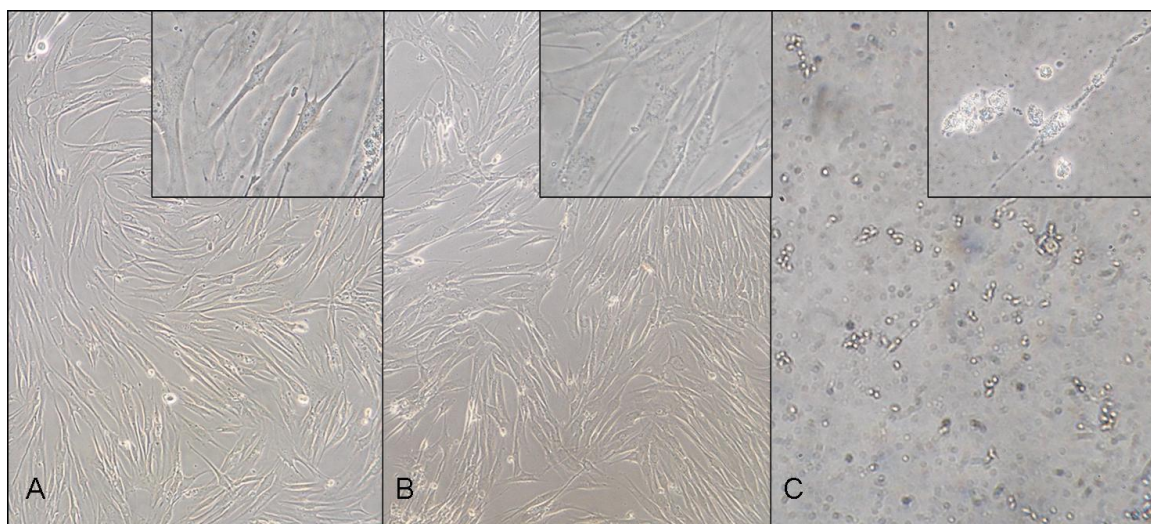
Slika 8: Keratinociti pod invertnim svetlobnim mikroskopom po 24h v kontroli (A), pri 0,5 mg/ml TK2 (B) in 2 mg/ml TK2 (C) pod 20x povečavo. V pripadajočem zgornjem desnem kotu so 40x povečave. Puščica prikazuje celico, ki se je zaoblila in ima zmanjšano število stikov s sosednjimi celicami.

Fibroblasti so predstavljeni na sliki 9. Celice kontrole so bile vretenaste oblike, z veliko povezavami med celicami, ne samo sosednjimi, temveč tudi med nekoliko bolj oddaljenimi celicami. Po 4h izpostavitve TK s koncentracijo 0,5 mg/ml nismo opazili razlike s kontrolo ne v gostoti ne v obliki celic. Pri koncentraciji 2 mg/ml pa so bile celice že spremenjene, sicer še vedno značilne podolgovate oblike, a zadebeljene okrog jedra. Medcelične povezave so bile še ohranjene, a v manjšem obsegu. Gostota celic je bila manjša, nekaj jih je že plavalo v mediju. Podobno spremenjene so bile celice pri koncentraciji 5 mg/ml, pritrjenih celic je bilo še manj.



Slika 9: Fibroblasti pod invertnim svetlobnim mikroskopom po 4h v kontroli (A), pri 0,5 mg/ml TK1 (B), 2 mg/ml TK1 (C) in 5 mg/ml TK1 pod 40x povečavo.

Tudi po dolgotrajnejši izpostavitvi (24h) so bile celice, izpostavljene TK v najnižji koncentraciji (0,5 mg/ml) praktično nespremenjene glede na kontrolne celice. Že pri 2 mg/ml pa je bilo število pritrjenih celic zelo zmanjšano, le-te so bile večinoma okrogle z zelo malo citoplazme, brez medceličnih stikov (slika 10). Pri 5 mg/ml so bile skorajda vse celice odlepljene.



Slika 10: Fibroblasti pod invertnim svetlobnim mikroskopom po 24h v kontroli (A), pri 0,5 mg/ml TK1 (B) in 2 mg/ml TK1 (C) pod 10x povečavo. V pripadajočem zgornjem desnem kotu so 40x povečave.

4.3 Štetje celic

Pri tem testu smo šteli celice po 4h in 24h izpostavitve TK v koncentracijah 0,5 mg/ml in 2 mg/ml. Mrtve in žive celice smo ločili pod invertnim svetlobnim mikroskopom s pomočjo tripanskega barvila; sprejemljiv delež mrtvih celic v kontroli je do 10%. Delež živih celic smo podali glede na žive celice v kontroli (celice v ravnem mediju, brez dodatka TK). Delež mrtvih celic smo podali glede na vse celice v vdolbinici in glede na mrtve celice v kontroli. V preglednicah so podani rezultati za keratinocite (preglednica IV) in fibroblaste (preglednica V).

Preglednica IV: Rezultati štetja keratinocitov, (%).

		TK1			TK2		
		delež Ž glede na K	delež M v vdolbinici	delež M glede na K	delež Ž glede na K	delež M v vdolbinici	delež M glede na K
4h	kontrola	/	1,8	/	/	1,3	/
	0,5 mg/ml	97	3,3	184	71	5,4	432
	2 mg/ml	79	6,1	284	49	18,7	458
24h	kontrola	/	1,6	/	/	0	/
	0,5 mg/ml	73	3,4	155	77	1,6	/
	2 mg/ml	32	6,2	128	30	14	/

Ž→žive celice,
M→mrtve celice,
K→kontrola

Preglednica V: Rezultati štetja fibroblastov, (%)

		TK1			TK2		
		delež Ž glede na K	delež M v vdolbinici	delež M glede na K	delež Ž glede na K	delež M v vdolbinici	delež M glede na K
4h	kontrola	/	0,5	/	/	2,2	/
	0,5 mg/ml	109	0	0	107	0,2	11
	2 mg/ml	19	19	800	25	29	447
24h	kontrola	/	1,3	/	/	1,9	/
	0,5 mg/ml	47	2,8	100	47	1,3	33
	2 mg/ml	0	100	301	0	0	/

Ž→žive celice,

M→mrtve celice,

K→kontrola

Naša hipoteza je bila, da bodo TK pri višjih koncentracijah oz. dolgotrajnejši izpostavitvi poškodovali celice, kar bo vodilo v celično smrt, to pa bo razvidno v večjem deležu mrtvih ter manjšem deležu živih celic. Kot pa je razvidno iz rezultatov, je bil delež živih celic res manjši, medtem ko se delež mrtvih celic ni bistveno povečal – po 24h pri nobeni od koncentracij TK delež mrtvih celic v vdolbinici ni presegel 14 % (razen pri fibroblastih pri 2 mg/ml TK1, kjer je delež 100 %, ker nismo našli nobene žive celice). Nasprotno pa smo opazili visok delež mrtvih celic v vdolbinici in tudi velik delež mrtvih celic glede na kontrolo pri keratinocitih po 4h izpostavitve TK2 s koncentracijo 2 mg/ml, pri fibroblastih pa po 4h izpostavitve tako TK1 kot TK2 s koncentracijo 2 mg/ml, medtem ko je bilo po 24h pri isti koncentraciji število mrtvih fibroblastov manjše kot po 4h. Še več, po 24h TK2 s koncentracijo 2 mg/ml ni bilo niti živih niti mrtvih fibroblastov, pri TK1 pa smo našli le nekaj mrtvih in nobenega živega. Tam, kjer je bil delež živih celic manjši, smo pod mikroskopom opazili modro obarvane delce, manjše od velikosti celic, ki so najbrž njihovi razgradni produkti, kar bi pojasnilo majhno število mrtvih celic. Zato smo citotoksičnost s pomočjo tega testa lahko boljše ovrednotili na podlagi deleža živih celic. Rezultati tega testa so pokazali, da vsi fibroblasti po kratkotrajni izpostavitvi TK v koncentraciji 0,5 mg/ml ostanejo živi, pri koncentraciji 2 mg/ml pa preživi le približno četrtnina celic, razlika med sistemoma TK1 in TK2 pa je zanemarljiva. Pri keratinocitih je delež živih celic primerljiv s kontrolo po 4h izpostavitvi TK1 z nižjo koncentracijo, medtem ko znaša le 71 % za TK2. Isti trend je opazen tudi z naraščanjem koncentracije, pri obeh sistemih pa je delež živih celic pri 2 mg/ml večji kot v primeru fibroblastov.

Po dolgotrajni izpostavitvi (24h) opazimo, da je delež živih celic višji pri keratinocitih. Po 24h razlika med obema sistemoma TK ni očitna pri nobeni od testiranih koncentracij, ne za keratinocite ne za fibroblaste. Pri nižji koncentraciji je delež živih keratinocitov ~ 75 % in fibroblastov ~ 50 %, pri višji koncentraciji pa ~ 30 % keratinocitov in praktično 0 % fibroblastov. Rezultati tega testa nakazujejo na to, da je najnižja koncentracija TK toksična za fibroblaste šele po dolgotrajni izpostavitvi, enako smo ugotovili za keratinocite, ki smo jih izpostavili TK1, pri TK2 pa se je delež živih celic zmanjšal že po 4h. Pri višjih koncentracijah oz. dolgotrajnejši izpostavitvi se je delež živih celic zmanjšal pri obeh vrstah celic, vendar bolj pri fibroblastih kot pri keratinocitih.

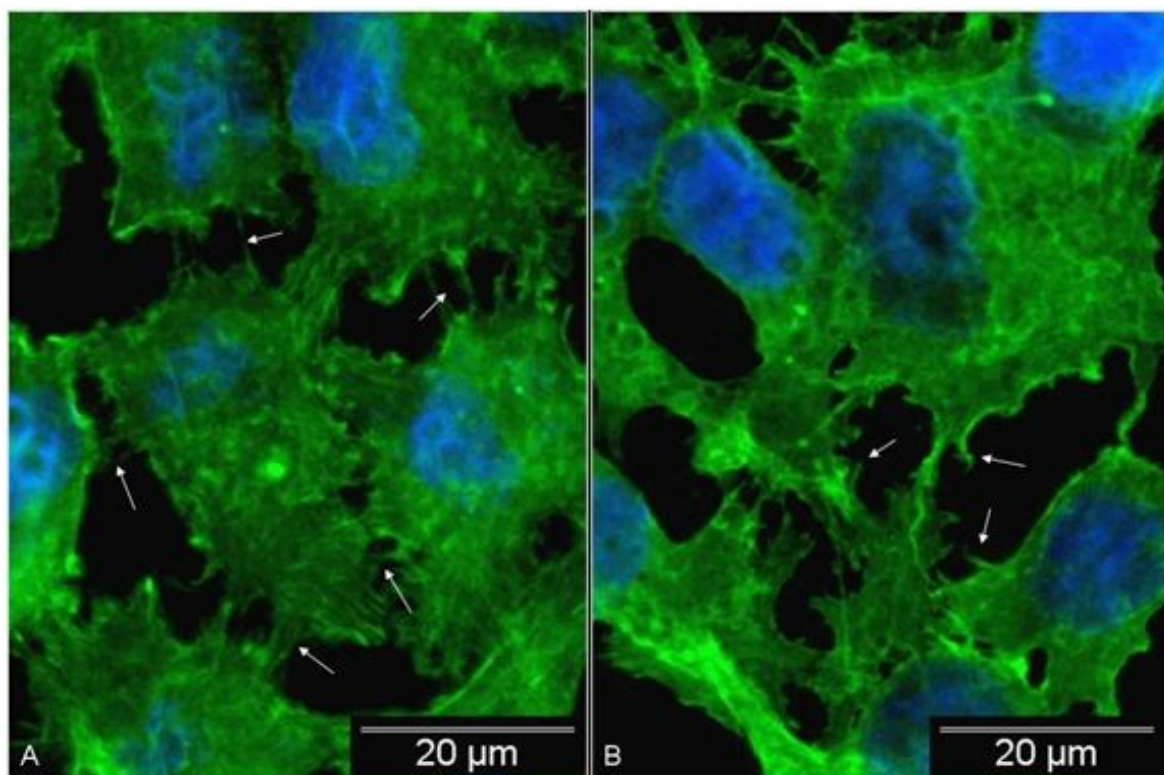
4.4 Fluorescentna mikroskopija

Vrednotenje sprememb v morfoloških strukturah celic se je uveljavilo kot alternativen in bolj občutljiv pristop za proučevanje citotoksičnosti. Spremembe v morfologiji se namreč lahko pokažejo že pri koncentracijah testiranih snovi, ki še ne vplivajo na viabilnost ali proliferacijo celic. Pri proučevanju vpliva HgCl₂ na celični liniji keratinocitov so z mikroskopom na atomsko silo (AFM) in Ramansko spektroskopijo odkrili spremembe v membranah pri koncentraciji, ki ni odražala sprememb pri testu s tripanskim modrilom (67). V predhodnih študijah vrednotenja morfoloških sprememb keratinocitov po izpostavitvi tekočim kristalom so z AFM ugotovili, da so bile celice po 4h izpostavitvi TK s koncentracijo 0,45 mg/ml bolj sploščene in da je prišlo do nastanka vdolbin v celični membrani, opazili so tudi jasno definirane psevdopodije ter decentralizirano postavljeno jedro (68). Z ozirom na prejšnje rezultate smo se tako usmerili v nadaljnje proučevanje morfoloških sprememb z uporabo fluorescentne mikroskopije, in sicer smo z ustreznimi barvili barvali jedro, aktinska vlakna in membrano. Jedro in aktin barvamo ob predhodnem fiksiranju celic, membrano pa živim celicam, zato smo za proučevanje membrane pripravili druge preparate kot za jedro in aktin.

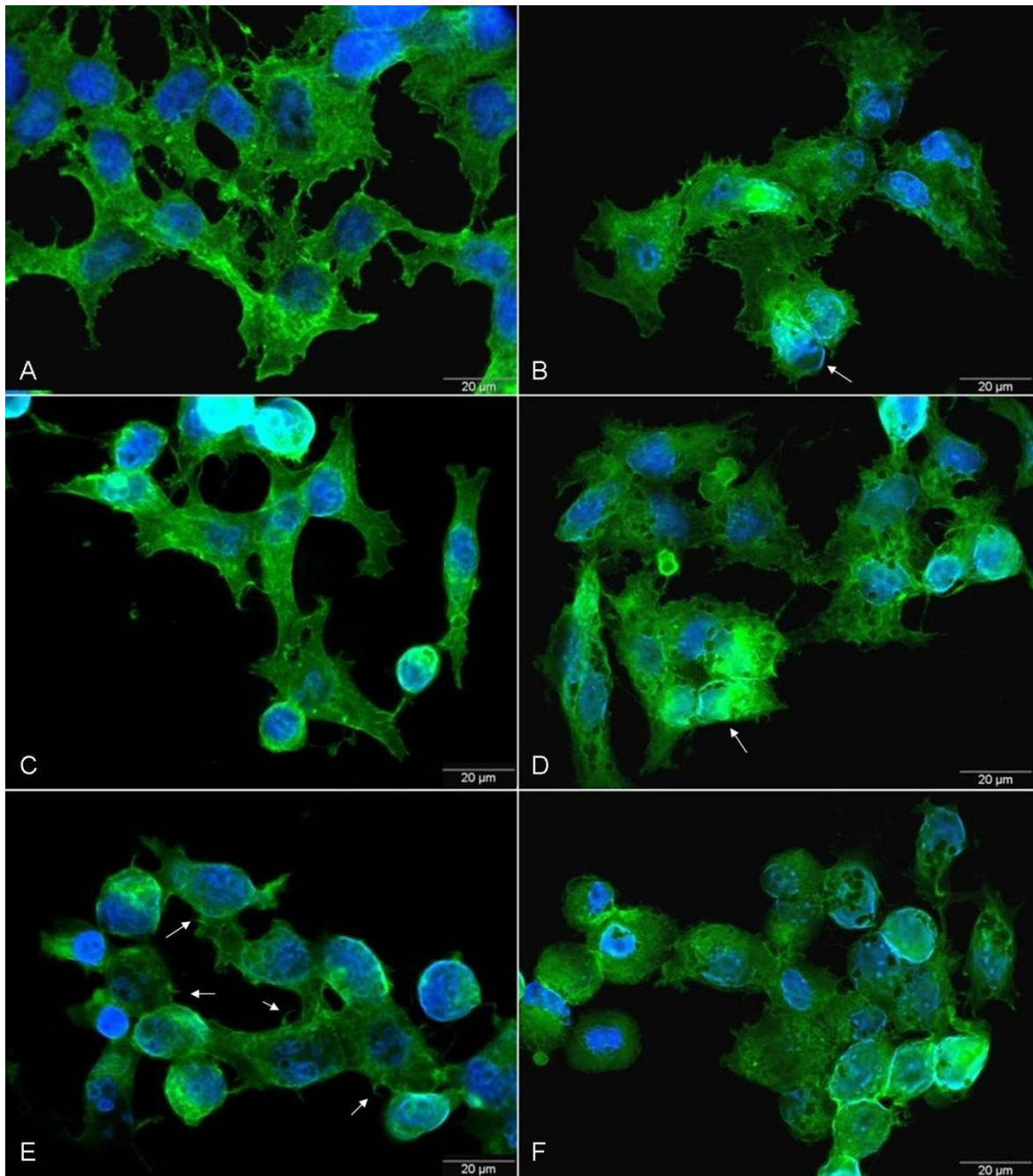
4.4.1 Barvanje jeder in aktinskih vlaken

Keratinociti: Pri keratinocitih v kontroli smo lahko opazili zvezdasto obliko celic, okrogla oziroma ovalna jedra in enakomerno obarvan aktin, široko okoli jedra in ne le zgoščen okoli njega, kot pri tretiranih celicah. Celice so se povezovale preko mnogih mikrofilamentov, ki so s puščicami označene na sliki 11A. Po 4h izpostavitvi TK s

koncentracijo 0,5 mg/ml smo lahko že opazili manjše morfološke spremembe celic (slika 11B ter 12A in 12B). Celice so bile med seboj povezane in še vedno zvezdaste oblike, vendar so bili robovi celic ostrejši. Na robovih smo opazili tudi debelejšše mikrofilamente kot v kontroli, ki se niso stikali s sosednjimi celicami (označeni s puščicami na sliki 11B). Prav tako so že bile vidne celice s področji bolj zgoščenih aktinskih vlaken, ki so močnejše fluorescirala (s puščico označena celica na sliki 12B). Pri koncentraciji 2 mg/ml so bile nekatere celice še podobne kontrolnim, veliko pa je jih je imelo spremenjeno morfologijo – aktinska vlakna so se zgostila okoli jedra, celice so se zaoblile, število povezav s sosednjimi celicami se je zmanjšalo. Posledično smo opazili, da so se jedra sosednjih celic približala (slika 12C in 12D). Pri najvišji koncentraciji TK (5 mg/ml) so bile celice močno poškodovane; večina celic je bila okroglih, aktinska vlakna so se zgostila okoli jedra, ponekod se je tudi gostota jedra spremenila. Kljub temu pa so določene celice ohranile intercelularne povezave, prav tako so bili vidni mikrofilamenti na robovih celic (slika 12E in 12F). Med sistemoma TK1 in TK2 nismo opazili razlik.

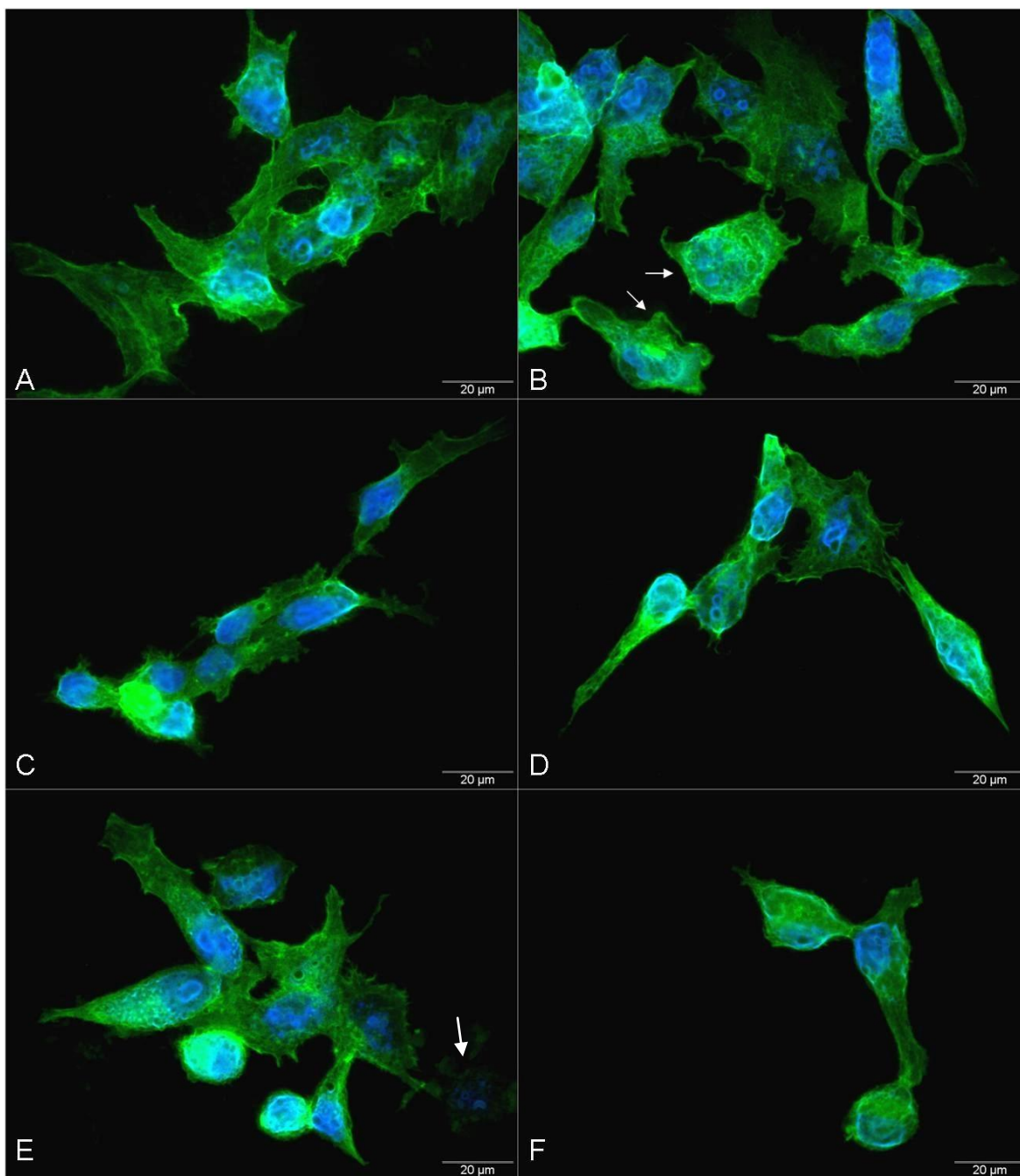


Slika 11: Sliki keratinocitov posneti s fluorescentno mikroskopijo: kontrolne celice (A) in celice po 4h TK1 s koncentracijo 0,5 mg/ml (B). Modro so obarvana jedra, zeleno pa aktinska vlakna. V kontroli so keratinociti zvezdaste oblike, s puščicami pa so označene številne mikrofilamentne povezave med celicami. Pri tretiranih keratinocitih so robovi celic bolj ostri, s puščicami pa so označeni debelejši mikrofilamenti v primerjavi s kontrolo, ki nimajo povezave s sosednjimi celicami.



Slika 12: Slike keratinocitov posnete s fluorescentno mikroskopijo: celice po 4h izpostavitve TK1 (A,C,E) in TK2 (B,D,F) pri koncentraciji 0,5 mg/ml (A,B); 2 mg/ml (C, D) ter 5 mg/ml (E,F). Modro so obarvana jedra, zeleno pa aktinska vlakna. Na slikah B in D sta s puščico označeni celici, ki imata zgoščena aktinska vlakna, ki močneje fluorescirajo. Na sliki E so s puščico označeni še vedno vidni mikrofilamenti.

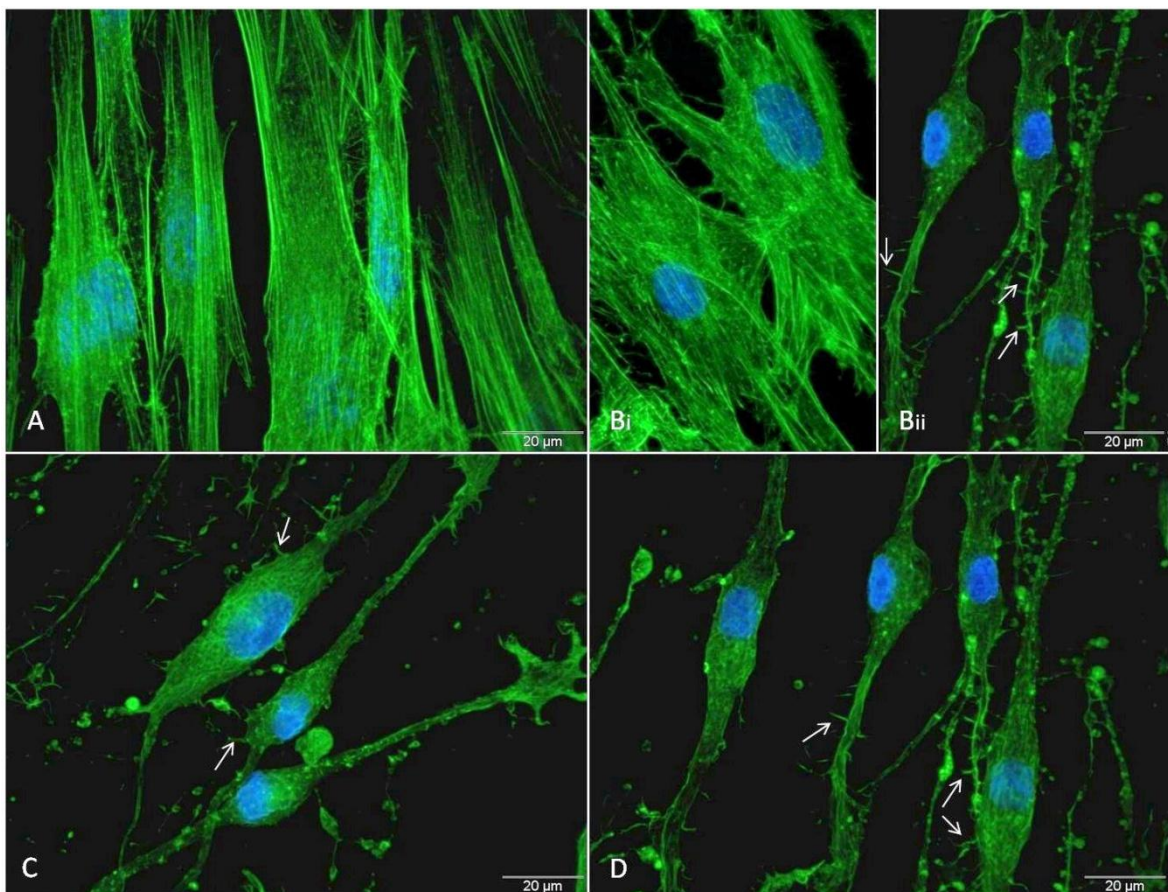
Spremembe keratinocitov po 24h izpostavitvi TK prikazuje slika 13. Celice, izpostavljene koncentraciji 0,5 mg/ml, so bile po 24h še vedno poligonalne oblike, vendar aktinska vlakna niso bila enakomerno razporejena okoli jedra v primerjavi s kontrolo, temveč so bila na določenih področjih že bolj zgoščena. Celice so bile blizu skupaj, ohranile so intercelularne povezave, hkrati pa so že bile vidne posamezne celice, ki se niso povezovale s sosednjimi (slika 13A in 13B). Pri koncentraciji 2 mg/ml so se celice na področjih, kjer jih je bilo veliko, zelo tesno približale in izgubile fine mikrofilamentne povezave. Aktinska vlakna se niso več razprostirala široko okoli jeder, večinoma so se zgostila okoli jeder. Veliko celic je bilo zaobljenih in naključno razporejenih. Pri posameznih celicah smo opazili nekaj debelejših mikrofilamentov, a je bilo teh manj kot po 4h izpostavitvi (slika 13C in 13D). Po izpostavitvi celic TK s koncentracijo 5 mg/ml smo na preparatu s težavo našli kakšno celico, te pa so bile večinoma zaobljene z aktinskimi vlakni zgoščenimi okoli jedra, nekatere celice so bile malce bolj podolgovate in zadebeljene okoli jedra (slika 13E in 13F). Prav tako so bile prisotne celice z razlitim jedrom (označena s puščico na sliki 13E).



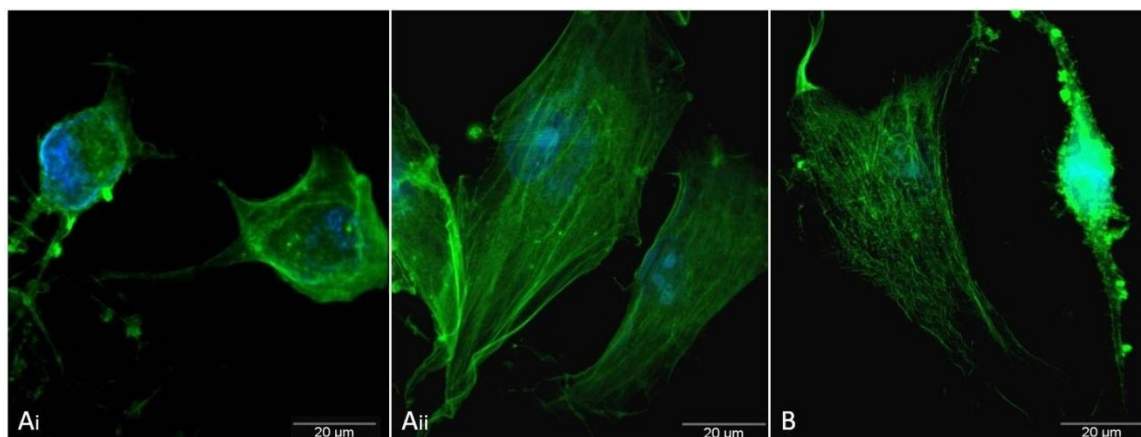
Slika 13: Slike keratinocitov posnete s fluorescentno mikroskopijo: celice po 24h izpostavitve TK1 (A,C,E) in TK2 (B,D,F) pri koncentraciji 0,5 mg/ml (A,B); 2 mg/ml (C, D) ter 5 mg/ml (E,F). Modro so obarvana jedra, zeleno pa aktinska vlakna. Na sliki B sta s puščico označeni sosednji celici, ki sta izgubili medsebojno povezavo. Na sliki E lahko vidimo razlito celično jedro (označeno s puščico).

Fibroblasti: Kontrolne celice fibroblastov so bile vretenaste oblike, snopi aktinskih vlaken so bili vzdolžni in lepo vidni (slika 14A). Slika 14 prikazuje celice po 4h izpostavitve TK1, v primerjavi s sistemom TK2 namreč ni bilo razlik. Pri TK s koncentracijo 0,5 mg/ml so bile določene celice še vedno podobne kontrolnim, razločno se je videlo vzdolžna aktinska vlakna (Slika 14Bi), medtem ko so bile nekatere očitno morfološko spremenjene – celice

so postale tanjše, še vedno so bile podolgovate, a odebeljene le okoli jedra, posameznih aktinskih snopov se ni dalo več razločiti. Opazili smo tudi mikrofilamente (slika 14Bii). Pri višjih koncentracijah smo opazili podobno spremenjene celice ter nobenih celic, ki bi bile podobne kontrolnim (slika 14C in 14D). Pri tem je potrebno poudariti, da smo pred barvanjem celice pogledali tudi pod svetlobnim mikroskopom in da dobljena slika pod invertnim mikroskopom ni bila primerljiva s sliko celic pred njihovim štejetjem celic (0,5 mg/ml, 4h). Videlo se je namreč že, da so nekatere celice tanjše in zadebeljene le okoli jedra, te spremembe pa smo potem seveda opazili tudi pod fluorescentnim mikroskopom. Ugotovili smo torej, da je občutljivost fibroblastov na TK različna pri različnih bioloških ponovitvah. Enako je bilo po 24h izpostavitve 0,5 mg/ml TK. Nekatere celice so bile zelo poškodovane, okrogle oziroma poligonalne oblike in ne več podolgovate, snopi aktinskih vlaken niso bili več jasno razločni in vzdolžni, medtem ko so določene celice ohranile jasno razločne vzdolžne snope aktinskih vlaken (slika 15).



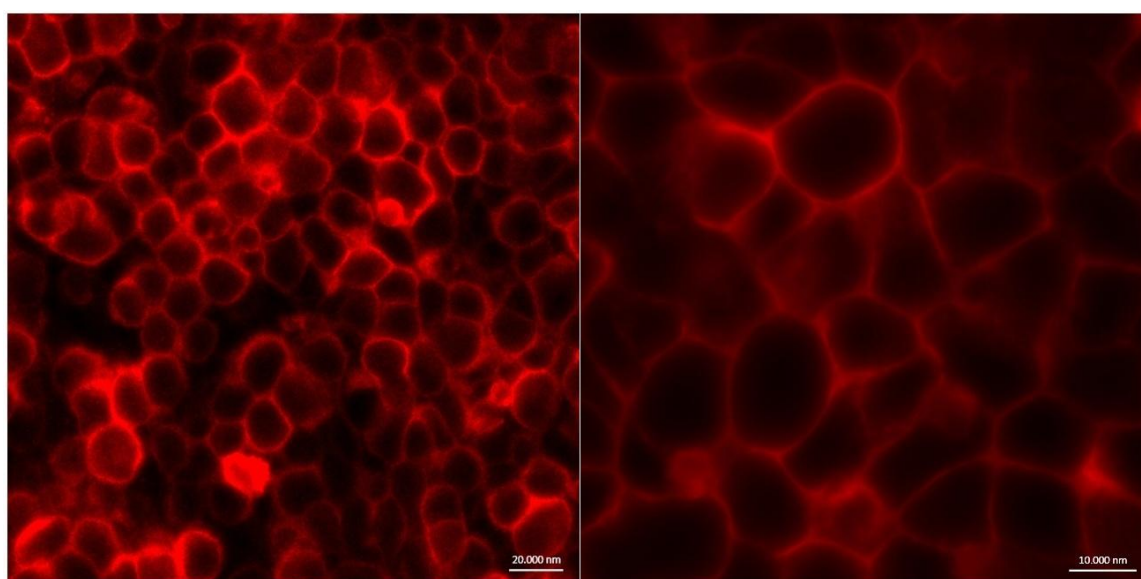
Slika 14: Slike fibroblastov posnete s fluorescentno mikroskopijo: kontrolne celice (A) in celice po 4h TK1 s koncentracijo 0,5 mg/ml (B), 2 mg/ml (C) in 5 mg/ml (D). Modro so obarvana jedra, zeleno pa aktinska vlakna. Na sliki Bi so celice, ki morfološko še podobne kontrolnim, na sliki Bii pa že spremenjene. S puščicami so označeni vidni mikrofilamenti.



Slika 15: Slike fibroblastov posnete s fluorescentno mikroskopijo: celice po 24h 0,5 mg/ml TK1 (Ai in Aii) in TK2 (B). Modro so obarvana jedra, zeleno pa aktinska vlakna. Opazimo posamezne celice z zgoščenim aktinom okoli jedra in celice z veliko aktinskimi vlakni, ki so vzporedni in razporejeni široko okoli jedra.

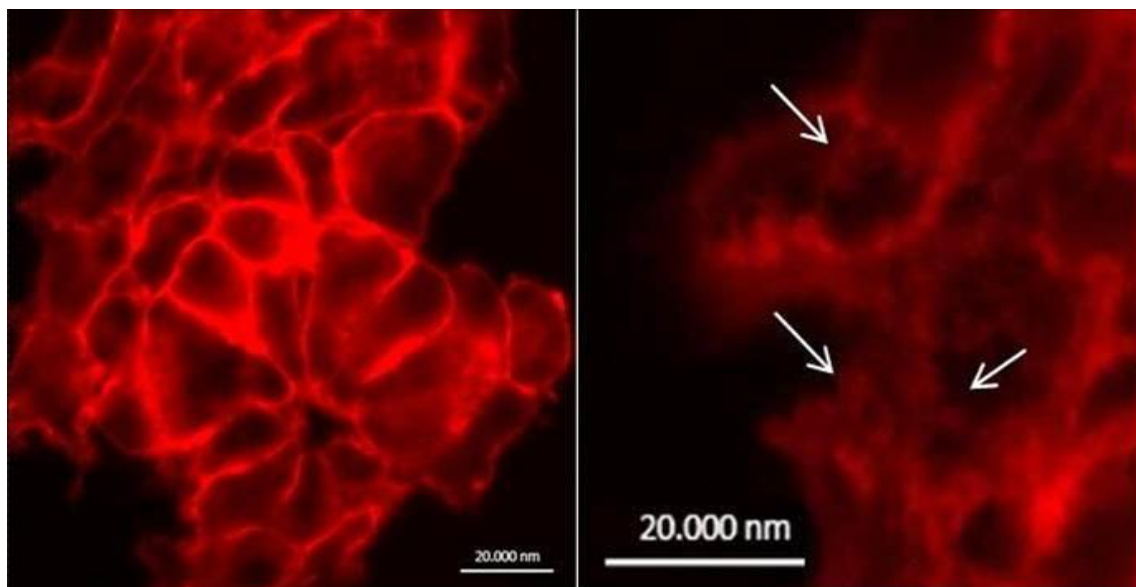
4.4.2 Barvanje membrane

Membrane keratinocitov smo barvali s CellMask™ Deep Red barvilom za membrane, in sicer kontrolne ter tretirane (4h, 0,5 mg/ml) celice. Ker na Katedri za farmacevtsko tehnologijo v okviru dosedanjih raziskav še niso preučevali membrane celic s fluorescentnim barvilom, smo se odločili, da bomo preliminarni poskus izvedli na keratinocitih, saj so fibroblasti v kulturi bolj sploščeni. Barvali smo žive celice; že sama fiksacija celic namreč povzroči spremembe v membrani zaradi prečnega premreževanja. Pri kontrolnih celicah smo opazili, da so slednje blizu skupaj, vidna je bila poligonalna oblika (slika 16).



Slika 16: Kontrolni keratinociti s fluorescentno obarvano membrano. Na desni strani je približana slika.

Po tretiranju celic s TK1 smo opazili, da so bile celice v velikih skupkih, močno zbite skupaj in niso bile podobne kontroli. Notranjost celice je bila že na začetku opazovanja pri večini celic nekoliko obarvana (vstop barvila v notranjost celice), a so membrane močnejše fluorescirale. Na sliki 17 je opazna tudi sprememba membrane celic (označeno s puščico).



Slika 17: Keratinociti s fluorescentno obarvano membrano po 4h izpostavljenosti TK1 s koncentracijo 0,5 mg/ml. Na desni strani je približana slika, s puščicami so označene spremembe na membrani.

Posamezne celice so s časom postajale vedno bolj okrogle, skupki so postajali vse bolj zbiti, notranjost celic pa vse bolj rdeča zaradi difuzije barvila. To se je dogajalo že med samim slikanjem celic, tako da tudi dve zaporedni sliki nista bili več enaki. Podoben učinek smo opazili tudi pri 0,5 mg/ml TK2 in kontrolnih celicah (po 30 min so bile tudi kontrolne celice namreč zaobljene, videli smo lahko združene zbite skupke z rdeče obarvano notranjostjo). Do sprememb je prišlo zaradi neustreznih pogojev, v katerih so se nahajale celice na preparatih. Izpostavljene so bile sobni temperaturi in atmosferskemu zraku in ker niso bile fiksirane, so se začele odlepljati od podlage, pri čemer so se zaoblile in združile v zbite skupke. Efekt se je s časom drastično slabšal in kljub optimizaciji se mu ni dalo izogniti (zaradi neizogibnega prenosa preparatov do mikroskopa, zagona mikroskopa in stabilizacije laserja, odsotnosti fiksacije ter časa, potrebnega za pridobitev slike). Zato menimo, da so bile celice pri 0,5 mg/ml TK1 združene v velike skupke zaradi neustreznih pogojev in ne zaradi vpliva TK. Spremembe na membrani pa pripisujemo izpostavitvi TK, saj je do tega najverjetneje prišlo zaradi odebeljenih mikrofilamentov na robu celice pod površino membrane. Dopuščamo tudi možnost, da so TK že nekoliko

poškodovali celice, zaradi česar je hitreje prišlo do spremembe preparata, tj. združevanja celic v skupke, spremembe oblike iz poligonalne v okroglo in nenazadnje tudi hitrejšega vstopa barvila v notranjost celice zaradi poškodbe membrane.

5 Razprava

S testom aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze smo ugotovili, da so citotoksični učinki TK koncentracijsko in časovno odvisni. Tornier in sodelavci so pri proučevanju 50 različnih snovi, ki bi lahko povzročile iritacijo kože, na rekonstruiranem kožnem modelu snov opredelili kot neiritabilno, če je bil delež celične proliferacije večji od 85 % glede na kontrolo in za iritabilno, če je bil delež celične proliferacije manjši od 50 % glede na kontrolo (upoštevali pa so tudi histologijo celic in količino sproščenega IL-1 α) (31). Faller in sodelavci so pri testiranju kozmetičnih pripravkov na rekonstruiranem kožnem modelu po 16h izpostavitve z uporabo MTT reagenta vrednost 50 % uporabili kot mejno za opredelitev iritabilnosti (69). Problem vrednotenja iritantov na celičnih kulturah pa je, da orientacijske vrednosti niso podane. Za opredelitev citotoksičnosti testiranih sistemov tekočih kristalov smo zato upoštevali omenjene mejne vrednosti, kljub temu da so celične linije bolj občutljiv sistem in bi bile vrednosti proliferacije zagotovo višje na rekonstruiranih kožnih modelih.

Pri najnižji koncentraciji (0,5 mg/ml) po kratkotrajni izpostavitvi (4h) pri keratinocitih še ni prišlo do razlike v metabolni aktivnosti glede na kontrolo, pri dolgotrajni izpostavitvi pa se je znižala, a je bila še vedno nad 70 %. Vrednost celične proliferacije tudi pri najvišji koncentraciji (5 mg/ml) ni bila manjša od 60 % in tudi po dolgotrajni izpostavitvi (24h) je šele pri najvišji koncentraciji padla pod 50 %, kar nakazuje na zelo nizko citotoksičnost testiranih sistemov. Pri fibroblastih je bila metabolna sposobnost po kratkotrajni izpostavitvi koncentraciji 0,5 mg/ml nižja od kontrole (75 % (TK1) in 83 % (TK2)), po daljšem času izpostavitve (24h in 72h) pa se je zvišala in bila primerljiva s kontrolo. Koncentracije nad 2 mg/ml so se izkazale za citotoksične, sploh po 24h je bila celična proliferacija zanemarljivo majhna (manjša od 6 %). Po 72h pa se je celična proliferacija občutno zmanjšala tudi pri koncentraciji 1 mg/ml (55 % (TK1) in 24 % (TK2)). Koncentracijo 0,5 mg/ml za oba sistema TK in pri obeh vrstah celic smo zaradi navedenih rezultatov opredelili kot subtoksično, torej pri tej koncentraciji TK ne vplivajo na metabolno aktivnost celic.

Iz rezultatov je razvidno tudi, da so si fibroblasti pri najnižji koncentraciji TK po dolgotrajni izpostavitvi opomogli; po 4h je bila proliferacija manjša od kontrolne, po daljšem času izpostavitve (tako 24h kot 72h), pa je bil rezultat boljši in razlike s kontrolo nismo več opazili. Z MTS testom smo nadalje ugotovili, da so fibroblasti bolj občutljivi na toksične učinke TK kot keratinociti, saj je bila sposobnost proliferacije fibroblastov pri

koncentracijah TK, višjih od 1 mg/ml, v vseh časovnih točkah manjša kot pri keratinocitih. Do podobne ugotovitve so prišli tudi Sanchez in sodelavci, ki so v svoji študiji na celičnih linijah človeških keratinocitov in fibroblastov preučevali citotoksičnost PAS na osnovi lizina z uporabo testa celične proliferacije (MTT) in privzema nevtralnno rdečega po 24h izpostavitve PAS v različnih koncentracijah. Ugotovili so, da so bili citotoksični učinki bolj izraženi pri fibroblastih kot pri keratinocitih. Vzrok je v različni strukturi in fiziologiji celic, saj so keratinociti celice povrhnjice, fibroblasti pa usnjice, zaradi česar so zaključili, da so testi na keratinocitih boljši za napovedovanje iritacije kože (70).

Ob primerjavi sistemov TK1 in TK2 smo opazili, da je bila metabolna sposobnost pri keratinocitih po 4h pri vseh koncentracijah višja za sistem TK1 kot za TK2, po 24h pa se je trend obrnil. Razlika je bila značilna le pri koncentraciji 5 mg/ml po 24h, kjer je torej TK1 bolj znižal vrednost celične proliferacije. Pri fibroblastih tako enosmerne razlike med sistemoma nismo opazili, smo pa ugotovili značilno razliko v proliferaciji med sistemoma pri koncentraciji 0,5 mg/ml po 4-urni in 24-urni izpostavitvi ter 1 mg/ml po 24-urni izpostavitvi, kjer je TK1 bolj zmanjšal metabolno aktivnost celic kot TK2. Te značilne razlike pri 0,5 mg/ml po 72h ni bilo več, pri 1 mg/ml pa je obveljalo, da TK1 značilno bolj zniža proliferacijo kot TK2. Kjer smo uspeli potrditi značilno razliko med sistemoma, se je torej pokazalo, da TK1 bolj zniža celično proliferacijo kot TK2. To je pričakovano, saj ima TK2 večji delež vode na račun manjšega deleža IPM. IPM je sicer netoksičen in tudi v študiji, ki so jo naredili Savić in sodelavci, so z *in vitro* ter *in vivo* testi potrdili, da je formulacija na osnovi naravnega kombiniranega emulgatorja (cetearilglukozida in cetearilalkohola) in IPM kot lipofilne komponente varna in primerna za uporabo na koži, so pa ob zviševanju koncentracije izbrane formulacije na kožnem modelu opazili znižanje celične proliferacije (28).

S primerjavo vpliva TK in SDS (referenčni iritant) na celično proliferacijo smo uspeli dokazati, da TK statistično značilno manj okrnejo metabolno aktivnost celic pri vseh časovnih točkah in koncentracijah, razen pri fibroblastih po 24h pri najvišjih dveh koncentracijah TK (2 in 5 mg/ml), kjer je bila metabolna sposobnost celic že tako prizadeta (~ 5 % (2 mg/ml) in 1 % (5 mg/ml)), da razlike s SDS (~ 0 %) niso bile izražene. Kjer so bile razlike značilne, to pomeni, da TK ne bi mogli povzročiti iritacije na koži v takšnem obsegu, kot jo povzroči SDS pri enaki koncentraciji in času izpostavitve. To pa je pričakovano, saj je SDS anionska PAS, za katere velja, da so pri aplikaciji bolj problematične v smislu iritabilnosti (27), medtem ko testirana sistema TK vsebujeta

neionsko (Tween 80) in zwitterionsko (lecitin) PAS, ki poleg tega veljata za nedražeči, imata GRAS status in se uporabljata v dermalnih pripravkih.

Opazovanje celic pod invertnim svetlobnim mikroskopom je pokazalo, da najnižja koncentracija TK (0,5 mg/ml) ni vplivala na rast in obliko celic po kratkotrajni izpostavitvi, pri fibroblastih pa niti po dolgotrajni. Opazili smo, da so posamezni keratinociti po 24h izpostavitvi 0,5 mg/ml postali bolj zaobljeni, število medceličnih stikov pa se je zmanjšalo. Ta efekt je bil pri višjih koncentracijah opazen že po kratkotrajni izpostavitvi, celice pa so se s povečevanjem koncentracije TK v veliki meri odlepile od podlage. Po 24h pri 5 mg/ml skorajda nobena celica ni bila več prilepljena na podlago.

Pri fibroblastih sta spremenjena oblika in manjša gostota celic postali izraziti že pri 4h izpostavitve koncentraciji 2 mg/ml. Celice so bile sicer podolgovate, a odebeljene zgolj okoli jedra, število medceličnih stikov se je zmanjšalo. Pri dolgotrajnejši izpostavitvi oz. višji koncentraciji so celice izgubile podolgovato obliko in postale okrogle, brez medceličnih stikov, večina se jih je odlepila od podlage. Pri 5 mg/ml po 24h so bile vse celice odlepljene.

Slike pod svetlobnim mikroskopom se torej ujemajo z rezultati testa celične proliferacije – pri višjih koncentracijah in dolgotrajnejši izpostavitvi smo opazili spremembe oblike in gostote celic, metabolna aktivnost pa se je zmanjšala, s to razliko, da:

- a) pri koncentraciji 0,5 mg/ml pod mikroskopom nismo opazili sprememb fibroblastov, njihova metabolna aktivnost pa je bila po 4h pri tej koncentraciji nekoliko zmanjšana;
- b) pod invertnim svetlobnim mikroskopom nismo opazili nobene razlike med sistemoma TK1 in TK2.

Pri štetju celic smo dobili rezultate, ki niso povsem skladni z ugotovitvami ostalih testov. Namreč, pri najnižji koncentraciji TK (0,5 mg/ml) po 4-urni izpostavitvi se ni zmanjšalo niti število živih fibroblastov niti živih keratinocitov pri TK1, pri TK2 pa je delež živih keratinocitov padel na približno tri četrtine, po 24h pa je bil delež živih fibroblastov okoli 50 %, medtem ko pod invertnim svetlobnim mikroskopom nismo opazili sprememb ali zmanjšane gostote fibroblastov v primerjavi s kontrolo ne po 4h ne po 24h. Nadalje, pri testu aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze smo ugotovili, da imajo fibroblasti metabolno sposobnost okoli 80 % po 4h ter primerljivo s kontrolo (~ 100 %) po 24h, keratinociti pa ~ 100 % sposobnost proliferacije po 4h izpostavitve tako TK1 kot TK2. Za

fibroblaste neujemanje rezultatov omenjenih testov lahko pojasnimo s hipotezo, da TK povzročijo spremembe celic, ki jih ne opazimo pod svetlobnim mikroskopom, a vplivajo na zmanjšano proliferacijo, so pa te celice še vedno žive, zato je tudi število živih celic primerljivo s kontrolo. Tako za keratinocite kot fibroblaste smo pri višji koncentraciji (2 mg/ml) oziroma dolgotrajnejši izpostavitvi (24h) TK prešteli zelo majhno ali ničelno število živih celic, kar ni skladno niti z MTS testom niti s slikami celic, ki smo jih posneli tik pred štetjem celic. Naša teorija je naslednja: TK povzročijo poškodbe membrane, ki so neopazne pod svetlobnim mikroskopom in ne vplivajo na proliferacijo celic, vendar tripsin kot proteaza med postopkom priprave vzorcev za štetje celic slednjih ne samo odlepi od podlage, ampak tudi začne razgrajevati. Razgradi pa tudi že bolj poškodovane in mrtve odlepljene celice. Slednjo ugotovitev podpira dejstvo, da je bil delež mrtvih celic majhen, opazili pa smo številne manjše obarvane delce, ki so najverjetneje razpadni fragmenti celic. Rezultati štetja celic so v veliki meri kontradiktorni in jih zato ne moremo upoštevati kot zanesljive, potrebna bi bila namreč nadaljnja optimizacija in ponovitev eksperimenta.

Morfološke spremembe celic smo pod fluorescentnim mikroskopom opazili že po 4h izpostavitve najnižji koncentraciji (0,5 mg/ml). TK so vplivali na aktinska vlakna; najverjetneje je, da so PAS povzročile denaturacijo aktina, zato se je pri keratinocitih zmanjšalo število finih intercelularnih povezav, ki so izgledale odebeljene, mikrofilamenti na robovih celic pa so se zaradi denaturacije združili in odebelili v primerjavi s kontrolnimi celicami, prav tako niso služili povezovanju s sosednjimi celicami. Aktinska vlakna so bila na robovih celic videti »ostrejša«. Pri fibroblastih pa so bile nekatere celice po izpostavitvi najnižji koncentraciji TK tako po 4h kot po 24h še podobne kontrolnim, torej vretenaste z jasno definiranimi vzdolžnimi aktinskimi vlakni, spet druge pa so bile ožje, snopi aktinskih vlaken niso bili več lepo vidni in tako kot pri keratinocitih smo opazili mikrofilamente na robovih celic.

Pri višjih koncentracijah in dolgotrajnejši izpostavitvi (24h) se je zaradi denaturacije pri obeh vrstah celic povečevala gostota aktina okoli jeder, pri fibroblastih ni bilo več jasno izraženih vzporednih snopov aktinskih vlaken. Po dolgotrajni izpostavitvi TK odebeljeni mikrofilamenti na robovih celic niso bili več opazni v tako veliki meri kot po 4h. Ker je aktinski skelet odgovoren tudi za vzdrževanje oblike celice in pritrjevanje na podlago, je pri keratinocitih prišlo do »zbitja« celic v skupke, kar smo opazili kot približevanje jeder (jedra posameznih celic so bila namreč zelo blizu skupaj), obe vrsti celic sta se zaoblili,

oslabila pa je tudi sposobnost adhezije, zato so se keratinociti in fibroblasti odlepljali od podlage, zaradi česar smo na preparatu težje našli celice za proučevanje. Ti rezultati se skladajo z opaženo zmanjšano gostoto in večjo zaobljenostjo celic pod invertnim svetlobnim mikroskopom ter zmanjšano metabolno aktivnostjo pri testu celične proliferacije. Vseeno pa smo tudi po 24h pri najvišji koncentraciji (5 mg/ml) našli nekaj keratinocitov, ki se še niso zaoblili in so imeli aktinska vlakna razporejena dokaj enakomerno okoli jedra. Te celice so najverjetneje še bile metabolno aktivne, in so prispevale k sicer relativno nizki proliferaciji, ki je znašala 8 % za TK1 in 24 % za TK2. Tudi pod fluorescentnim mikroskopom razlik po izpostavitvi TK1 in TK2 nismo opazili. Pri testu celične proliferacije na fibroblastih po 24h 0,5 mg/ml TK nismo ugotovili razlike glede na kontrolo in tudi pod svetlobnim invertnim mikroskopom pri tej koncentraciji nismo opazili razlik v gostoti in obliki celic glede na kontrolo ne po kratkotrajni, ne po dolgotrajni izpostavitvi; pred barvanjem s fluorescentnimi barvili in pod fluorescentnim mikroskopom pa so bile nekatere celice že morfološko spremenjene. Tako da lahko zaključimo, da se je na celični liniji fibroblastov morfolologija tretiranih celic zelo razlikovala tako znotraj ene posamezne kot tudi med biološkimi ponovitvami.

S fluorescentnim barvanjem membrane smo potrdili, da so keratinociti v kulturi poligonalne oblike. Opazili smo, da so imele tretirane celice spremenjeno površino zaradi mikrofilamentov pod membrano, kar pripisujemo vplivu izpostavljenosti TK, saj smo tudi pri barvanju aktinskih vlaken opazili debelejše mikrofilamente na robovih tretiranih celic. Glede na to, da je pri celicah, ki so bile izpostavljene TK, prišlo do hitrejšega vstopa barvila v notranjost celice, predvidevamo, da je že prišlo do določenih poškodb membrane, kar se sklada z ugotovitvami proučevanja keratinocitov z AFM (68). Nenazadnje smo prišli do ugotovitve, da je opazovanje membran živih celic, ki torej predhodno niso fiksirane, kompleksno. Zaradi za celice neustreznih pogojev, pri katerih izvajamo poskus (sobna temperatura in atmosferski zrak), je zelo hitro prišlo do sprememb preparata že med samim slikanjem, zato tudi težko ovrednotimo (minimalne) spremembe zaradi tretiranja celic napram izrazitim spremembam zaradi neustreznih pogojev.

Predpostavljen mehanizem vpliva TK na celice je torej sledeč: PAS, ki se v TK nahajajo, porušijo urejeno strukturo lipidnih dvoslojev v membrani in začnejo prodirati v notranjost celice, kjer pridejo v stik z mikrofilamenti in povzročijo denaturacijo aktina, kar se kaže v

spremenjeni morfologiji in zmanjšani adhezivnosti celic. Koncentracijo 0,5 mg/ml lahko opredelimo kot subtoksično (celična proliferacija ~ 100 %), hkrati pa smo pri tej koncentraciji pod fluorescentnim mikroskopom že opazili morfološke spremembe.

6 Sklep

V okviru diplomske naloge smo ugotovili, da je vpliv TK na celične linije keratinocitov in fibroblastov časovno in koncentracijsko odvisen. Pod svetlobnim mikroskopom smo opazili, da celice z višanjem koncentracije TK spremenijo svojo obliko ter da se delež pritrjenih celic zmanjšuje. S testom aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze smo ugotovili, da so fibroblasti bolj občutljivi na TK kot keratinociti, kar je razvidno pri koncentracijah, višjih od 1 mg/ml. Metabolna aktivnost keratinocitov je bila pri najnižji koncentraciji TK (0,5 mg/ml) po 4h primerljiva s kontrolo, po 24h pa se je nekoliko zmanjšala (okoli 75 %). Metabolna aktivnost fibroblastov po dolgotrajni izpostavitvi (24 h) pri koncentraciji TK 0,5 mg/ml se je obnovila, saj je bil delež proliferacije enak kot pri kontroli, medtem ko je bila po 4h 75 % (TK1) oz. 83% (TK2). Pri tem je potrebno opozoriti, da smo na celični liniji fibroblastov pod fluorescentnim mikroskopom opazili visoko variabilnost odziva tako znotraj posamezne kot med večimi biološkimi ponovitvami. Kljub temu da smo s testom mitohondrijske dehidrogenaze v nekaterih časovnih točkah in pri določenih koncentracijah TK dobili rezultate, ki nakazujejo na to, da sistem TK1 statistično značilno bolj zniža proliferacijo kot TK2 - kar bi pričakovali, glede na manjši delež vode ter večji delež izopropilmiristata glede na TK2 - pa po vseh opravljenih eksperimentih ne moremo trditi, da je sistem TK1 bolj toksičen za celice, saj pod svetlobnim in fluorescentnim mikroskopom med sistemoma nismo opazili razlik.

Pri koncentraciji 0,5 mg/ml, ki se je pri testu aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze izkazala za subtoksično, smo pod fluorescentnim mikroskopom že po kratkotrajni izpostavitvi lahko opazili začetne morfološke spremembe tako pri keratinocitih kot pri fibroblastih, ki pa očitno še ne vplivajo na sposobnost celične proliferacije. Na robovih keratinocitov smo opazili debelejša mikrofilamente in ponekod že zgoščena aktinska vlakna. Pri povečevanju koncentracije oz. podaljševanju časa izpostavitve se je število celic zmanjšalo, začele so se odlepljati od podlage, saj se je njihova adhezija zmanjšala zaradi sprememb v strukturi mikrofilamentov. Celice, ki so bile še žive, so bile bolj zaobljene, imele so manjše število intercelularnih povezav in zgoščen aktin okoli jedra. Pri fibroblastih pa so se spremembe kazale kot izguba jasno razločnih vzdolžnih snopov aktinskih vlaken. Predvidevamo, da so vzrok za spremembe aktinskih vlaken PAS v TK, ki so povzročile denaturacijo aktina. Mikrofilamenti na robovih celic so se najbrž združili in ker so bili odebeljeni, so bili tudi bolj vidni.

Barvanje membrane keratinocitov je pokazalo spremembe v membrani po 4h izpostavitve 0,5 mg/ml TK. Opazili smo namreč spremenjeno površino celic zaradi mikrofilamentov, barvilo pa je zaradi poškodb membrane nekoliko hitreje vstopalo v celico. PAS so najverjetneje začele rušiti strukturo lipidnih dvoslojev v membrani in prodirale v notranjost celice, zaradi česar je tudi aktin prišel v stik s PAS. Metoda proučevanja fluorescentno obarvane membrane se je izkazala za težavno, ker se celice pri sobni temperaturi in zraku začnejo odlepjati od podlage.

Glede na obetavne rezultate vrednotenja citotoksičnosti TK na celičnih linijah, ki so že tako bolj občutljive kot rekonstruirani kožni modeli, bi lahko biološko sprejemljivost TK kot novih nosilnih sistemov nadalje vrednotili na rekonstruiranih kožnih modelih.

7 Literatura

1. Martin A: Physical pharmacy, 4th ed, Lea&Febriger, London, 1993: 36 – 7.
2. Müller-Goymann C.C: Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 2004; 58(2): 343-56.
3. Gosenca M, Gašperlin M: Tekoči kristali v farmaciji: struktura in metode za fizikalno-kemijsko vrednotenje. *Farmacevtski vestnik* 2011; 62: 15-25.
4. Cui Y: A material science perspective of pharmaceutical solids. *International journal of pharmaceutics* 2007; 339: 3–18.
5. Spletni vir: <http://dept.kent.edu/spie/liquidcrystals>. Datum dostopa: 13.2.2013
6. Klein K: Liquid Crystals and Emulsions: A Wonderful Marriage. In: Wiechers J.W: Skin Barrier: chemistry of Skin delivery systems, Allured Publishing Corporation, 265-71.
7. Makai M, Csanyi E, Nemeth Zs, Palinkas J, Eros I: Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. *International journal of pharmaceutics* 2003; 256: 95–107.
8. Shah JC, Sadhale Y, Chilukuri D.M: Cubic phase gels as drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews* 2001; 47(2-3): 229-50.
9. Guo C, Wang J, Cao F, Lee R.J, Zhai G: Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. *Drug discovery today* 2010; 15(23/24): 1032-40.
10. Libster D, Aserin A, Garti N: Interactions of biomacromolecules with reverse hexagonal liquid crystals: drug delivery and crystallization applications. *Journal of colloid and interface science* 2011; 356(2): 375-86.
11. Nesseem DI: Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2001; 26(3): 387-99.
12. Tadwee I, Shahi S, Ramteke V, Syed I: Liquid Crystals Pharmaceutical Application: A Review. *International journal of pharmaceutical research & allied sciences* 2012; 1(2): 6-11.
13. Cör A, Cvetko E, Marš T: Anatomija, histologija in fiziologija, 2. izdaja, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2008: 23-29.

14. Kogan A, Garti N: Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Advances in colloid and interface science* 2006; 123–126: 369-85.
15. Narasimha Murthy S, Shivakumar H.N: Topical and transdermal drug delivery. In: Kulkarni V.S: *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*. Elsevier Inc., 2010: 1-36.
16. Kansky A, Miljković J: *Kožne in spolne bolezni*, 2. dopolnjena izdaja, Združenje slovenskih dermatovenerologov, Ljubljana, 2009: 11-19.
17. Barry B.W: Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European journal of pharmaceutical sciences* 2001; 14(2): 101-14.
18. Naik A, Kalia Y.N, Guy R.H: Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *Pharmaceutical science & technology today* 2000; 3(9): 318-26.
19. Kopčavar-Guček N: Kontaktni dermatitis in urtikarija v družinski medicini. In: *Zbornik predavanj: V. Fajdigovi dnevi, Združenje zdravnikov družinske medicine – SZD*, 2003: 33-40.
20. Raoux M, Azorin N, Colomban C, Rivoire S, Merrot T, Delmas P, Crest M: Chemicals inducing acute irritant contact dermatitis mobilize intracellular calcium in human keratinocytes. *Toxicology in vitro* 2012; 27(1): 402-8.
21. Welss T, Basketter D.A, Schröder K.R: In vitro skin irritation - facts and future. *State of the art review of mechanisms and models. Toxicology in vitro* 2004; 18(3): 231-43.
22. Gosenca M, Gašperlin M, Kristl J: Iritativni kontaktni dermatitis: od mehanizmov do vrednotenja iritantov. *Farmacevtski vestnik* 2012; 63: 145–52.
23. Karande P, Mitragotri S: Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. *Biochimica et biophysica acta* 2009; 1788(11): 2362-73.
24. Lawrence J.N: Application of in vitro human skin model to dermal irritancy: a brief overview and future prospects. *Toxicology in vitro* 1997; 11: 305–12.
25. DeLeo V.A, Carver M.P, Hong J, Fung K, Kong B, DeSalva S: Arachidonic acid release: an in vitro alternative for dermal irritancy testing. *Food and chemical toxicology* 1996; 34(2): 167-76
26. Sugibayashi K, Watanabe T, Hasegawa T, Takahashi H, Ishibashi T: Kinetic analysis on the in vitro cytotoxicity using Living Skin Equivalent for ranking the toxic potential of dermal irritants. *Toxicology in vitro* 2002; 16(6): 759-63.

27. Weyenberg W, Filev P, Van den Plas D, Vandervoort J, De Smet K, Sollie P, Ludwig A: Cytotoxicity of submicron emulsions and solid lipid nanoparticles for dermal application. *International journal of pharmaceutics* 2007; 337: 291–98.
28. Savić S, Weber C, Savić M.M, Müller-Goymann C: Natural surfactant-based topical vehicles for two model drugs: Influence of different lipophilic excipients on *in vitro/in vivo* skin performance. *International journal of pharmaceutics* 2009; 381: 220–30.
29. Maia C.S, Mehnert W, Schäfer-Korting M: Solid lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids. *International journal of pharmaceutics* 2000; 196(2): 165-7.
30. Dreher F, Walde P, Walther P, Wehrli E: Interaction of a lecithin microemulsion gel with human stratum corneum and its effect on transdermal transport. *Journal of controlled release* 1997; 45(2): 131–40.
31. Tornier C, Rosdy M, Maibach H.I: In vitro skin irritation testing on reconstituted human epidermis: reproducibility for 50 chemicals tested with two protocols. *Toxicology in vitro* 2006; 20(4): 401-16.
32. Fentem J.H, Briggs D, Chesne C, Elliott G.R, Harbell J.W, Heylings J.R, Portes P, Roguet R, van de Sandt J.J.M, Botham P.A: A prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in vitro* 2001; 15: 57-93.
33. Robinson M.K, Osborne R, Perkins M.A: Strategies for the assessment of acute skin irritation potential. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 1999; 42: 1-9.
34. Basketter D.A, York M, McFadden J.P, Robinson M.K: Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. *Contact dermatitis* 2004; 51(1): 1-4.
35. Macfarlane M, Jones P, Goebel C, Dufour E, Rowland J, Araki D, Costabel-Farkas M, Hewitt N. J, Hibatallah J, Kirst A, McNamee P, Schellauf F, Scheel J: A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: Skin irritation. *Regulatory toxicology and pharmacology* 2009; 54: 188–96.
36. Roguet R: Use of skin cell cultures for in vitro assessment of corrosion and cutaneous irritancy. *Cell biology and toxicology* 1999; 15: 63-75.
37. Spletni vir: <http://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/cell-viability>. Datum dostopa: 12.2.2013.

38. Kojima H, Sato A, Hanamura A, Katada T, Konishi H: Evaluation of skin irritation in a reconstituted human dermal model (3-D model) using water insoluble fatty acids, fatty alcohols and hydrocarbons. *Alternatives to animal testing and experimentation* 1998; 5: 201-10.
39. Spletni vir: <http://alttox.org/ttrc/toxicity-tests/skin-irritation>. Datum dostopa: 13.2.2013
40. Spletni vir: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/validation-regulatory-acceptance/topical-toxicity/skin-irritation#ecvam-validated-test-methods. Datum dostopa: 13.2.2013.
41. Robinson M.K, Cohen C, de Fraissinette Ade B, Ponec M, Whittle E, Fentem J.H: Non-animal testing strategies for assessment of the skin corrosion and skin irritation potential of ingredients and finished products. *Food and chemical toxicology* 2002; 40(5): 573-92.
42. Rasmussen C, Gratz K, Liebel F, Southall M, Garay M, Bhattacharyya S, Simon N, Vander Zanden M, Van Winkle K, Pirnstill J, Pirnstill S, Comer A, Allen-Hoffmann B.L: The StrataTest[®] human skin model, a consistent in vitro alternative for toxicological testing. *Toxicology in vitro* 2010; 24(7): 2021-9.
43. Slovenski medicinski slovar. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Lek d. d., 2002.
44. Grinnell F: Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends in cell biology* 2003; 13(5): 264-9.
45. Abdel-Naser M.B, Abdallah M, de Almeida H.L, Wollina U: Human Skin Cell Culture and its Impact on Dermatology. *Egyptian dermatology online journal* 2005; 1(2): 1.
46. Lou P.J, Chiu M.Y, Chou C.C, Liao B.W, Young T.H: The effect of poly (ethylene-co-vinyl alcohol) on senescence-associated alterations of human dermal fibroblasts. *Biomaterials* 2010; 31(7): 1568-77.
47. Hazen M.J, Fernández Freire P, Pérez Martín J.M, Peropadre A, Herrero O, López C, Labrador V: The importance of microscopic analysis for accurate interpretation of chemical-induced cytotoxicity. In: *Microscopy: science, technology, applications and education*, Vol 3, Formatex research center, 2010: 2145-53.

48. Gaikwad R.M, Vasilyev S.I, Datta S, Sokolov I: Atomic force microscopy characterization of corneocytes: effect of moisturizer on their topology, rigidity and friction. *Skin research and technology* 2010; 16: 275-82.
49. Gutierrez-Venegas G, Contreras-Marmolejo L.A, Roman-Alvarez P, Barajas-Torres C: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide affects human gingival fibroblast cytoskeletal organization. *Cell biology international* 2008; 32: 417-26.
50. Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P: Actin stress fibers – assembly, dynamics and biological roles. *Journal of cell science* 2012; 125: 1855–64.
51. Reisler E, Egelman E.H: Actin structure and function what we still do not understand. *The Journal of biological chemistry* 2007; 282: 36133–7.
52. Lulevich V, Yang H.Y, Isseroff R.R, Liu G.Y: Single cell mechanics of keratinocyte cells. *Ultramicroscopy* 2010; 110(12): 1435-42.
53. Rudolf E, Cervinka M, Cerman J, Schroterova L: Hexavalent chromium disrupts the actin cytoskeleton and induces mitochondria-dependent apoptosis in human dermal fibroblasts. *Toxicology in vitro* 2005; 19(6): 713-23.
54. Spletni vir: <http://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/fluorescence>. Datum dostopa: 14.2.2013
55. Spletni vir: <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html>. Datum dostopa: 14.2.2013
56. Kocbek P, Teskač K, Kreft E. M, Kristl J: Toxicological aspects of long-term treatment of keratinocytes with ZnO and TiO₂ nanoparticles. *Small* 2010; 6(17): 1908-17.
57. Rowe R.C, Sheskey P.J, Weller P.J: *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Fourth Edition. American Pharmaceutical Association, 2003: 312-3, 340-1, 479-83.
58. Ash M, Ash I: *Handbook of Pharmaceutical Additives*, Second Edition, Synapse Information Resources Inc., New York, 2003: 668.
59. Martindale W: *Martindale The Extra Pharmacopoeia*, 31st Edition, The royal Pharmaceutical Society, London, 1996: 1345, 1720, 1763.
60. Lipoid S-100 specifikacija, Lipoid Nemčija.
61. CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, navodila za uporabo, Proomega, ZDA.

62. Spletni vir:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t8154?lang=en®ion=SI>.
Datum dostopa: 13.2.2013.
63. Spletni vir: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=AE496D11-5056-8A76-4E35-62B4E9B03510>. Datum dostopa: 13.2.2013.
64. Phalloidin, Fluorescein isothiocyanate labeled, specifikacija, Sigma-Aldrich, Nemčija.
65. CellMask™ Plasma Membrane Stains, navodila in protokol, Invitrogen, Nemčija.
66. William A.C, Barry B.W: Penetration enhancers. *Advanced drug delivery reviews* 2012; 64: 128-37.
67. Lastella M, Lasalvia M, Perna G, Biagi P.F, Capozzi V: Atomic force microscope study on human keratinocytes treated with HgCl₂. *Journal of physics* 2007; 61: 920-25.
68. Tavčar T: Vrednotenje strukture in citotoksičnosti tekočih kristalov. Diplomaska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2011.
69. Faller C, Brachera M, Damib N, Roguet R: Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics. *Toxicology in vitro* 2002; 16: 557-72.
70. Sanchez L, Mitjans M, Infante M.R, Vinardell M.P: Assessment of the potential skin irritation of lysine-derivative anionic surfactants using mouse fibroblasts and human keratinocytes as an alternative to animal testing. *Pharmaceutical research* 2004; 21(9): 1637-41.