

# Membrane za *in vitro* testiranje dermalne absorpcije

## Membranes for *in vitro* dermal absorption studies

Mirjam Gosenca, Mirjana Gašperlin

**Povzetek:** *In vitro* testiranja dermalne absorpcije zdravilnih učinkovin so pomemben del razvoja in vrednotenja dermalnih oz. transdermalnih dostavnih sistemov. Za določanje dermalne absorpcije *in vitro* nujno potrebujemo ustrezno membrano, ki v zadostni meri oponaša barierne lastnosti rožene plasti. V članku so predstavljene različne membrane, ki se uporabljajo: umetne membrane, živalska ter človeška koža in rekonstruirani celični kožni modeli.

**Ključne besede:** dermalna absorpcija, *in vitro* testi, človeška koža, kožne membrane

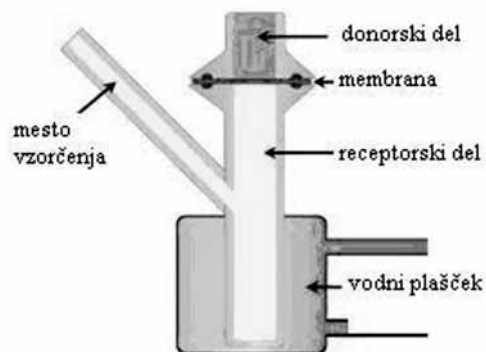
**Abstract:** The assessment of dermal absorption of molecules is one of the main steps in the initial design and later in the evaluation of dermal or transdermal drug delivery systems. Laboratory test systems require a membrane to mimic the barrier function of stratum corneum. The following membranes are discussed: synthetic membranes, animal models, human skin and reconstructed human epidermis.

**Key words:** dermal absorption, *in vitro* tests, human skin, skin membranes

### 1 Uvod

Dostava zdravilnih učinkovin v ali skozi kožo že dolgo ni več novost. Pri zdravljenju kožnih bolezni, ko je potrebno dostaviti zdravilno učinkovino v posamezne plasti kože, govorimo o dermalni dostavi (1). Transdermalna dostava učinkovin, tj. dostava skozi kožo v sistemski krvni obtok, pa predstavlja alternativo peroralnemu ali parenteralnemu dajanju učinkovin (2). Testiranje dermalne absorpcije je bistvenega pomena pri vrednotenju tako dermalnih kot transdermalnih farmacevtskih oblik. Dermalna absorpcija je krovní termin, ki opisuje difuzijo učinkovin skozi kožo. Obsega tri procese: penetracijo, permeacijo in absorpcijo. O penetraciji govorimo, ko učinkovina vstopa v posamezne plasti kože (npr. v roženo plast), permeacija opisuje prehod učinkovine med plastmi, ki so strukturno in funkcionalno različne, medtem ko se absorpcija nanaša na privzem učinkovine v krvni ali limfni sistem (3). Vendar je vrednotenje dermalne absorpcije praktično neizvedljivo *in vivo*, saj so testiranja na ljudeh pogosto etično sporna (npr. v razvojnih fazah, ko nimamo podatkov o toksičnosti učinkovin, pomožnih snoveh), draga in dolgotrajna. Problem je tudi velika inter- in intraindividualna variabilnost hitrosti in obsega absorpcije učinkovin, zaradi česar je razlaga rezultatov izredno zahtevna (4). Zato je pomembno, da imamo zanesljiv in ustrezno zasnovan *in vitro* sistem. Uporabljajo se difuzijske celice, največ statične Franz-ove difuzijske celice (slika 1), kjer je sistem v grobem razdeljen na donorski del, membrano in receptorski del (5). V donorskem delu je učinkovina, raztopljena v določenem pufru ali vgrajena v različne formulacije. Membrano, ki jo pri testiranju dermalnih oz. transdermalnih pripravkov predstavlja koža ali njeni nadomestki, namestimo tako, da je rožena plast obrnjena proti donorskemu delu

celice. Receptorski del je običajno napolnjen s pufrom pH=7,4, kar ustreza fiziološkemu pH, bistvena zahteva pa je zadostna topnost učinkovine v receptorskem mediju. Temperaturo receptorske tekočine lahko vzdržujemo na 32 °C, kar ustreza temperaturi na površini kože, ali pa vzpostavimo temperaturni gradient, tj. 32 °C na površini kože in 37 °C v receptorskem delu. Receptorska tekočina ne sme poškodovati membrane. Iz receptorskega dela v določenih časovnih intervalih jemljemo vzorce in z ustreznimi analiznimi metodami kvantitativno določimo vsebnost učinkovine (6). Rezultate podamo kot kumulativno količino sproščene učinkovine v določenem časovnem intervalu oziroma izračunamo tok učinkovine v stacionarnem stanju, nadaljnja obdelava rezultatov pa je odvisna tudi od tega, ali smo uporabili umetno membrano ali živalsko oz. človeško kožo.



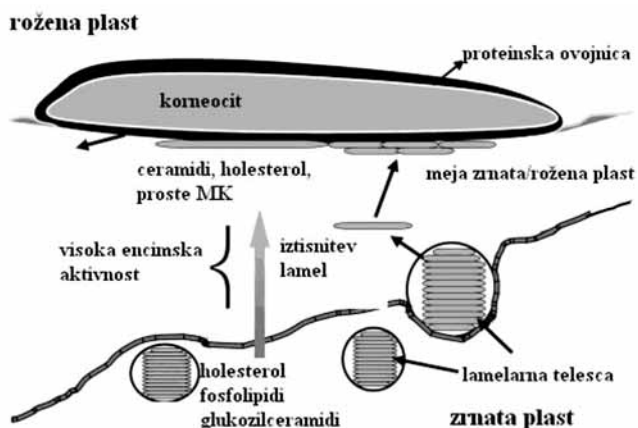
Slika 1: Franz-ova difuzijska celica.

Figure 1: The Franz diffusion cell system.

## 2 Zgradba kože

Koža je sestavljena iz epidermisa, dermisa in podkožja. Epidermis je najbolj zunanji del kože, brez veziva in žil. Je najtanjša plast kože, katere debelina (približno 150  $\mu\text{m}$ ) nekoliko niha na različnih predelih telesa. Sestavlja ga večplasten epitelij, v katerem večino celic predstavljajo keratinociti. Ti so podvrženi procesu diferenciacije, v katerem se proliferativne, nediferencirane celice pretvarjajo v visoko diferencirane celice, ki niso več sposobne delitve. Glede na stopnjo diferenciacije razdelimo epidermis na več plasti, in sicer nastajajo keratinociti v bazalni plasti, dozorevajo v trnasti in zrnati plasti ter odmirajo v roženi plasti, kjer poteka zadnja stopnja diferenciacije keratinocitov, to je sprememba v korneocite. Pod epidermisom leži 3-5 mm debela plast dermisa, kjer je glavno ležišče krvožilnega obtoka. Pod dermisom je podkožje, ki je v večini sestavljeno iz maščevja (7).

Rožena plast s svojo specifično zgradbo predstavlja bariero, zaradi katere je površina kože nepropustna oziroma selektivno propustna za vodo, ione in druge snovi. Rožena plast je najbolj zunanji del epidermisa, debela 10 do 40  $\mu\text{m}$ . Korneociti so obdani z ovojnico prečno premreženih proteinov. Novo nastali proteini, npr. profilagrin, loricin, involucrin, keratini 1 do 10 začnejo nastajati v keratohialinskih zrcnih v zrnati plasti. Profilagrin se pozneje pretvori v filagrin in služi za omreženje keratinskih niti v roženi plasti, ostali pa za učvrstitev ovojnice korneocitov. V trnasti plasti pa se pojavijo nove organele, imenovane lamelarna telesa ali Odlandova telesa, ki so sestavljena predvsem iz polarnih lipidov, razporejenih v obliki izmenjujočih se plasti, in hidrolitičnih encimov. V spodnjih plasteh epidermisa se lipidi sprostitjo v medcelični prostor, encimi pa pretvorijo polarne lipidne prekurzorje v nepolarne lipide in tako začne nastajati z lipidi bogat prostor med korneociti (slika 2). Holesterol, ceramidi in maščobne kisline so glavni gradniki intercelulernih lamel, ki so vzporedne s površino korneocitov. Medtem ko so ceramidi ključni za organizacijo lipidov, cholesterol olajša medsebojno strukturiranje različnih lipidov. Lipidi v roženi plasti tvorijo dve kristalinični lamelarni fazi, ki se ponavljata na 6,4 nm (short periodicity phase: SPP) oziroma 13,4 nm (long periodicity phase: LPP), manjši del lipidov pa tvori tekočo lipidno fazo. *In vivo* je struktura lipidov v ravnatežu med trdnim kristaliničnim (ortorombska ureditev) in gelskim ali tekoče kristalnim (heksagonalna ureditev) stanjem.



Slika 2: Sproščanje in pretvorba lipidov iz lamelarnih telesc (10)  
Figure 2: The lamellar extrusion process (10)

Ortorombska ureditev lipidov je najbolj gosto urejena konformacija in izkazuje najboljše barierne lastnosti (8, 9, 10). Vrsta in količina lipidov se razlikuje glede na anatomsko področje telesa.

## 3 Membrane za testiranje dermalne absorpcije

Za membrane, ki se uporabljajo za *in vitro* testiranje dermalne absorpcije, je zlasti pomembno, da oponašajo barierno funkcijo kože. Delimo jih na umetne in naravne. Med umetne prištevamo polimerne in filtrske membrane ter membrane, prevlečene z mešanico lipidov, med naravne membrane pa živalske kože in rekonstruirane celične kožne modele.

### Testiranje membranske integritete

Za vzorce biološkega tkiva je potrebno dokazati, da imajo ustrezno integriteto. Metode izolacije in priprave podvržejo tkivo tako fizikalnim kot kemijskim dejavnikom, ki ga lahko poškodujejo. Poškodbe zaradi ločitve plasti ali čiščenja so največkrat prikrite in jih ne zaznamo niti z mikroskopom. Prav tako pri bolezensko prizadeti koži, čeprav je v postopku ločitve plasti ne poškodujemo, zaznamo izrazito povečan tok učinkovine v receptorsko komoro, zaradi česar jo moramo izločiti iz eksperimenta. Čiščenje ali nepazljiva dehidracija lahko tudi umetnim membranam zmanjšata njihovo barierno funkcijo. Vendar v tem primeru zadostuje pregled površine s svetlobnim ali elektronskim mikroskopom, medtem ko so poškodbe bioloških tkiv navadno komaj zaznavne, zato je potrebna bolj občutljiva oz. zanesljiva metoda za oceno njihove integritete. Merimo lahko električno upornost ali primerjamo permeabilnostni koeficient modelne spojine s standardnimi vrednostmi za določeno membrano. Kot modelna spojina je zelo primerna voda, saj membrane ne poškoduje, zato lahko slednjo uporabimo za nadaljnja testiranja. Veliko raziskovalcev uporablja tritiarno ( $\text{T}_2\text{O}$ ) ali delno tritiarno vodo (HTO). Tritij je radioaktivni izotop vodika, posledično je potrebna ustrezna metoda detekcije v receptorski fazi. Voda, ki jo naneseemo, je v ravnatežu z vezano in prosto vodo v celičnih plasteh in hitro prehaja površinske plasti kože. Pri tem ne pride do nasičenja vezavnih mest v roženi plasti ali ostalih plasteh epidermisa, zato se izplavlja iz kože. Molekule, ki ostanejo v membrani, so v ravnatežu z fiziološko prisotno vodo in ne vplivajo na barierno funkcijo, povečani difuziji zaradi hidratacije kože pa se izognemo z ustrezno metodo nadaljnega dela (4).

### 3.1 Umetne membrane

Umetne membrane se v difuzijskih celicah uporabljajo predvsem za proučevanje vpliva različnih nosilnih sistemov na sproščanje učinkovine. To so največkrat polimerne membrane, ki so komercialno dostopne, enotne sestave znotraj serij, stabilne, delo z njimi pa je relativno preprosto. Kljub obsežni uporabi umetnih membran, ki oponašajo človeško kožo, transport skozi membrano ne velja kot ekvivalenten model dermalne absorpcije. Umetna membrana največkrat ne predstavlja difuzijske bariere, temveč zgolj fizično, ki ločuje preiskovan nosilni sistem od receptorskega medija.

Barierne lastnosti porozne membrane so odvisne od sposobnosti učinkovine, da vstopa in difundira skozi pore, kar je povezana z njeno molekularno maso, obliko in elektrostatskimi interakcijami z membrano. Nasprotno, neporozna membrana predstavlja večji upor za difuzijo, s

čimer bolje oponaša biološko tkivo. Barierne lastnosti so v tem primeru povezane s topnostjo učinkovine v polimernem ogrodju (porazdelitveni koeficient med vehiklom in membrano) ter sposobnostjo difuzije skozi polimer (4).

### 3.1.1 Filtrske membrane

Filtrske membrane se manj uporabljajo, saj ne predstavljajo bistvene bariere za difuzijo (11). Celulozne membrane navadno vsebujejo veliko mehčal ter konzervansov, ki lahko vplivajo na difuzijo učinkovin ali prehajajo v receptorsko tekočino in motijo detekcijo. Ker gre večinoma za vodotopne spojine, jih odstranimo tako, da membrano namakamo ali prevremo v vodi. V primerjavi s človeško kožo je absorpcija skozi celulozno membrano večja, in to ne glede na lastnosti molekule. Z modifikacijami molekule celuloze lahko vplivamo na lipofilne oz. hidrofilne lastnosti membrane. Za difuzijo hidrofilnih molekul se uporabljajo hidrofilne membrane, kot recimo membrane iz celuloznih estrov (celulozni acetat, nitrati) ali regenerirane celuloze. Membrana iz regenerirane celuloze je v nasprotju z membranami iz celuloznih estrov kemijsko in mehansko odpornejša, kompatibilna z vodnimi in organskimi topili, lahko jo uporabljamo v širokem pH območju.

### 3.1.2 Polimerne membrane

Difuzija molekul skozi umetno polimerno membrano je v mnogočem analogna difuziji skozi tekoče lipidno ogrodje. Hitrost prehoda skozi membrano je odvisna od tega, kako hitro se tvori ustrezno velik prazen prostor za prehod molekule. Večja kot je, več polimernih enot se mora preurediti. Pri tem sta najpomembnejša parametra mobilnost oziroma togost polimernih verig in topnost molekule v ogrodju, ki vpliva na porazdelitveni koeficient. V kristaliničnih področjih znotraj ogrodja je stopnja difuzije nižja, hkrati pa lahko tudi receptorska tekočina vpliva na rotacijo ali iztegnjenost polimernih segmentov in posledično permeabilnost membrane (4).

Za *in vitro* testiranja se pogosto uporabljajo silikonske membrane. Le-te so relativno inertne, neporozne in zaradi lipofilne narave idealne za testiranje lipofilnih učinkovin. Dodatek polnil, kot je silicijev dioksid, poveča mehansko odpornost in barierno funkcijo teh membran (4). Za testiranje je primerna tudi Carbosil membrana, ki je kemijsko blok kopolimer polidimetilsiloksana-polikarbonata (PDMS-PC). Dobro oponaša strukturo človeškega epidermisa, saj ima v svoji strukturi prav tako območja različnih polarnosti in faz, na katera lahko vplivamo s sestavo PDMS-PC polimera. Najprej poteče porazdeljevanje med bolj polarno PC in nepolarno PDMS domeno, ki ji sledi difuzija skozi mnogo bolj propustno PDMS ogrodje. Raziskave kažejo, da je korelacija dermalne absorpcije med človeško kožo in Carbosil membrano zelo dobra za vrsto učinkovin z zelo različnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi, strukturo in delovanjem (12).

### 3.1.3 Membrane, prevlečene z lipidno mešanico

Na porozen substrat kot je polikarbonatni filter z ustrezno metodo (npr. airbrush technique) razpršimo lipidno mešanico. Pri optimalnem razmerju med holesterolom, prostimi maščobnimi kislinami in ceramidi, se lipidi organizirajo podobno kot v roženi plasti. Tako se tvorijo izmenjujoči lamelarni fazi ter kristalinična področja, ki so vzporedna glede na osnovni substrat. Hkrati je nujno, da so lipidi enakomerno nanešeni na površino substrata, brez razpok ali luknjic (8).

## 3.2 Živalska koža

Zaradi omejenih virov in etičnih omejitev se za *in vitro* testiranja človeška koža nadomešča z živalsko, vendar so rezultati zaradi različne strukture kože težko primerljivi. Zaradi razlik v debelini kože, gostoti lasnih foliklov ter žlez, predvsem pa različne sestave lipidov v koži, prihaja tudi do razlik med posameznimi živalskimi vrstami ter glede na mesto odvzema kože. Pri tem je potrebno omeniti, da je živalska koža bolj dostopna kot človeška, zato lahko optimiziramo tako mesto odvzema in starost kot spol živali ter posledično zmanjšamo variabilnost rezultatov. Testiranja se izvajajo na različnih živalskih kožnih modelih, in sicer na opicah, prašičih, zajcih, miših, podganah in kačah, kakor tudi na živalih brez dlake (predvsem miših in morskih prašičkih). Pri večini živali je namreč koža pokrita z dlako ali krznom, kar je bistvena razlika glede na človeško kožo. Ugotovili so, da je s človeško kožo najbolj primerljiva prašičja in opičja. Velja pa splošno pravilo, da je dermalna absorpcija skozi živalsko kožo večja (13). Metode odvzema ter razslojevanja kože so podobne kot v primeru človeške kože, seveda z določenimi modifikacijami.

### 3.2.1 Prašičja koža

Prašičja koža se veliko uporablja, saj je tako morfološko kot v sestavi lipidov zelo podobna človeški. Na prašičjem uhlju so debelina rožene plasti (21-26  $\mu\text{m}$ ) in epidermisa (66-72  $\mu\text{m}$ ), pa tudi število dlak (20 dlak na  $\text{cm}^2$ ) in struktura kožnih izvodil približno enaka kot pri človeku, le da je premer lasnih foliklov pri prašiču približno enkrat večji. Podobna je tudi struktura kolagenskih vlaken in žilnega spleta v dermisu ter vsebnost glikosfingolipidov in ceramidov v roženi plasti (14).

### 3.2.2 Koža glodavcev

Veliko se uporablja tudi koža glodavcev, npr. miši in podgan. Prednosti uporabe glodavcev so predvsem praktične in ekonomske narave, saj gre za majhne živali, zato je delo z njimi oz. njihova oskrba relativno nezahtevna in poceni. Rezultati testiranja so sicer manj primerljivi s človeško kožo kot pri uporabi prašičje kože, vendar pri slednji pogosto naletimo na praktičen problem, saj so prašičji uhlji iz klavnice večinoma toplotno obdelani in kot taki neuporabni za testiranje dermalne absorpcije. Med glodavci je najustreznejši model podgana, pri kateri je obseg absorpcije do največ 3-krat večji kot pri človeški koži, v kolikor uporabimo celotno debelino kože.

### 3.2.3 Kačja koža

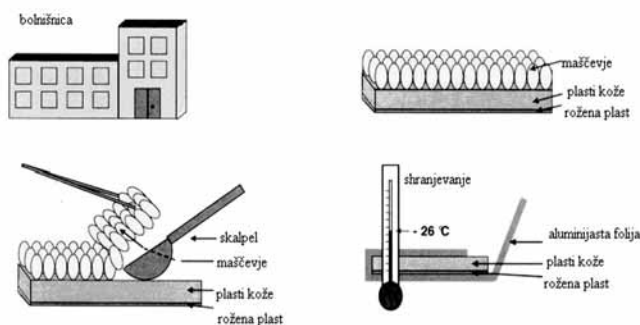
Za vrsto ZU je absorpcija skozi kačjo kožo primerljiva z človeško. Z DSC in IR meritvami so dokazali podobnosti v strukturi in sestavi rožene plasti pri kačah, prašičih in ljudeh. Pri testiranju uporabljamo ovojnico, ki jo kača odvrže pri levitvi. Le-te ni potrebno kemično ali toplotno obdelati, saj je ovojnica kot velik, nepoškodovan list, iz katerega dobimo več vzorcev hkrati. Ker se kača levi periodično, imamo več membran od iste živali in se tako izognemo interindividualni variabilnosti. Ovojnica tudi ni živo tkivo, zato jo lahko shranjujemo pri sobni temperaturi skozi daljše časovno obdobje. Glavna slabost je pomanjkanje foliklov, zato ne zaznamo transfolikularne poti prehoda (4).

Dermalno absorpcijo so testirali tudi na vrsti ostalih živalskih membran. Zajčja koža velja za najbolj propustno med običajno uporabljenimi laboratorijskimi živalmi, zaradi česar je dober model za testiranje iritacije. Za kožo opic je dokazana zelo dobra korelacija, vendar je uporaba primatov v eksperimentalne namene prepovedana. Kot model

za testiranje dermalne absorpcije se prav tako uporablja perfundirano vime krav, pogosto tudi za proučevanje metabolizma učinkovin v koži, seveda pod ustreznimi eksperimentalnimi pogoji (15).

### 3.3 Človeška koža

Za določitev dermalne absorpcije je najbolj primerna membrana človeška koža. Največkrat se uporablja koža, ki jo odstranijo pri plastičnih operacijah ali amputacijah. Rožena plast, ki predstavlja bariero za večino učinkovin, je sestavljena iz odmrlih celic, tako da lahko uporabimo tudi kožo trupel, namenjenih za medicinske raziskave ali po obdukcijah. Debelina rožene plasti in gostota kožnih izvodil se razlikujeta glede na anatomsko mesto, posledično tudi dermalna absorpcija (16). Razlike so prav tako posledica starosti, spola, rase in splošnega zdravja darovalca. Vsekakor moramo biti pozorni tudi na pogoje in čas shranjevanja (12). Največkrat se uporablja koža iz predela trebuha, hrbta ali dojke. Koži najprej odstranimo podkožno maščobo, nato jo zamrznemo v tesno zaprtih plastičnih vrečkah pri temperaturi -20 °C do -30 °C (slika 3). Tako shranjena koža obdrži prvotne barierne lastnosti nekaj mesecev, izogniti pa se moramo ponavljajočemu odtaljevanju in zmrzovanju. Posebno pozornost zahteva priprava vzorcev kože pred eksperimentom. Rezultati se namreč razlikujejo glede na to, katere plasti kože uporabimo pri testiranju ter kako izvedemo razslojevanje.



Slika 3: Postopek priprave in shranjevanja človeške kože.  
Figure 3: Preparation and storage of human skin.

#### 3.3.1 Celotna debelina kože

Celotna debelina kože pomeni epidermis in dermis. Postopek priprave ni zahteven, le spodaj ležeče maščobno tkivo odstranimo s skalpelom. Z dermatomom (kirurški instrument za odzemanje tankih rezin kože) nato odrežemo rezino zelene debeline, navadno 430 µm, in pri tem pazimo, da ne poškodujemo rožene plasti. Sicer režemo skozi lasne folikle, vendar se nastale luknjice zaprejo zaradi nabrekanja tkiva v vodni raztopini. V pogojih *in vivo* učinkovine ne prehajajo skozi dermis, temveč v njem vstopijo v krvožilni obtok, medtem ko pri *in vitro* pogojih hidrofilno področje dermisa brez krvnega pretoka predstavlja še dodatno, umetno nastalo bariero za difuzijo lipofilnih učinkovin. Zato je pri zmerno do zelo lipofilnih učinkovinah problem dolg čas zakasnitve zaznavanja učinkovine v receptorski tekočini, saj se zadržujejo v spodnjih plasteh kože, pa tudi možnost mikrobiološke kontaminacije je večja. Iz tega razloga pri *in vitro* študijah pogosto uporabljamo posamezne plasti kože. S tem ko uporabimo tanjše rezine kože, se zmanjša čas prehoda, s tem pa tudi možnost mikrobiološke kontaminacije (6).

#### 3.3.2 Epidermis

Zaradi omenjenih problemov pri porazdeljevanju lipofilnih učinkovin se lahko uporablja samo epidermis (16). Z dermatomom odrežemo rezine kože debeline 200 µm, kar je približna debelina epidermisa. Epidermis lahko ločimo od spodaj ležeče plasti tudi s segrevanjem pri 60 °C 30–120 sekund brez vpliva na barierno funkcijo kože. Prav tako je možna kemijska odstranitev s pomočjo baz ali kislin, ki pa lahko vplivajo na pufrsko kapaciteto ter integriteto kože, kar vpliva zlasti na prehod ioniziranih učinkovin.

#### 3.3.3 Rožena plast

Lahko uporabimo tudi roženo plast, saj *in vivo* predstavlja glavno bariero za prehod učinkovin. S proteolitičnimi encimi razgradimo živi del epidermisa, navadno uporabimo raztopino tripsina v pufru s pH 7,4. Vanjo lahko potopimo kožo z vsemi plastmi ali pa predhodno toplotno ločen epidermis za 24 ur pri 37 °C položimo na filter papir, prepojen z proteolitičnimi encimi. Vendar pri tem postopku lahko pride do razgradnje ogradnih proteinov ter sprememb biokemijske sestave rožene plasti.

#### 3.3.4 Dermis

Za poškodovano ali bolezensko spremenjeno kožo je značilna okrnjena barierna funkcija. Te pogoje posnemamo s testiranjem na dermisu. Slabšo barierno funkcijo potrdimo z meritvami, kjer zaznamo povečano transepidermalno izgubo vode in spremembo električne upornosti kože. Dermis odrežemo z dermatomom, uporabimo pa lahko tudi kožo, ki smo ji z adhezivnim filmom odstranili roženo plast. Toplotno razslojevanje epidermisa pri 60 °C ali odstranitev rožene plasti s tripsinom nista primerni tehniki, saj pride do precipitacije in razgradnje dermalnih proteinov.

### 3.4 Rekonstruirani celični kožni modeli

Rekonstruirani celični kožni modeli so sestavljeni iz epidermalnih celic na naravni ali umetni podlagi ter posnemajo fiziološke lastnosti epidermisa in/ali dermisa, dveh bistvenih plasti kože. V postopku priprave odzvememo vzorce kože, izoliramo keratinocite in jih nasadimo na površino kolagenske podlage, ki jo s spodnjim delom potopimo v medij za rast celic. Medij nato odstranimo s površine celic, tako da so le-te v stiku z zrakom, in na ta način omogočimo razvoj rožene plasti. Opisani modeli se uporabljajo za testiranje fototoksičnosti, korozije in iritacije kože, kakor tudi dermalne absorpcije. Dokazano je, da so podobni izvornemu človeškemu tkivu tako po zgradbi in sestavi lipidov kot tudi biokemijskih markerjih. Biokemijski markerji so proteini, ki so značilni za določeno stopnjo diferenciacije celic, mednje uvrščamo tako prekurzorje kot encime (proteaze), potrebne za njihov nastanek. V idealnem primeru naj bi bili v modelu prisotni v isti količini kot v sami koži.

Navadno ima vsak proizvajalec na trgu oba modela, tako za testiranje iritacije kot tudi dermalne absorpcije, v nadaljevanju so opisani slednji (17).

#### 3.4.1 SkinEthic®

SkinEthic® je model kože s keratinociti na inertnem polikarbonatnem filtru (18). Struktura modela je zelo podobna človeškemu epidermisu. Prisotne so vse glavne vrste ceramidov kakor njihovi prekurzorji,

glukozilceramidi, le da ima model nekoliko višjo vsebnost ceramidov. Človeški epidermis ima konstantno debelino, tako da je razmerje ceramidov, ki se nahajajo v roženi plasti, in fosfolipidov v epidermisu, konstantno. Pri SkinEthic® modelu ne pride do luščenja kože, zato postaja rožena plast s časom vedno debelejša, posledično je delež fosfolipidov nižji, delež ceramidov pa narašča. Celostno gledano je sestava lipidov primerljiva s človeško kožo. Prisotnih je tudi večina biokemijskih markerjev kot so keratin, lorcin, involukrin ter transglutaminaze (19).

### 3.4.2 EpiSkin®

Kožni nadomestek EpiSkin® je na razpolago v plošči z dvanajstimi vdolbinami. Keratinocite gojijo dvajset dni, tako da nastane plast diferenciranega epidermisa, ki ga nato prenesejo na kolagensko podlago. Model ima vse plasti, ki tudi sicer sestavljajo epidermis. V primerjavi s slednjim ima rožena plast bistveno večje število celičnih plasti in je debelejša. V živem delu epidermisa so prisotne vse celice, vendar so drugačnih oblik in nekoliko drugače organizirane. Tudi glavni razredi lipidov so prisotni, čeprav kvantitativna vsebnost ni vedno primerljiva s človeškim tkivom, opazne so tudi razlike med posameznimi serijami. Zlasti izstopa 20% višja vsebnost di-/trigliceridov. Povišana sinteza trigliceridov in njihovo zadrževanje med celicami rožene plasti je v živem tkivu sicer posledica hiperproliferacije (pri boleznih kot sta atopični dermatitis, psoriaza...) in zmanjšane barierne funkcije. Vendar pa so dokazali, da je transport učinkovin bolj odvisen od skupne količine lipidov kot od posamezne skupine lipidov, zato povišana vsebnost di-/trigliceridov ne vpliva bistveno na absorpcijo.

### 3.4.3 EpiDerm®

EpiDerm® model sestavljajo človeški keratinociti, ki jih gojijo toliko časa, da nastane večplasten in zelo diferenciran model človeškega epidermisa. Osnovna morfologija modela je primerljiva s človeškim epidermisom. Prisotni so vsi sloji, ima 6 do 8 plasti živih celic, kar znaša 28-43 µm epidermalne debeline. Sestava in količina lipidov sta primerljivi s človeškim tkivom.

Za naštete modele najdemo veliko podatkov v literaturi in so po določenih kriterijih zelo dobri nadomestki za človeško kožo. Pri testiranju dermalne absorpcije dobimo primerljive rezultate med temi modeli, medtem ko je za človeško kožo značilna velika variabilnost. Največja omejitev pri uporabi modelov je še vedno slaba barierna funkcija, ki je verjetno posledica motenj pri luščenju (deskvamaciji) ter mikroskopsko majhnih predelov, kjer se ne tvorijo keratinociti. Opisani modeli oponašajo le človeški epidermis, so pa na trgu tudi celični modeli kože z vsemi plastmi, npr. EpiDermFT® (20). Vendar raziskave, ki bi objektivno ocenile primernost slednjih za testiranje dermalne absorpcije, še niso bile narejene, problem je tudi visoka cena. Ne glede na določene omejitve pa našteti modeli predstavljajo velik napredek v zadnjih letih pri proučevanju dermalne absorpcije.

## 4 Zaključek

Kljub široki izbiri membran, ki se razlikujejo tako po izvoru kot lastnostih, ostaja dejstvo, da se nismo sposobni približati rezultatom, ki jih dobimo pri testiranju na človeški koži. Največji problem je slabša barierna funkcija le-teh v primerjavi s človeško kožo. Vendar pa se tehnologija

izdelave umetnih membran konstantno izpopolnjuje, prav tako se veliko dela na izboljšanju in razvoju novih rekonstruiranih celičnih kožnih modelov. Oboji so zanimivi tako za farmacevtsko kot kozmetično industrijo, razvoj pa torej tudi na področju *in vitro* testiranja dermalne absorpcije teži k temu, da se živalske modele v celoti nadomesti z alternativnimi *in vitro* metodami (4, 21).

## 5 Literatura

1. Jurkovič P, Gašperlin M. Mikroemulzije za dermalno dostavo učinkovin. Farm Vestn 2004; 55: 565-571.
2. Gašperlin M. Transdermalna dostava zdravilnih učinkovin. Farm Vestn 2006; 57: 100-105.
3. The SCCP's notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation, 6<sup>th</sup> Revision.
4. Haigh MJ, Smith WE. The selection and use of natural synthetic membranes for *in vitro* diffusion experiments. Eur. J. Pharm. Sci. 1994; 311-330.
5. European IP – Galenous Course 16/09/07-02/10/07 SKIN BARRIER FUNCTION "Cutaneous absorption and environmental factors" Claude Bernard University, Lyon France.
6. CellCourse 2008, Saarland University, Saarbruecken, Germany.
7. Jurkovič P. Proučevanje vpliva izbranih mikroemulzij na učinkovitost derivatov vitamina C v koži. Doktorska disertacija, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2003.
8. De Jager M, Groenink W, Van der Spek J, Janmaat C, Gooris G, Ponc M, Bouwstra J. Preparation and characterization of a stratum corneum substitute for *in vitro* percutaneous penetration studies. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes 2006; 1758(5): 636-644.
9. Kristl J, Gašperlin M, Jeras M. Izbrane vsebine iz kozmetologije. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2005; 3-16.
10. Bouwstra JA, Honeywell-Nguyen PL, Gooris GS, Ponc M. Structure of skin barrier and its modulation by vesicular formulations. Progress in Lipid Research 2003; 42(1): 1-36.
11. De Meere ALJ, Tomlinson E. Physicochemical description of the absorption rate of a solute between water and 2,2,4-trimethylpentane. Int J Pharm 1984; 22: 177-196.
12. Feldestein MM, Raigorodskii IM, Lordanski AL, Hadgraft J. Modeling of percutaneous drug transport *in vitro* using skin-imitating Carbosil membrane. J Control Rel 1998; 52(1-2): 25-40.
13. Poet TS, McDougal JN. Skin absorption and human skin assessment. Chemico-Biological Interactions 2002; 140(1): 19-34.
14. Godin B, Touitou E. Transdermal skin delivery. Predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. Advanced Drug Delivery Reviews 2007; 59(11): 1152-1161.
15. Kietzmann M, Loescher W, Arens D, Maass P, Lubach D. The isolated perfused bovine udder as an *in vitro* model of percutaneous drug absorption. Skin viability and percutaneous absorption of dexamethasone, benzoyl peroxide, and etofenamate. J Pharmacol Toxicol Methods 1993; 30(2): 75-84.
16. Sartorelli P, Andersen HR, Angerer J, Corish J, Drexler H, Göen T, Griffin P, Hotchkiss SAM, Laresse F, Montomoli L, Perkins M, van de Sandt J, Williams F. Percutaneous penetration studies for risk assessment. Environmental Toxicology and Pharmacology 2000; 8(2): 133-152.

17. Netzlaff F, Lehr CM, Wertz PW, Schaefer UF. The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, corrosivity, and substance transport. Eur J Pharm and Biopharm 2005; 60(2): 167-178.
18. <http://www.skinethic.com>
19. Schmook FP, Meingassner JG, Billich A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. Int J Pharm 2001; 215(1-2): 51-56.
20. <http://www.mattek.com>
21. Barbotteau Y, Gontier E, Barberet P, Cappadoro M, De Wever B, Habchi C, Incerti S, Mavon A, Moretto P, Pouthier T, Smith RW, Ynsa MD. Reconstructed human epidermis: A model to study the barrier function. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Sectin B: Beam Interactions with Materials and Atoms 2005; 231(1-4): 286-291.

## Klinična prehrana Parenteralna prehrana

**KABIVEN/ STRUCTOKABIVEN**  
-triprekatna vreča  
-popolna parenteralna prehrana

**SMOF LIPID**  
4 vrste maščob v eni vreči!

**OMEGAVEN**  
omega 3 maščobne kisline

**DIPEPTIVEN**  
glutamin v obliki dipeptida za  
intravensko infundiranje

## Fresenius Kabi Enteralna prehrana

**FRESUBIN ENERGY**  
1,5kcal/ml

**FRESUBIN PROTEIN ENERGY**  
1,5kcal/ml, 10g beljakovin na 100ml!

**SUPPORTAN**  
1,5kcal/ml, 0,5g EPA na 100m  
\*za ONKOLOŠKE bolnike\*

**GLUTAMIN PLUS**  
10g glutamina na vrečko!  
\*prašek za pripravo napitka\*