

IMUNOLOGIJA KOŽE Z IMUNOKEMIJO

NAVODILA IN DNEVNIKI ZA VAJE



Univerzitetni študijski program Kozmetologija

1. letnik

Martina Gobec, Tijana Markovič, Jasna Omersel

Ljubljana, 2025

Naslov: S1 KOZ Imunologija kože z imunokemijo: Navodila in dnevniki za vaje

Avtorji: izr. prof. dr. Martina Gobec, asist. dr. Tijana Markovič, asist.dr. Jasna Omersel

Uredile: izr. prof. dr. Martina Gobec, asist. dr. Tijana Markovič, asist.dr. Jasna Omersel

Recenzenta: prof. dr. Matjaž Jeras, izr. prof. dr. Nataša Karas Kuželički

Slika naslovnice: izr. prof. dr. Nataša Karas Kuželički. Slika je bila ustvarjena z orodjem Bing Image Creator.

Izdala: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo

Kraj in leto izida: Ljubljana, 2025

Katalogni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

COBISS.SI-ID 239075331

ISBN 978-961-7231-05-2 (PDF)

VSEBINA

UVOD V LABORATORIJSKE VAJE	1
VARNOST PRI DELU V BIOKEMIJSKEM LABORATORIJU	1
PIPETIRANJE	3
REGULATIVA IN TESTIRANJE KOZMETIČNIH IZDELKOV	11
1. vaja: IZOLACIJA ČLOVEŠKIH MONONUKLEARNIH CELIC IZ LEVKOCITNEGA KONCENTRATA.....	18
2. vaja: TEST DRAŽENJA KOŽE <i>IN VITRO</i>	25
3. vaja: CELJENJE RAN.....	37

UVOD V LABORATORIJSKE VAJE

asist. dr. Tijana Markovič, mag. farm.

VARNOST PRI DELU V BIOKEMIJSKEM LABORATORIJU

OSEBNA VAROVALNA OPREMA

Pri delu v laboratoriju je obvezna uporaba laboratorijske halje, ki naj bo zapeta. Prav tako pri delu z biološkimi vzorci vedno uporabljamo lateksne ali nitrilne zaščitne rokavice. Kadar delamo z nevarnimi snovmi, vedno uporabljamo zaščitna očala.

PRAVILA DELA V LABORATORIJU

- V laboratoriju je prepovedano uživanje pijače in hrane.
- Jakne in torbe pospravimo v za to namenjene omare/predale.
- Pri delu v laboratoriju je obvezna uporaba laboratorijske halje.
- Pri delu z biološkimi vzorci vedno uporabljamo lateksne ali nitrilne zaščitne rokavice.
- Pri delu z nevarnimi snovmi vedno uporabljamo digestorij.
- Po zaključenem laboratorijskem delu ustrezno pospravimo delovno površino (Slika 1).



Slika 1: Delovna površina v laboratoriju.

Pri delu v laboratoriju je potrebno upoštevati pravila, saj s tem poskrbimo za svojo varnost in za varnost vseh, ki delajo v laboratoriju. Pomembno je, da upoštevamo navodila asistenta, ki vodi laboratorijske vaje. Z namenom zagotavljanja varnosti vseh prisotnih v laboratoriju, lahko asistent študentu, ki pravil ne upošteva, prepreči nadaljnje opravljanje laboratorijskih vaj.

PIKTOGRAMI

Piktogram za nevarnost je slika na etiketi posameznih reagentov, ki vključuje opozorilno oznako in posebne barve, namenjene zagotavljanju informacij o škodi, ki jo lahko določena snov ali zmes pomeni za naše zdravje ali okolje (Slika 2, 3).



Slika 2: Reagenti, označeni s prikazanimi piktogrami, so lahko nevarni, če se z njimi ne ravna pravilno. Za zagotovitev varne uporabe si zapomnimo pomen oznak in preberemo navodila. Prirejeno po: (1)

Posamezni piktogrami in ravnanja s kemikalijami, ki so označena s piktogrami so pojasnjena v sliki 3.

Jedko	Razlaga piktograma: Lahko je jedko za kovine, povzroča hude opekline kože in poškodbe oči. Hranimo v originalni embalaži. Nosimo zaščitne rokavice, zaščitna oblačila, zaščito za oči in obraz	Vnetljivo	Razlaga piktograma: Lahko ali zelo vnetljivi plini, aerosoli, tekočine ali hlapi. Ne segrevamo ali pršimo proti odprtem ognju. Uporabimo orodje, ki ne povzroča isker, hranimo v tesno zaprti posodi.
Resne nevarnosti za zdravje	Razlaga piktograma: Lahko škoduje plodnosti ali nerojenemu otroku, povzroča raka, simptome alergije ali astme, škoduje organom. Pred uporabo se seznanimo z varnostnimi ukrepi. Ne vdihavamo prahu ali dimov. Hranimo zaklenjeno. Pri respiratornih simptomih pokličemo center za zastrupitve ali zdravnika.	Akutna strupenost	Razlaga piktograma: Pri zaužitju, vdihavanju ali v stiku s kožo je lahko zdravju škodljivo ali smrtno. Ravnamo previdno. Ne jemo, pijemo ali kadimo med uporabo. Uporabljamo zaščitno opremo. Preprečimo stik s kožo in z očmi. Hranimo zaklenjeno.

Slika 3. Prikaz izbranih piktogramov in razlaga. (Prirejeno po (2).)

PIPETIRANJE

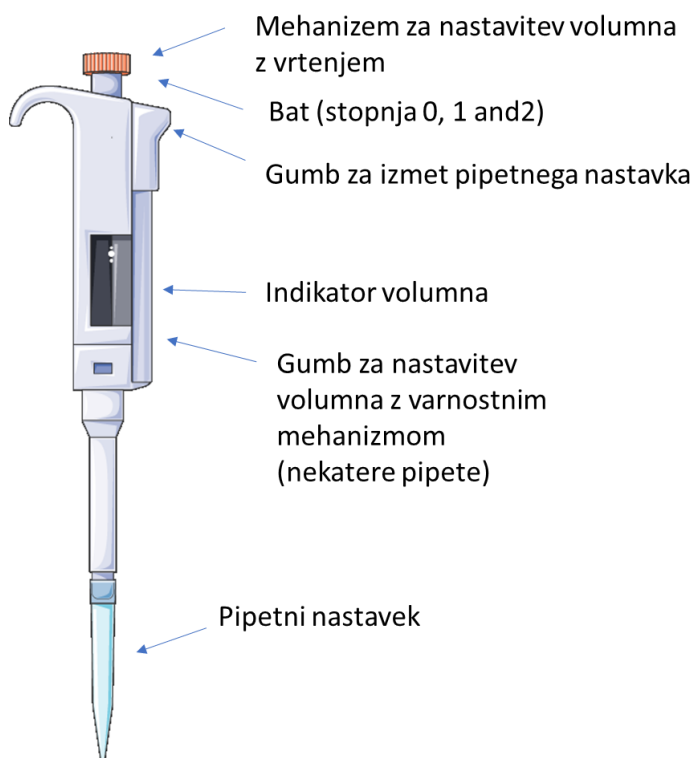
PIPETE

Pipete se uporabljajo za natančno odmerjanje volumnov raztopin. Poznamo polnilne, merilne pipete in birete. Najprej moramo izbrati ustrezno pipeto. Za pipetiranje uporabljamo pipete, ki se med seboj razlikujejo glede na volumen, ki ga želimo pipetirati. Najprej poiščemo pipeto, ki ustreza volumnu, ki ga želimo pipetirati. Vsaka pipeta ima predpisan ustrezen volumen, na katerega je kalibrirana in se lahko uporablja le za pipetiranje znotraj merilnega območja pipete.

Običajna merilna območja pipet so:

- 0,5 μL – 10 μL
- 0,5 μL – 20 μL
- 10 μL - 100 μL
- 20 μL – 200 μL
- 100 μL – 1000 μL
- 1 mL -5 mL

Na pipeti nastavimo ustrezen volumen, kar storimo s premikanjem gumba za nastavitev volumna (Slika 4). Gumb vrtimo dokler se v okencu ne pojavi želen volumen. Pri tem pazimo, da nikoli ne nastavimo volumna izven merilnega območja pipete, saj v tem primeru odmerjeni volumen ne bo pravilen, lahko pa tudi pokvarimo pipeto.



Slika 4: Pipeta. (Slika je bila ustvarjena s programom Servier Medical ART 3000.)

NASTAVKI ZA PIPETE

Nastavki za pipete se med seboj razlikujejo glede na volumen, ki ga lahko pipetiramo (Slika 3). Vedno poiščemo ustrezen nastavek glede na merilno območje pipete ter preverimo, da nastavek dobro tesni. Nastavek zamenjamo vedno, ko pipetiramo drugo tekočino, da preprečimo kontaminacijo reagentov, vzorcev. Po zaključenem pipetiranju nastavek zavržemo v koš za biološke odpadke s pritiskom na gumb za odstranitev nastavka.

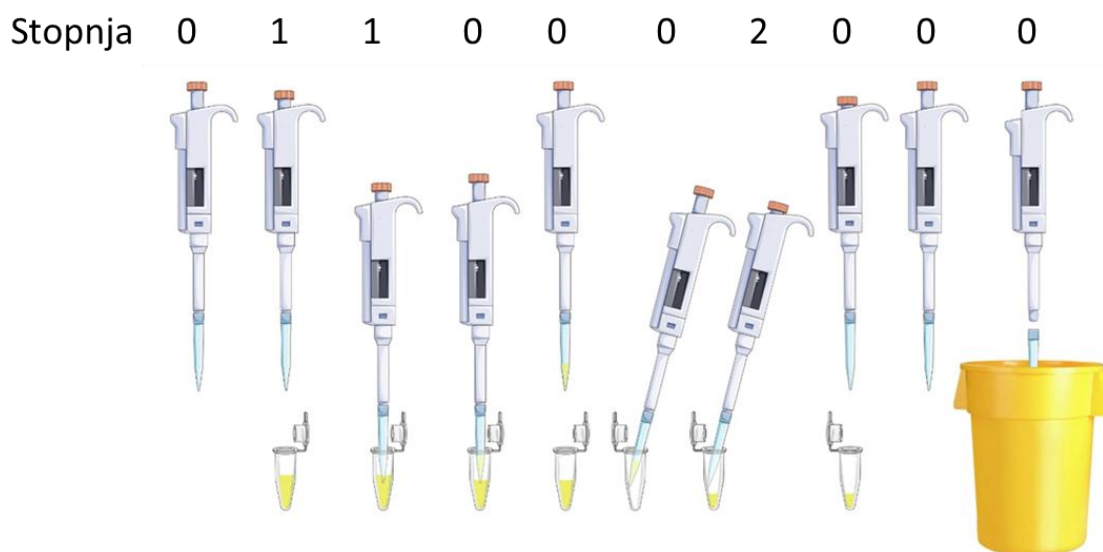


Slika 5. Stojalo za pipete z različnimi volumni in škatle v katerih hranimo nastavke za pipete.

POSTOPEK PIPETIRANJA

Pred začetkom pipetiranja izberemo ustrezno pipeto glede na volumen, ki ga želimo pipetirati ter nastavimo ustrezen volumen. Pipeta ima 3 stopnje (nevtralno 0, 1. in 2. stopnjo). Na pipeti preizkusimo gumb za vse 3 stopnje, da dobimo občutek za delo z izbrano pipeto. Nato izberemo ustrezen nastavek in ga namestimo na pipeto ter se prepričamo, da nastavek dobro tesni. Pipeto postavimo v vertikalni položaj nad tekočino in počasi pritisnemo gumb do stopnje 1. Nato pipeto potopimo v raztopino tako, da je konica nastavka nekaj mm pod gladino tekočine. Volumen tekočine zajamemo tako, da gumb počasi spustimo v nevtralen položaj (torej iz stopnje 1 v stopnjo 0) in počakamo vsaj 1 sekundo. Pred izpustom tekočine naslonimo nastavek na steno posode pod kotom 20°- 45°. Ko je nastavek pod kotom, počasi stisnemo

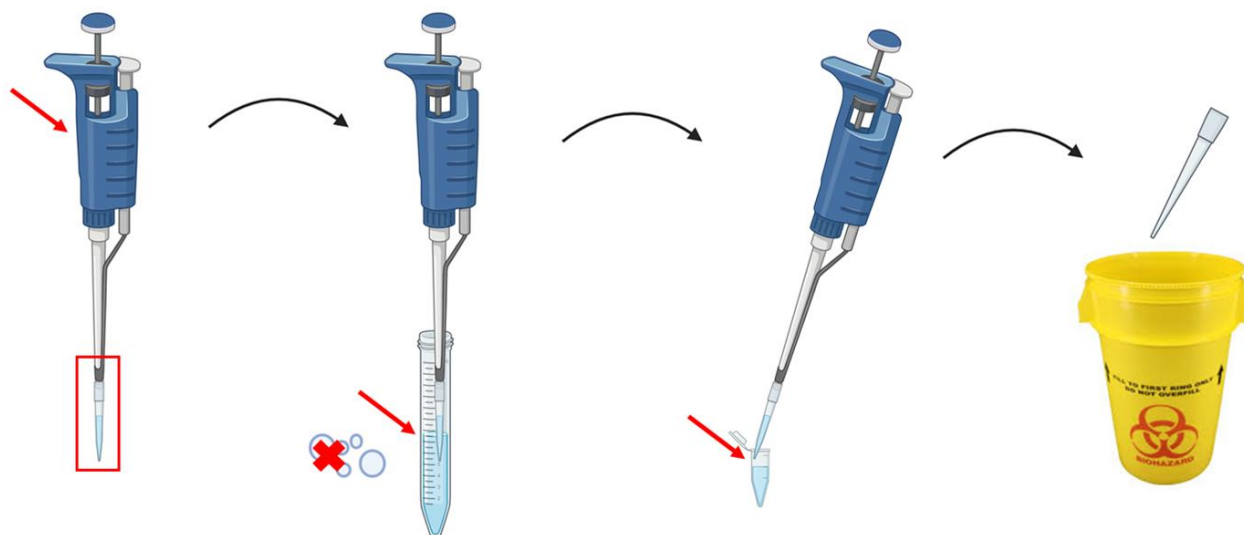
gumb do stopnje 2 in počakamo vsaj 1 sekundo, da prenesemo ves volumen tekočine. Po končanem pipetiranju zavržemo nastavek v koš za biološke odpadke s pritiskom na gumb za odstranitev nastavka.



Slika 6. Shematski prikaz pipetiranja. (Slika je bila ustvarjena s programom Servier Medical ART 3000.)

NA KAJ MORAMO BITI POZORNI PRI PIPETIRANJU?

Vedno preverimo merilno območje pipete in pazimo, da pipete nikoli ne nastavimo izven merilnega območja, saj je sicer potrebna ponovna kalibracija pipete. Pred pipetiranjem preizkusimo stopnje na pipeti (0, 1, 2) s pritiskom na gumb, da dobimo občutek za posamezno pipeto. Pred vsakim pipetiranjem moramo dati na pipeto nov nastavek, da ne pride do kontaminacije reagentov in vzorcev. Preden potopimo pipeto v raztopino, se vedno prepričajmo, da smo stisnili gumb na stopnjo 1. Pomembno je, da pipete pri zajemanju vzorca ne potopimo pregloboko, ker lahko zaradi kapilarnega efekta zajamemo večji volumen. Če pa nastavka ne potopimo dovolj globoko, lahko zajamemo zračne mehurčke (Slika 5). Pipeto torej potopimo do takšne globine, kot je nujno potrebno, da ob koncu pipetiranja zaradi znižanja gladine ne bi v pipeto namesto raztopine potegnili zraka. Pomembno je tudi, da je pipeta pri zajemanju tekočine v vertikalnem položaju, saj lahko v nasprotnem primeru zajamemo napačen volumen. Pri pipetiranju gumb stisnemo počasi in nato počakamo 1 sekundo, da ne pride do nastanka mehurčkov ali razlitja tekočine. Pri izpustu moramo upoštevati, da prislonimo pipeto na steno pod kotom 20° - 45°, da zagotovimo optimalen pretok tekočine.



Slika 7. Shematski prikaz posameznih korakov, na katere moramo biti pozorni pri pipetiranju. (Slika je bila ustvarjena s programom BioRender.com.)

POGOSTE NAPAKE PRI PIPETIRANJU

- Nepravilno nastavljen volumen – npr. želeli smo odpipetirati 100 μL raztopine, izbrali pa smo pipeto, ki ima merilno območje 2 μL - 20 μL . Volumen na pipeti smo nastavili na 10,0 (μL) - odpipetiran volumen bo tako 10x prenizek.
- Nepravilno nameščen nastavek na pipeto - če nastavka nismo čvrsto pritrdili, lahko pade s pipete ali odpipetiramo napačen volumen.
- Vdor tekočine v pipeto - če ne držimo pipete obrnjene navzdol.
- Zajetje mehurčkov - v primeru, da ob zajetju volumna spustimo gumb iz stopnje 1 do nevtralnega položaja prehitro. Odpipetiran volumen bo napačen.
- Odvzem prevelikega volumna - če nimamo občutka za stopnje na pipeti in stisnemo gumb na stopnjo 2 namesto na stopnjo 1. Odpipetiran volumen bo napačen.

REVERZNO PIPETIRANJE

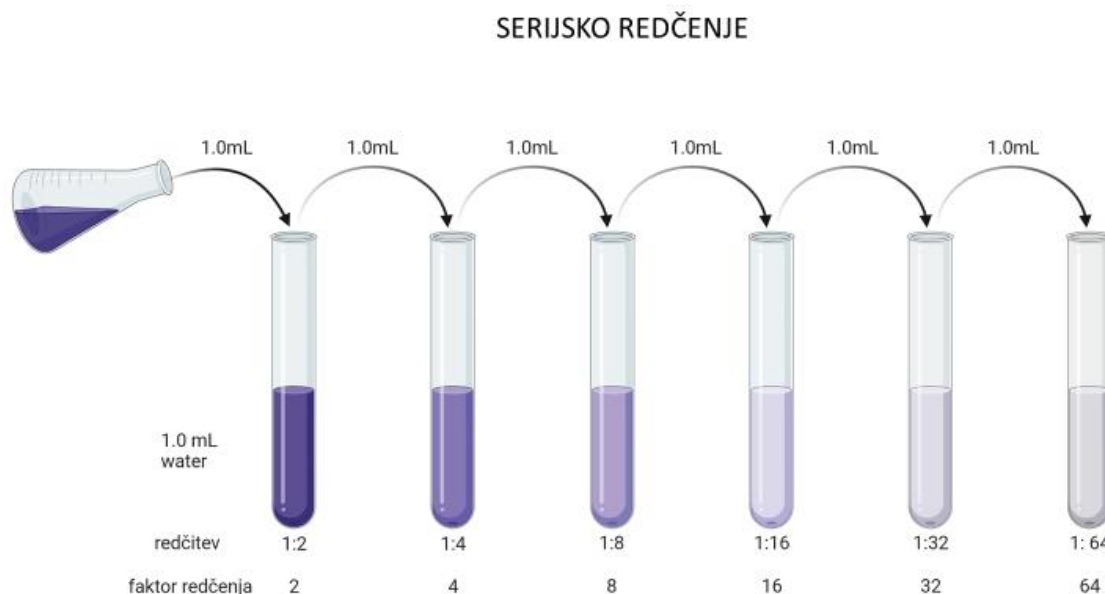
Reverzno pipetiranje uporabljamo za viskozne tekočine ter z namenom, da preprečimo nastanek mehurčkov.

Postopek reverznega pipetiranja:

1. Gumb na pipeti nastavimo na stopnjo 2, potopimo v raztopino in počasi spustimo do nevtralnega položaja 0, da zajamemo volumen tekočine.
2. Nastavek pipete naslonimo pod kotom 20°- 45° na steno vsebnika, v katerega bomo pipetirali.
3. Gumb spustimo do položaja 1 in s tem odmerimo volumen tekočine. Pomembno je, da se zavedamo, da pri reverznem načinu pipetiranja vedno ostane nekaj tekočine v nastavku.
4. Na koncu spustimo gumb do stopnje 2 in s tem preostanek tekočine v nastavku zavržemo v ustrezen vsebnik, ki ga po končanem delu zaprtega zavržemo v biološke odpadke.

SERIJSKO REDČENJE IN FAKTOR REDČENJA

Pri delu v laboratoriju moramo pogosto pripraviti redčitve osnovnih raztopin (Slika 6).



Slika 8. Shematski prikaz serijskega redčenja. (Slika je bila ustvarjena s programom BioRender.com.)

DODATNO GRADIVO

Oglejte si naslednje videoposnetke, ki nazorno prikažejo pravilno tehniko pipetiranja ter opozorijo na pogoste napake pri pipetiranju.

2. Pravilno pipetiranje: <https://www.youtube.com/watch?v=QGx490kuKjg>
3. <https://www.youtube.com/watch?v=OOQWsCMQuRw>
4. <https://www.youtube.com/watch?v=nPjt1ZUNkFQ>
5. Pipete: <https://www.youtube.com/watch?v=wIO4zJLR8R8>
6. Pogoste napake pri pipetiranju: https://www.youtube.com/watch?v=05oolv_y4Pk
7. Reverzno pipetiranje: <https://www.youtube.com/watch?v=1Y0U9jf5ZbI>

VPRAŠANJA IN NALOGE

- Naštejte osebno varovalno opremo v laboratoriju.
- Preverite znanje o piktogramih v naslednjem kvizu: [Kviz o CLP - ECHA \(europa.eu\)](https://europa.eu/kviz-o-clp)
- Opišite postopek pipetiranja.
- Izberite s katero pipeto bi najbolj natančno odpipetirali želene volumne. To naredite tako, da k zapisanemu volumnu pripišete številko pred ustrezno pipeto.

Izbor pipet			
		_____	9,4 μL
1	0,1 μL – 3 μL	_____	21,4 μL
2	0,5 μL – 10 μL	_____	1,856 μL
3	2 μL – 20 μL	_____	62 μL
4	10 μL – 100 μL	_____	155 μL
5	20 μL – 200 μL	_____	14 μL
6	100 μL – 1000 μL	_____	1600 μL
7	1 mL – 5 mL	_____	0,3 mL

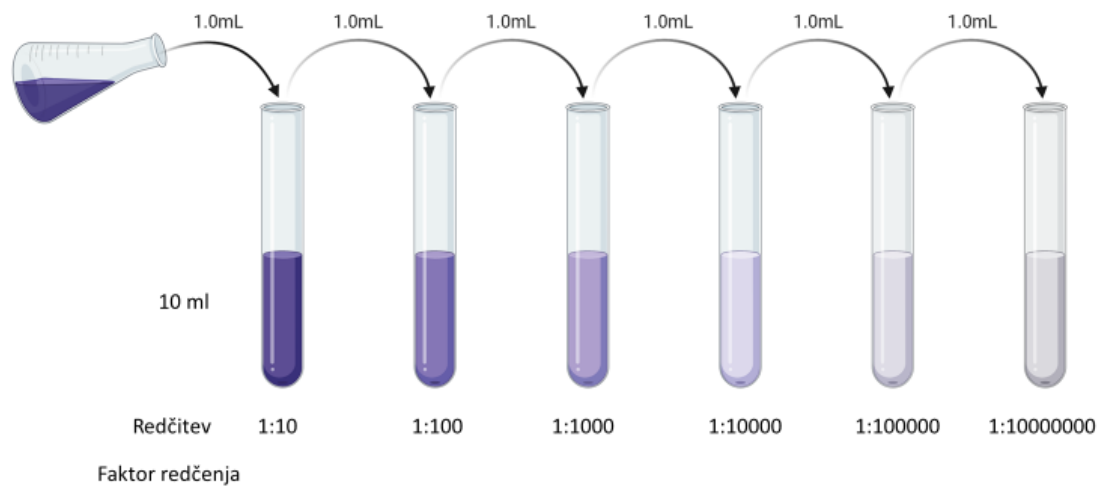
- Odpipetirali smo vzorec, nato bomo pipetirali reagent. Katera trditev je PRAVILNA?

A) Nastavek po pipetiranju vzorca zavržemo in za pipetiranje reagenta uporabimo nov nastavek.

B) Za pipetiranje vzorca in reagenta lahko uporabimo enak pipetni nastavek.

- Shematsko prikažite postopek pipetiranja. Označite, na kaj moramo biti pri pipetiranju pozorni.
- Naštejte 5 pogostih napak pri pipetiranju.
- Opišite postopek reverznega pipetiranja.
- Ob ogledu video vsebin izpišite 5 pomembnih ugotovitev za vsak posnetek.

- Navedite faktor redčenja za raztopine pripravljene s serijskim redčenjem.



Viri

1. Pictograms, <https://echa.europa.eu/sl/pictograms-infographic>, dostopano: 21.2.2024
2. ECHA Regulations CLP Quiz, <https://echa.europa.eu/sl/regulations/clp/clp-quiz>; dostopano: 6.7.2022
3. Pubmed, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>; dostopano: 21.2.2024
4. Rahul M, Tewari N, Mathur V, Goel S, Jain G. Evidence mapping and quality analysis of published dental literature on COVID-19 – A systematic review. Natl J Maxillofac Surg 2021; 12 (2): 139-161.
5. Gobec M, Omersel J, Bratkovič T, Cedilnik-Gorup E, Učakar V, Fafangel M, Kos M, Paulino E, Messerli M, Čebren Lipovec N, Markovič T, Vrščaj L A, Jurković Mlakar, S, Karas Kuželički N, Kerec Kos M, Nabergoj Makovec Urška. Izzivi, priložnosti in izkušnje cepljenja v lekarniški dejavnosti : strokovno izpopolnjevanje s področja farmacije. 2022; 107.
6. https://www.ffa.uni-lj.si/docs/default-source/referat/navodila/navodila_za_izdelavo_in_pisanje_diplomske_magistrske_naloge.pdf?sfvrsn=2; dostopano: 21.2.2024
7. https://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Dekanat/Studij/2016_Smernice_za_seminar.pdf; dostopano: 21.2.2024
8. https://www.uni-lj.si/o_univerzi_v_ljubljani/organizacija__pravilniki_in_porocila/predpisi_statut_ul_in_pravilniki/2023092013503987/ ; dostopano: 20.2.2024.
9. <https://www.euronews.com/next/2024/01/20/best-ai-tools-academic-research-chatgpt-consensus-chatpdf-elicite-research-rabbit-scite>; dostopano: 20.2.2024
10. http://www.sbd.si/datoteke/dokumenti/SBD_BiokemijskiSlovar2012a.pdf; dostopano: 20.2.2024

REGULATIVA IN TESTIRANJE KOZMETIČNIH IZDELKOV

asist.dr. Jasna Omersel, mag. farm., spec.med.biokem.

1. Regulativa in testiranje snovi na kožnih modelih

V družbi, trgovini in v pogovorih med ljudmi lahko večkrat slišimo, da samo področje in trg kozmetičnih izdelkov "nista regulirana" oz. "sta slabo regulirana". Pa je temu res tako?

Razvoj regulative na področju kozmetičnih izdelkov sega več kot 40 let nazaj, ko je bila leta 1976 podpisana Direktiva Sveta 76/768/EEC, ki so jo sprejele države takratne Evropske gospodarske skupnosti (Belgija, Francija, Italija, Luksemburg, Nizozemska in Zahodna Nemčija).

V tej Direktivi je kozmetični izdelek (KI) definiran kot "katerakoli snov ali zmes, namenjena stiku z zunanjimi deli človeškega telesa (povrhnjico, lasiščem, nohti, ustnicami ali zunanjimi spolnimi organi) ali z zobmi in sluznico ustne votline, zaradi izključno ali predvsem njihovega čiščenja, odišavljenja, spreminjanja njihovega videza, njihovega varovanja, ohranjanja v dobrem stanju ali korekcije telesnega vonja". Glavni sestavni deli Direktive so bili aneksi, ki so jih večkrat dopolnjevali, in v katerih so bili navedeni sezname snovi, ki v kozmetiki niso dovoljene, ki se lahko uporabljajo pod omejenimi pogoji, dovoljena barvila ter dovoljeni konzervansi in UV filtri.

Direktivo Sveta 76/768/EEC je leta 2009 nadomestila Uredba (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in sveta, ki je danes veljavni pravni instrument držav članic Evropske unije (EU) za določanje jasnih in natančnih pravil in zagotavljanje izvajanja pravnih obveznosti na področju KI znotraj EU. Uredba "uvaja pravila, s katerimi morajo biti skladni vsi kozmetični izdelki, dostopni na trgu, da se zagotovi delovanje notranjega trga in visoka raven varovanja zdravja ljudi". Namen Uredbe je torej predvsem racionalizacija in poenotenje terminologije, okvirna vzpostavitev nadzora trga KI in zagotavljanje varnosti na trgu dostopnih KI. Jasno opredeljuje tudi, da mora biti proizvodnja KI skladna z dobro proizvodno prakso, GMP (*angl. Good manufacturing practice*). Uredba zahteva tudi t.i. odgovorno osebo. Največkrat je to proizvajalec, v primeru uvoženih izdelkov pa tudi uvoznik ali pooblaščen tretja oseba, ki zbere in shrani dokumentacijo z informacijami o izdelku, PIF (*angl. product information file*). Pomemben del Uredbe je tudi Poročilo o varnosti kozmetičnega izdelka, CPSR (*angl. Cosmetic Product Safety Report*). Kot del Poročila o varnosti morajo biti pred izdajo na trg zbrane informacije o varnosti kozmetičnega izdelka (Del A) in opravljena ocena o njegovi varnosti (Del B).

Za oceno varnosti KI so predvidene ocene različnih vidikov toksičnosti in možnih neželenih reakcij na koži, ki jih lahko povzročajo izdelek oz. njegove sestavine. Za to so na voljo različna toksikološka orodja in testiranja *in silico* ter *in vitro*. Predvsem slednja so doživela velik razvoj po sprejemu 7. amandmaja (2003) in Uredbe št. 1223/2009, ki od leta 2003 delno, v celoti pa od leta 2013, prepovedujeta testiranje in prodajo KI, katerih sestavine so bile preskušane na živalih. Tako KI, ki so dostopni na evropskem trgu, zagotovo niso testirani na živalih. To velja, ne glede na to ali ima KI to navedeno na ovojnin, ali ne. Zakonodaja sedaj zapoveduje zamenjavo poskusov na živalih ob doslednem upoštevanju načela 3R (*angl. replace-reduce-*

refine), kar v splošnem pomeni zamenjavo poskusov na živalih kjer je to mogoče, znižanje njihovega števila in zmanjšanje trpljenja uporabljenih poskusnih živali. Za področje kozmetologije pa velja popolna opustitev testiranja na živalih in njihova nadomestitev z alternativnimi testnimi metodami (ATM; *angl. alternative test methods*), oz. z metodologijami novih pristopov (NAM; *angl. new alternative methodology*), med katere sodijo toksikološka testiranja *in vitro* ter *in silico*. Toksikološki podatki posameznih snovi, ki so jih pridobili s predhodnimi testiranjmi na živalih, pa so sicer še vedno uporabni za zbiranje in vključitev v Poročilo o varnosti KI, vendar le, če so bila ta preskušanja opravljena preden je stopila v veljavo Uredba, ki tovrstna testiranja prepoveduje.

Glede vrste in uporabe NAM so zelo priročne smernice odbora SCCS (*angl. Scientific Committee on Consumer Safety*), kjer se nahajajo tudi sprotno posodobljena priporočila in usmeritve glede uporabe testov *in vitro* za preskušanje varnosti KI in njihovih sestavin.

V sklopu predmeta Imunologija kože z imunokemijo bomo obravnavali testiranja za določanje dermalne toksičnosti *in vitro*, med katera uvrščamo: testiranje draženja kože (*angl. skin irritation*), korozivnosti (*angl. skin corrosion*) in senzitivizacije (*angl. skin sensitisation*). Kot ustrezne zamenjave preskušanja na živalih so se v ta namen izkazale laboratorijske metode z enoslojnimi celičnimi kulturami keratinocitov in fibroblastov ter tridimenzionalni rekonstituirani epidermalni kožni modeli, na katere nanašamo preiskovane snovi. Celični odzivi v teh modelih približno odsevajo pričakovane odzive, ki bi se pojavili po nanosu snovi na človeško kožo. Tkivno inženirska izdelava kompleksne celične in anatomske zgradbe kože, povezane z žiljem in živčevjem ter z ustreznimi mehanskimi lastnostmi pa še vedno predstavlja izjemen izziv tako v raziskovanju, kot v medicini.

Testiranje korozivnosti na koži

Dermalna korozija pomeni ireverzibilno poškodbo kože v obliki nekroze tkiva, ki se širi iz epidermisa v dermis in nastane v času od 0 (nemudoma) do 4h po nanosu testne snovi na površino kože. Poškodbe so vidne kot razjede na koži, krvavitve, krvave kraste, po 14 dneh pa tudi kot spremembe barve kože, področja alopecije (izgube las ali dlak) in brazgotinjenja. Korozija je potencialno lahko posledica napak v proizvodnji ali pa nepravilne uporabe KI. Kozmetična snov, ki je sicer dokazano korozivna, pa je še vedno lahko v uporabi v kozmetični proizvodnji, saj je ta njena lastnost pogosto odvisna od končne koncentracije v KI, vrednosti pH, uporabljene podlage, načina izpostavitve, ipd.

Trenutno se za testiranje korozivnosti *in vitro* uporabljajo tri alternativne metode:

- 1) testiranje transkutane električne upornosti na izrezani podganji koži (TER);
- 2) uporaba rekonstruiranega človeškega kožnega modela epidermisa (RhE); komercialno dostopni testi, na katerih testirajo snovi ali izdelke in nato preverjajo njihove vplive na celično živost, npr. modela EpiSkin™ in EpiDerm™;
- 3) membranski barierni test Corrositex®.

Rezultati omenjenih testiranja testno snov opredelijo kot korozivno ali nekorozivno.

Testiranje draženja kože

Draženje kože pomeni nastanek reverzibilne poškodbe po nanosu testne snovi na kožo, v časovnem obdobju do 4h. Draženje kože definiramo kot lokalni vnetni proces v koži oz. dermisu, ki je posledica lokalne aktivacije prirojenega imunskega odziva. Simptomi takega vnetja so rdeča, topla in zatečena koža na mestu nanosa dražilne snovi, bolečina in srbečica.

Dražilni potencial snovi na koži lahko sicer testiramo na ljudeh *in vivo*, in sicer s krpičnim alergijskim testom (*angl. patch test*), ki pa je organizacijsko zahteven, časovno zamuden in etično vprašljiv, saj v določenih primerih lahko povzroči dolgotrajno ali celo trajno senzibilizacijo posameznika na preiskovano snov, zaradi česar ga smernice SCCS ne priporočajo. Evropski center za validacijo alternativnih metod (ECVAM; *European Centre for Validation of Alternative Methods*) je kot ustrezno oz. primerno alternativno metodo sprejel le eno, in sicer testiranje snovi ali izdelkov na rekonstruiranem kožnem modelu (RhE) *in vitro*. Komercialno so dostopni modeli RhE več proizvajalcev: EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200), SkinEthic™ RHE in LabCyte EPI-MODEL24SIT. Validirani so bodisi kot samostojni nadomestni testi ali delni nadomestni testi, ki so nato vključeni v model večstopenjskega testiranja. Ti testi temeljijo na spremljanju celične živosti po nanosu preskušane snovi ter določanju proizvodnje interleukina 1a (IL-1a), kar poveča njihovo analitsko občutljivost. Pri njihovi uporabi pa moramo paziti, saj morebitna prisotnost reducirajočih snovi in barvil za lase v testiranih snoveh ali njihovih zmesih povzroča spektralne interference pri končnem merjenju absorbance, zato je smiselno, da jih že na začetku ločimo od analiziranih snovi.

Metoda testiranja snovi ali izdelkov na rekonstruiranem kožnem modelu (RhE) je bila sprejeta kot ustrezna alternativa za prvotno preskušanje njihovega dražilnega potenciala na živalih (Draizev test na kuncih).

Testiranje alergogenega potenciala snovi (senzitivizacija)

Potencialni alergeni (*angl. sensitizers*) so snovi, ki po vstopu v kožo (dermis) sprožijo imunsko reakcijo, kar, ob ponovnem stiku s temi snovmi, pri predhodno senzibiliziranih posameznikih povzroči alergijski odziv. Številne naravne in sintezne spojine so alergogene, a pogosto šele le v primeru, ko so vezane na proteine (hapteni). To se lahko zgodi tudi potem, ko se ob vstopu v kožo vežejo nanje. V koži nato pride do aktivacije rezidenčnih imunskih celic, oksidativnega stresa in hitre infiltracije tkiva z vnetnimi celicami iz žilja. Posledično se aktivirajo tudi antigene predstavitvene celice (APC), ki potem migrirajo v bezgavke, kjer sprožijo T-celične imunske odzive. Ločimo dve vrsti alergogenih snovi, in sicer take, ki vplivajo na respiratorni sistem, z možnim razvojem astme in tiste, ki povzročajo alergijske reakcije na koži ter vodijo do kontaktnih dermatitisov. Le redke pa povzročajo težave v obeh organskih sistemih ali celo izzovejo anafilaktično reakcijo.

Snovi z alergeni potencialom so običajno male molekule ($M < 500$ Da) z izrazito elektrofilnim značajem, kar jim omogoča neposredno vezavo na nukleofilne verige telesu lastnih proteinov, lahko pa najprej pride do encimske cepitve haptena, ki ga preobrazijo v reaktivno molekulo. Njihovo vezavo na protein oz. posledično spremembo strukture proteina lahko imunski sistem prepozna kot tuj antigen in se nanjo odzove. Tovrstne snovi pogosto najdemo med sintetičnimi dišavami, adhezivi, konzervansi in kovinskimi ioni (nikelj, kobalt, krom).

Testiranje alergogenega potenciala snovi je nekoč potekalo na živalih, zlasti morskih prašičkih (Buehlerjev test) in miših (test na limfnih vozlih - LLNA). Ker lahko s številnimi celičnimi in tkivnimi kožnimi modeli ter ostalimi testi opredelimo le posamezno mehanistično fazo imunskega odziva na preskušane snovi, smernice SCCS priporočajo kombinacijo več različnih metod *in vitro*. Njihovi rezultati morajo tako zajeti: a) molekularne interakcije preskušane snovi s proteini kože; b) vnetni imunski odziv keratinocitov nanjo in c) aktivacijo dendritičnih celic (DC) kot profesionalnih APC. Na trgu so v ta namen dostopni naslednji testi:

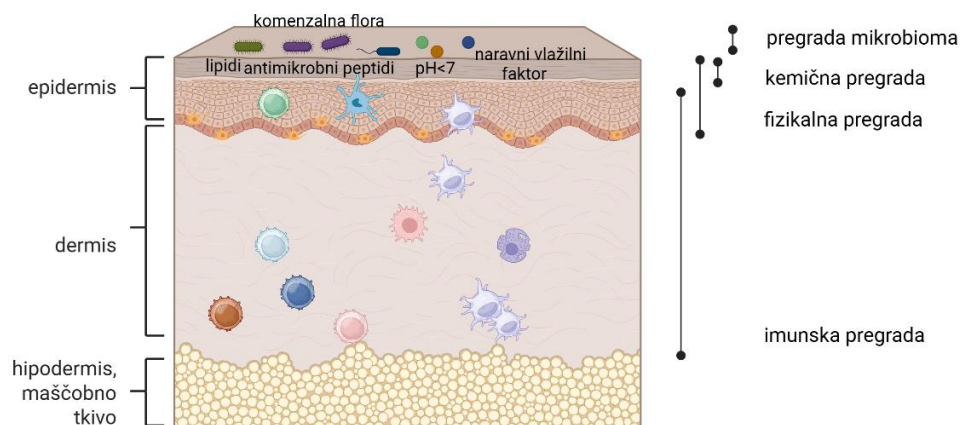
- a) DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay), ADRA (Amino Acid Derivative Reactivity Assay) in kDPRA (kinetic Direct Peptide Reactivity Assay), s katerimi opredeljujemo molekularne interakcije snovi s proteini kože;
- b) ARE-Nrf2 luciferase KeratinoSens™ in ARE-Nrf2 luciferase LuSens test method, s katerima spremljamo vnetni odziv keratinocitov;
- c) h-CLAT (Human Cell Line Activation Test), s katerim ugotavljamo obseg izražanja površinskih celičnih označevalcev: npr. CD86 in CD54 na aktiviranih DC kot najpomembnejših APC; U-SENSTM (U937 cell line activation test), ki meri izražanje CD86 na aktiviranih DC ter IL-8 Luc Assay (Interleukin-8 Reporter Gene Assay), s katerim določamo spremembe v izražanju nivoja mRNA za citokin IL-8, ki je povezan z aktivacijo DC.

2. Imunski sistem v koži

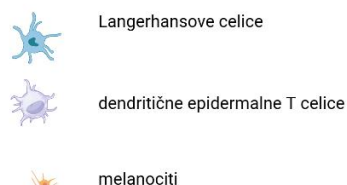
Človeška koža, s površino približno 2m², je največji telesni organ, ki organizmu zagotavlja nujno potrebno zaščitno pregrado med notranjostjo telesa in zunanjim okoljem, a hkrati dopušča tudi pomembne molekularne izmenjave. Koža uravnava telesno temperaturo in vlažnost, nas ščiti pred UV žarki, je senzorični organ in zaščitna pregrada pred vstopom številnih virusov, bakterij in toksinov iz okolja.

To zaščitno vlogo kože omogočajo (Slika 1):

- a) **Mikrobiom** - sestavlja ga komenzalna flora, ki patogenim bakterijam preprečuje razrast ter daje nadaljnje signale za uravnavanje delovanja imunskega sistema.
- b) **Kemična pregrada** - uravnava vlažnost kože in vzdržuje kisel pH njene površine, kar zavira rast patogenih bakterij. Keratinociti v roženi plasti (stratum corneum) proizvajajo holesterol in trigliceride, ki jih izločajo tudi žleze lojnice. Na površini rožene plasti nato mikrobiomske bakterije in kvasovke hidrolizirajo trigliceride v proste maščobne kisline, kar daje koži kisel pH. Kemično pregrado predstavljajo tudi laktat, urea, elektroliti in aminokisline, ki jih s skupnim imenom označujemo kot naravni vlažilni faktor.
- c) **Fizikalna pregrada** - oblikujejo jo dokončno diferencirani keratinociti v roženi plasti, pod njo, v zrnati plasti (stratum granulosum) pa tudi tesni stiki oz. proteini, npr. okludini in kladini, ki jih omogočajo. Tesni stiki preprečujejo predvsem izgubo vode iz notranjosti navzven, torej dehidracijo.
- d) **Imunska pregrada** – zagotavljajo jo celice prirojenega in pridobljenega imunskega odziva, ki se nahajajo v vrhnjici (epidermisu) in dermisu. Prisotne so tako tkivno rezidenčne imunske celice kot tiste, ki v kožo migrirajo iz žilja zaradi določenih signalov.



Rezidenčne imunske celice kože:



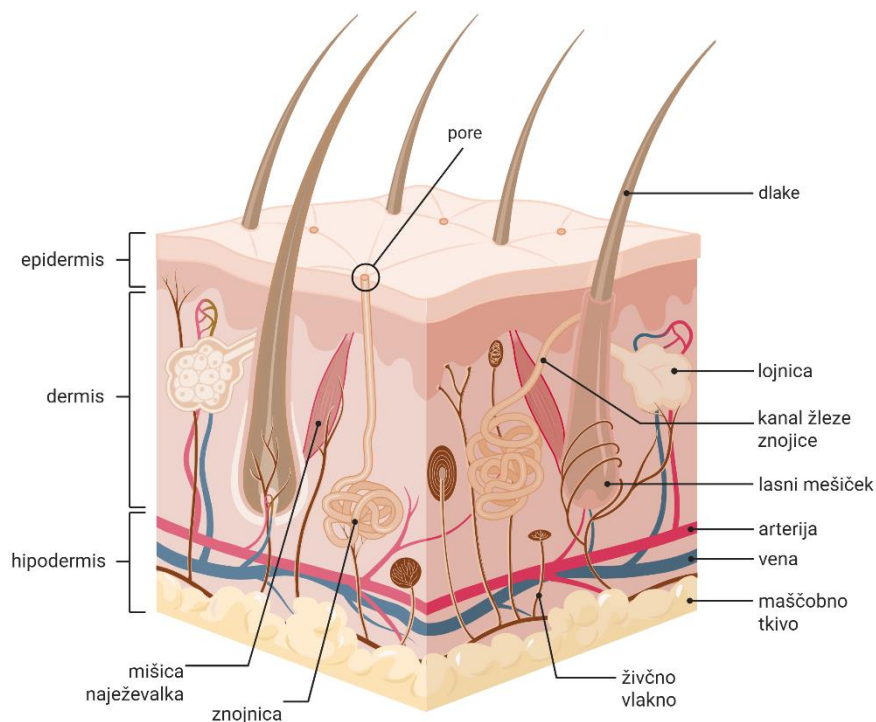
Nerezidenčne imunske celice kože:



Slika 1: Pregradna vloga kože in zastopanost imunskih celic v njej. (Slika ustvarjena s programom Biorender.com.)

Imunski sistem kože in naselitev imunskih celic v različne plasti kože se zaključijo v poznem obdobju nosečnosti (34. teden) oz. takoj po rojstvu, funkcijsko zorenje kože (hidracija, pH in transepidermalna izguba vode – TEWL; *angl. transepidermal water loss*) pa se nadaljuje vse do odrasle dobe. Rezultati raziskav so pokazali razlike v izražanju genov povezanih z razvojem epidermisa, diferenciacije keratinocitov in tistih, povezanih s predstavljanjem antigenov eksogenega izvora, v primerjavi z njihovimi zvišanimi nivoji v odrasli dobi.

Imunske celice se nahajajo tako v epidermisu kot v dermisu kože (Slika 2). Epidermis v 90-95% sestavljajo keratinociti. Njegovo skrajno zgornjo roženo plast, stratum corneum, oblikuje skvamozni epitelij dokončno diferenciranih keratinocitov, korneocitov. Keratinociti v svojem ciklu zorenja proizvajajo in izločajo lipid ceramid in protein filagrin, ki zapolnita medcelične prostore. Tako se ustvari učinkovita pregrada, ki telo ščiti pred vdorom eksogenih snovi in izgubo vode iz notranjosti. Zmotno je prepričanje, da so keratinociti imunsko neaktivne celice, prav nasprotno, so zelo pomemben del prirojenega imunskega odziva kože. Keratinociti so senzorji antigenov oz. nevarnosti, saj na svojih površinah izražajo številne receptorje za prepoznavo molekulskih vzorcev PRR (*angl. pattern recognition receptors*), npr. Tollu podobne receptorje TLR (*angl. Toll-like receptors*), v okolico izločajo številne signalne molekule, citokine in kemokine ter protimikrobne peptide, ki lahko neposredno zavirajo razmnoževanje bakterij in virusov in usmerjajo lokalni prirojeni imunski odziv.



Slika 2: Zgradba in anatomske strukture kože (slika ustvarjena s programom BioRender.com).

Preostanek celic epidermisa, 2-3%, predstavljajo Langerhansove celice, ki so učinkovite APC. Imajo pomembno vlogo neposredno na mestu nahajanja, kjer omogočajo specifične imunske odzive in vstopajo v interakcijo z limfociti T, po aktivaciji pa so sposobne tudi migracije v lokalne bezgavke. Kot APC na površinsko izraženih molekulah poglobitnega kompleksa tkivne skladnosti razreda II (MHC; *angl. major histocompatibility complex*) molekul predstavijo antigene v obliki peptidov, kar lahko vodi bodisi v aktivacije imunskega odziva ali pa tolerance na antigen.

V koži se nahajajo številni limfociti T, ki se nahajajo na stiku med epidermisom in dermisom. Gre tako za celice T $CD4^+$ (celice T pomagalk) kot $CD8^+$ (citotoksični limfociti T) v bližini mešičkov las in dlak, v dermisu pa se nahajajo tudi regulatorni limfociti Treg (približno 10% vseh limfocitov T v koži), ki delujejo lokalno protivnetno. V dermisu najdemo še dve vrsti APC, in sicer rezidenčne makrofage in dermalne dendritične celice (dDC), ki s proizvodnjo in sproščanjem različnih topnih molekul modulirajo lokalne imunske odzive.

Ob zaznavanju poškodbe kože in vnetnih signalih, se tolerogeno stanje kože (toleranca na lastne sestavine) prevesi v imunogeno, saj pride do aktivacije imunskega sistema. Ob stiku z antigenom se Langerhansove celice aktivirajo, migrirajo v dermis ali v bezgavke, kjer sprožijo specifični pridobljeni T-celični imunski odziv. Sočasno se z antigeni aktivirajo tudi dDC v dermisu, v katerega nato sproščajo citokine, ki vplivajo na različne podskupine limfocitov T, poleg tega pa potujejo v bezgavke in tam aktivirajo specifične T-celične odzive. Vseskozi poteka tudi proliferacija keratinocitov, ob stiku s signali nevarnosti (poškodba kože, vdor tujka, stik z alergenom) pa tudi njihova aktivacija in posledično sproščanje protimikrobnih aktivnih peptidov, citokinov in kemokinov v neposredno okolico. Vse to pa nato povzroči migracijo in infiltracijo eozinofilcev, nevtrofilcev, in limfocitov T iz žilja, v mesto vnetja.

Viri

1. Direktiva Sveta (76/768/EGS), 1976. Dostopno na: [Directive - 76/768 - EN - EUR-Lex](#)
2. Uredba (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta o kozmetičnih izdelkih. Dostopno na: [Uredba - 1223/2009 - EN - EUR-Lex](#)
3. Znanstveni komite za varstvo potrošnikov. Dostopno na: [Scientific Committee on Consumer Safety \(SCCS\) - European Commission](#)
4. Evropski center za validacijo alternativnih metod . Dostopno na: [EU Reference Laboratory for alternatives to animal testing \(EURL ECVAM\) - European Commission](#)
5. Trompette A, Ubags ND. Skin barrier immunology from early life to adulthood. In: Mucosal Immunology. 2023; 16:22, 194-207

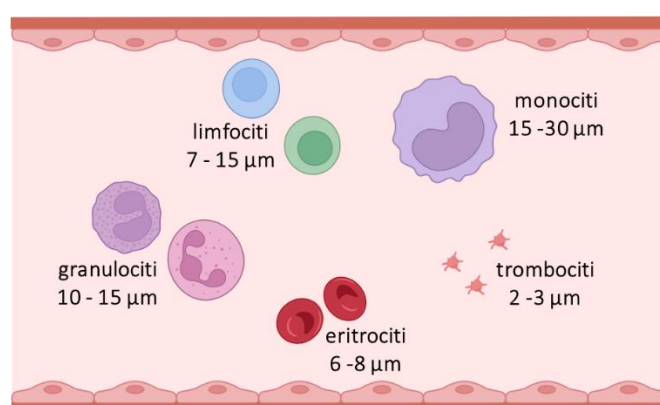
1. vaja: IZOLACIJA ČLOVEŠKIH MONONUKLEARNIH CELIC IZ LEVKOCITNEGA KONCENTRATA

izr. prof. dr. Martina Gobec, mag. farm.

UVOD

Mononuklearne celice periferne krvi (PBMC; *angl. peripheral blood mononuclear cells*) so heterogena populacija enojedrnih celic z nezažetim jedrom in citoplazmo, ki ne vsebujejo granul (Slika 1). Mednje sodijo limfociti in monociti. Od ostalih krvnih celic (eritrociti, granulociti, trombociti) jih lahko razmeroma preprosto in učinkovito ločimo s postopkom flotacije, ki ga izvedemo z uporabo gradientnega medija in centrifugiranja. Gradientni mediji imajo različne kemijske sestave. Na vaji bomo uporabili raztopino, ki vsebuje hidrofilni polisaharid in natrijev diatrizoat, ki zagotavljata ustrezno gostoto in osmolarnost za optimalno ločevanje celičnih populacij. Hidrofilni polisaharid je močno razvejan neionski kopolimer saharoze in epiklorohidrina, ki gradientnemu mediju daje nizko viskoznost in visoko gostoto, torej lastnosti, ki sta ključni za ločevanje krvnih celic. Uspešnost postopka flotacije je odvisna od številnih dejavnikov, in sicer: stanja izhodnega vzorca krvi (vrsta uporabljeneag antikoagulant, časa od odvzem do procesiranja, temperature shranjevanja, patološkega stanja darovalcev, ...), temperature vzorca in gradientnega medija, natančnosti pri nanašanju razredčene krvi na gradientni medij ter časa centrifugiranja.

S postopkom flotacije pridobljene celice so primerne za nadaljnje ločevanje njihovih podpopulacij, študije efektorskih lastnosti limfocitov ter določanje prisotnosti površinskih označevalcev na imunskih celicah pri posameznih bolezenskih stanjih.



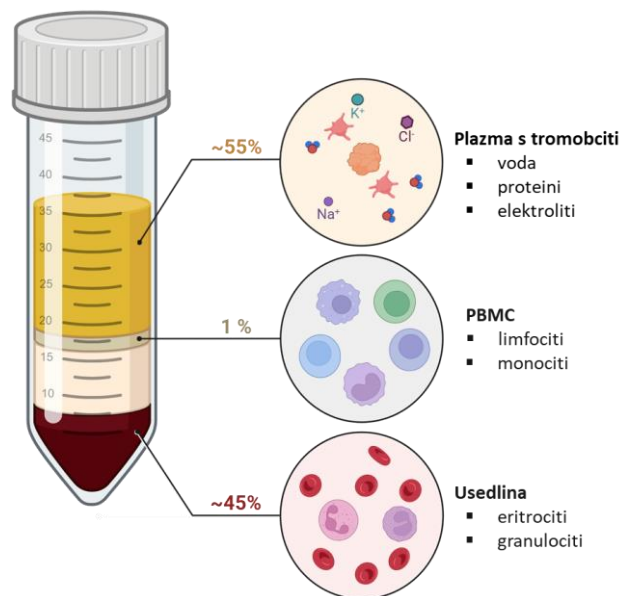
Slika 1: Shematski prikaz krvnih celic in njihovih premerov. (Slika ustvarjena s programom BioRender.)

OPIS METODE

Ločevanje celic na gradientnem mediju

Flotacija oz. ločevanje celic na gradientnem mediju temelji na različnih gostotah in velikostih posameznih celičnih populacij, ki so posledica značilnih lastnosti samih celic ali njihovih interakcij z gradientnim medijem (Slika 2). Po centrifugiranju tako nastane več gradientnih plasti:

- popolnoma na dnu se nahajajo eritrociti, ki ob stiku s hidrofilnim polisaharidom tvorijo večje in s tem težje skupke;
- plast tik nad eritrociti so granulociti, ki se jim zaradi osmotskega pritiska (gradientni medij je rahlo hipertoničen) poveča gostota;
- nad gradientnim medijem se nahaja obroček PBMC, nad katerim je plazma s trombociti, ki imajo nižjo gostoto kot sam medij in ostale krvne celice.



Slika 2: Sestava posameznih plasti po ločevanju krvi na gradientnem mediju. (Slika ustvarjena s programom BioRender.)

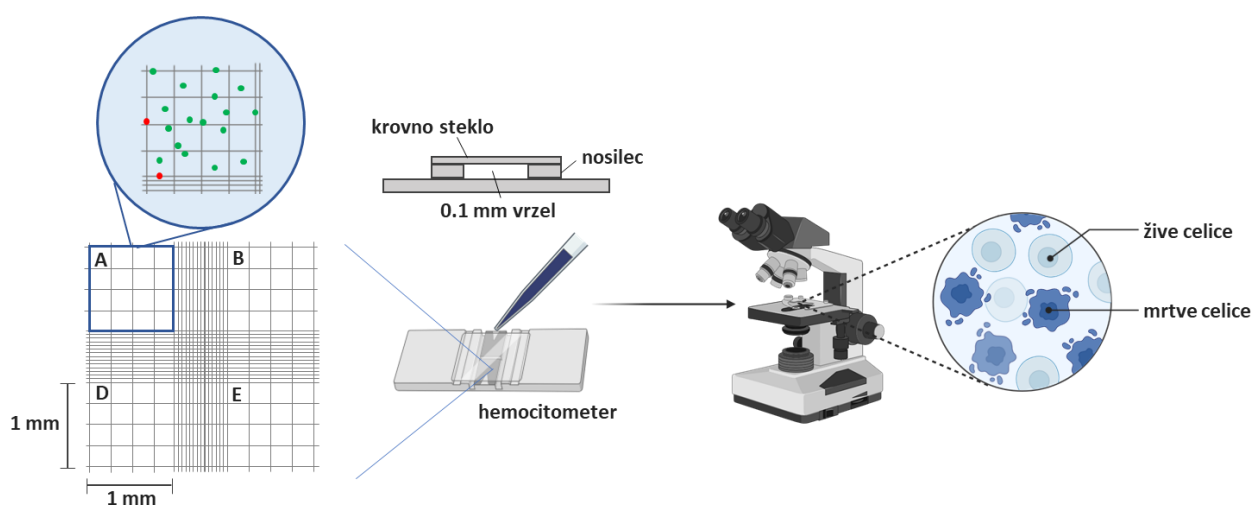
Pod optimalnimi pogoji ločevanja z gradientno metodo lahko iz začetnega krvnega vzorca izoliramo 60 ± 20 % PBMC z >80 % živostjo, pri čemer delež zaostalih granulocitov ne presega 5 %, delež zaostalih eritrocitov pa ne 10 %.

Določanje števila in živosti celic

Za številne celične eksperimente je ključnega pomena natančno poznavanje koncentracije in živosti PBMC v vzorcu, saj to omogoča pravilno nastavitve različnih nadaljnjih testiranj in ustrezno interpretacijo njihovih rezultatov. Ena izmed najpogosteje uporabljenih metod za

določanje števila in živosti celic temelji na barvanju z 0,4 % raztopino tripanskega modrila ter štetju celic z uporabo Neubauerjeve komore in svetlobnega mikroskopa. Neubauerjeva komora je posebna steklena ploščica za mikroskopiranje, ki ima na površini vrezano mrežo kvadratkov definiranih dimenzij, ki omogočajo natančno štetje celic v znanem volumnu (Slika 3). Mreža je sestavljena iz 4 večjih kvadrantov, od katerih ima vsak površino 1 mm², ti pa so nadalje razdeljeni še na 16 manjših. Med štetjem moramo upoštevati naslednja osnovna pravila:

- celice, ki ležijo znotraj kvadrata ali se dotikajo zgornje in desne mejne črte, vključimo v štetje;
- celice, ki se dotikajo spodnje in leve mejne črte kvadrata pa izločimo, da se izognemo dvojnemu štetju.



Slika 3: Neubauerjeva števna komora oz. Neubauerjev hemocitometer (slika ustvarjena s programom BioRender).

Posebej preštejemo žive in mrtve celice, ki jih med seboj ločimo glede na neobarvanost (žive) oz. obarvanost (mrtve) s tripanskim modrilom, katerega raztopino celični suspenziji dodamo tik pred štetjem. To barvilo namreč lahko vstopi le v celice, ki umirajo ali so že umrle, medtem ko žive celice ostanejo neobarvane, saj imajo ohranjeno integriteto celičnih membran. S to metodo lahko torej hkrati določimo absolutno število celic ter delež živih celic v vzorcu. Ker poznamo volumen vsakega števnega kvadratka (običajno 0,1 mm³ ali 10⁻⁴ mL), lahko izračunamo naslednje parametre:

$$\text{koncentracija celic} = \frac{A + B + C + D}{4} \times F \times 10^{-4} \frac{\text{celic}}{\text{mL}}$$

A, B, C, D: 4 kvadranti

F: faktor redčenja vzorca celične suspenzije

$$\text{živost celic (\%)} = \frac{\text{št. živih celic}}{\text{št. vseh celic (živih in mrtvih)}} \times 100$$

Viri

1. Boyum, A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Invest. Suppl.* 21: 77-89.
2. Phelan M C, Lawler G. Cell counting. *Curr. Protoc. Cytom.* 1: A.3A.1-A.3A.4

IZVEDBA VAJE – POSTOPEK

LABORATORIJSKA OPREMA	MATERIAL	REAGENTI
▪ svetlobni mikroskop ▪ centrifuga ▪ pipete	▪ plastične 15 mL centrifugirke z navojnimi pokrovi ▪ Pasteurjeve pipete ▪ Neubauerjeva komora za štetje celic ▪ pipetni nastavki ▪ injekcijska igla in brizga	▪ levkocitni koncentrat (angl. <i>buffy – coat</i>); ▪ gradientni medij ($\rho = 1.077 \pm 0,001 \text{ g/mL}$) ▪ pufer fosfatno pufrana slanica (PBS), pH= 7.4 ▪ 0.4 % raztopina tripanskega modrila

Slika 6: Laboratorijska oprema, materiali in reagenti, ki jih potrebujemo za izvedbo vaje.

PROTOKOL

Tekom vaje bomo v prvem delu izvedli izolacijo PBMC, čemur bo nato sledilo štetje celic in določanje stopnje živosti.

Postopek izolacije PBMC

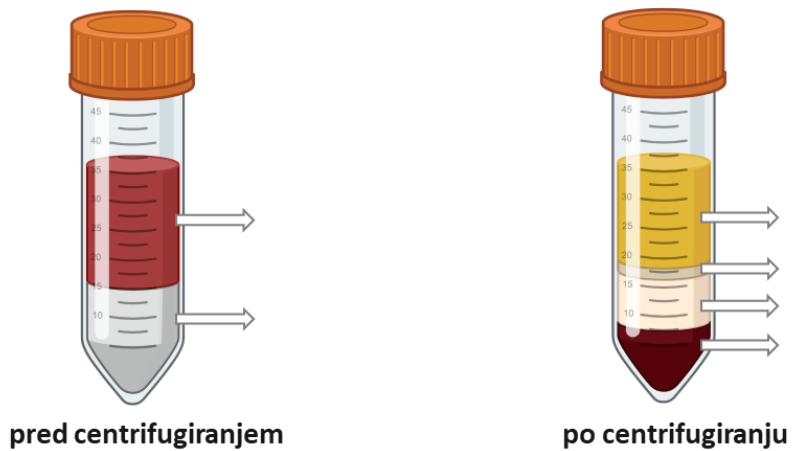
1. V 15 mL plastično konusno centrifugirko odpipetirajte 2 mL vzorca levkocitnega koncentrat (frakcija enote odvzete krvi zdrave osebe - krvodajalca, obogatena z levkociti in trombociti po centrifugiranju, *angl. buffy – coat*) in mu dodajte 7 mL PBS. Zaprite z navojnim pokrovom ter nato nežno, a temeljito premešajte z obračanjem za 180°.
2. Steklenico z gradientnim medijem večkrat nežno pretresite, nato iz nje s pipeto odmerite 4 mL in jih prenesite v novo, prazno plastično 15 mL centrifugirko z navojnim zamaškom.
3. Na gradientni medij s Pasteurjevo pipeto ob steni centrifugirke počasi in previdno nanosite 8 mL razredčenega krvnega vzorca. Pazite, da se vzorec ne pomeša z gradientnim medijem!
4. Centrifugirajte 15 min pri 500 x g oz. 2300 vrtljajev/min, brez zavore centrifuga CENTRIC 322A , Tehnica, Slovenija).
5. Z novo Pasteurjevo pipeto počasi in v celoti poberite gosti beli obroček PBMC, ki se nahaja med zgornjim plazemskim slojem in gradientnim medijem ter ga prenesite v novo 15 mL plastično centrifugirko in mu dodajte 10 mL PBS. Pri tem pazite, da pri prenosu ne pride do kontaminacije z drugimi plastmi!
6. Centrifugirko zaprite z navojnim zamaškom, vsebino previdno premešajte z obračanjem, nato pa centrifugirajte 10 min pri 300 x g oz. 1700 vrtljajev/min (centrifuga CENTRIC 322A , Tehnica, Slovenija).
7. Previdno odlijte supernatant.
8. Celice po potrebi ponovno sperite z 10 mL PBS in centrifugirajte tako, kot je navedeno v točki 6.

Določanje števila in živosti izoliranih PBMC

1. Celično usedlino, ki vam je ostala po spiranju s centrifugiranjem (točka 7 izolacije PBMC) resuspendirajte v 2 mL PBS.
2. V 0.5 mL plastični vsebnik odpipetirajte 20 μ L dobro premešane/homogenizirane celične suspenzije in nato dodajte 20 μ L tripanskega modrila ter oboje dobro premešajte.
3. V enega izmed dveh števnih prostorov Neubauerjeve komore s pipeto nanesite cca. 15 μ L pripravljene suspenzije celic z barvilom tako, da nastavek pipete prislomite na rob krovnega stekelca, ki ga predhodno položite na števno komoro, in počasi iztisnete vsebino. Pri tem pazite, da celična suspenzija ne dviga krovnega stekelca.
4. Pod svetlobnim mikroskopom izostrite sliko, preštajte žive in mrtve celice v vseh štirih kvadrantih.

REZULTATI IN KOMENTAR

- a. Ob slikah ustrezno označi plasti celičnih populacij pred in po ločevanju razredčenega krvnega vzorca na gradientnem mediju!



- b. Izračunajte celokupno število izoliranih PBMC.
- c. Izračunajte živost PBMC v %.
- d. Glede na dobljeni rezultat, preračunajte, kolikšen volumen pufru PBS bi moral dodati, da bi pripravil celično suspenzijo, ki bi vsebovala 1×10^6 živih celic/ mL.
- e. Komentirajte svojo izvedbo vaje (natančnost, problemi, ustreznost frakcij, itn.).

Datum:

Pregledal/a:

2. vaja: TEST DRAŽENJA KOŽE *IN VITRO*

asist. dr. Tijana Markovič, mag. farm.

UVOD

Komercialni test draženja kože, EpiDerm Skin Irritation Test, je **metoda *in vitro***, ki omogoča oceno, ali določena snov draži kožo ali ne. Razvit in validiran je bil za testiranje različnih snovi, vključno s **kozmetičnimi sestavinami** in **zdravilnimi učinkovinami**. Uporablja se kot **alternativa testiranju na živalih** (npr. na kuncih) in je v skladu s predpisi EU za oceno nevarnosti ter označevanje kemikalij.

Test draženja kože temelji na uporabi tridimenzionalnega rekonstruiranega človeškega epidermalnega (RHE) modela EpiDerm *in vitro*. Z njim lahko zanesljivo **ločimo dražeče snovi od nedražečih**, kar pripomore k varnejši uporabi izdelkov na koži.



Slika 1: Vstavek (insert) rekonstruiranega tridimenzionalnega (3D) kožnega modela epidermisa. (Vir: www.mattek.com)

DRAŽENJE KOŽE IN DERMATITIS

Snov, ki draži kožo lahko povzroči vnetje. Snovi, glede na njihov potencial draženja kože in povzročanja dermatitisa, delimo v dve skupini:

- **primarne**, ki povzročajo neposredno vnetje predelov kože, s katerimi pridejo v stik;
- **sekundarne**, ki izzovejo podobne učinke po določenem obdobju izpostavljenosti, vnetje pa ni nujno omejeno samo na omejen predel telesa.

Dermatitis je **vnetna kožna bolezen**, ki se lahko izraža z različno **intenziteto simptomov**. Prvi znaki so običajno **rdečina, draženje in otekanje** prizadetega dela kože. V nekaterih primerih

se lahko pojavijo tudi **mehurčki**. V kolikor mehurčki počijo, se poveča tveganje za **okužbo** (tudi septično).

Dermatitis se lahko pojavi, ko **koža pride v stik z dražečo snovjo**, pri čemer so najpogostejše prizadete **roke in dlani**. Če bolezni **ne zdravimo pravočasno**, se lahko **razširi** na druge dele telesa. Hujše oblike se pogosto **razvijajo počasi**, zato je zgodnje prepoznavanje dermatitisa zelo pomembno.

Vrste dermatitisa

Dermatitis delimo na dve glavni obliki:

- **Iritativni kontaktni dermatitis**, ki je posledica neposrednega stika kože z dražječimi snovmi. Pojavi se lahko hitro bodisi po izpostavitvi močno dražječim snovem ali pa po dolgotrajnem, ponavljajočem se stiku z manj agresivnimi. Dražče snovi lahko delujejo kemično (npr. kisline in baze), biološko (npr. encimi), mehansko (npr. trenje) ali fizično (npr. mraz). Vzrok za pojav iritativnega kontaktnega dermatitisa je lahko tudi pogosto umivanje rok (>20-krat dnevno) ali dolgotrajna izpostavljenost vlagi (mokre roke >2 uri dnevno).
- **Alergijski kontaktni dermatitis**, ki se lahko pojavi, ko obolela oseba razvije alergijo na določeno snov. Po pojavu preobčutljivosti pri posamezniku je to stanje najpogostejše trajno, saj vsak nadaljnji stik kože s to snovjo povzroči alergijski kontaktni dermatitis. Povzročitelji preobčutljivosti kože so pogosto tudi dražče snovi.

ALTERNATIVNE METODE TESTIRANJA IN NAČELO 3R

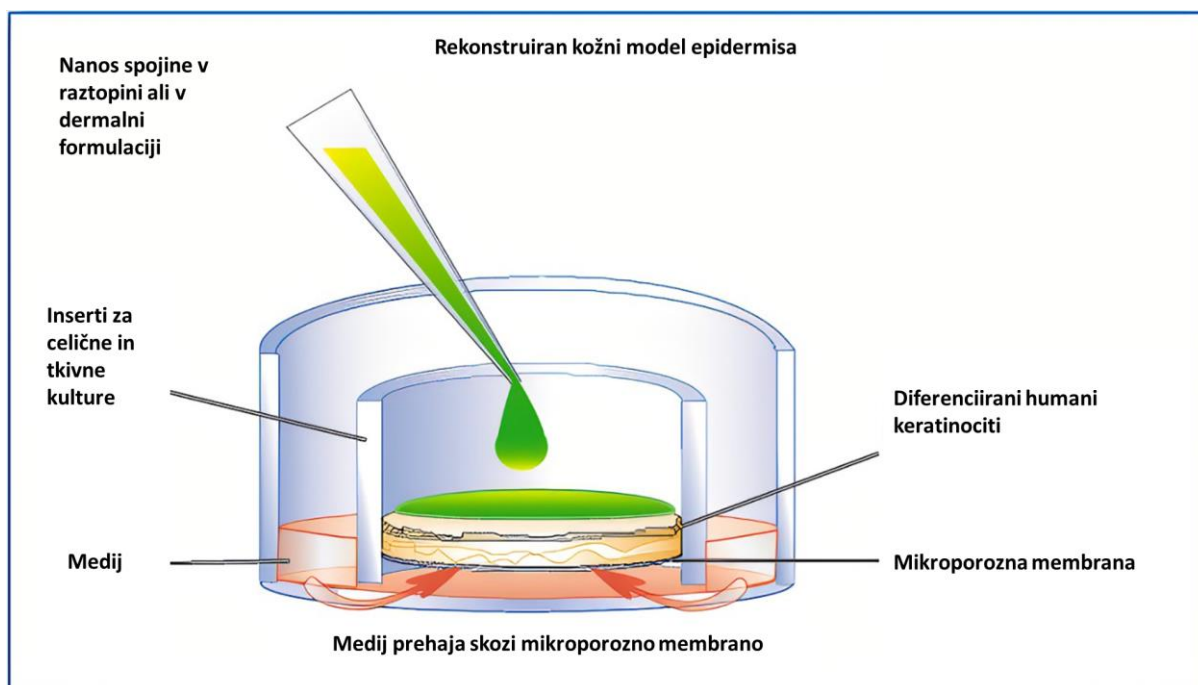
Načelo 3R (*angl. replacement, reduction and refinement*) je načelo zamenjave, zmanjšanja in izboljšanja uporabe poskusnih živali in je v znanosti pojem za etično ravnanje z njimi. Alternativne metode testiranja pa so vse, ki vključuje nadomestitev testiranj na živalih *in vivo* (*angl. replacement*) z drugimi tehnikami, zmanjšanje števila testnih živali (*angl. reduction*) ali pa spremembo tehnik testiranja s ciljem zmanjšanja nelagodja testnih živali (*angl. refinement*). Uredba o kozmetičnih izdelkih (KI) (Uredba (ES) št. 1223/2009) določa pogoje za trženje samih KI in njihovih sestavin v EU, njen namen pa je vzpostaviti enoten notranji trg za te izdelke in hkrati vzdrževati visoko raven varovanja zdravja ljudi.

Testiranje končnih KI in njihovih sestavin na živalih je v Evropski uniji (EU) prepovedano, in sicer prvo od septembra 2004, drugo pa od marca 2009 dalje. **Prepoved trženja** končnih KI in njihovih sestavin, predhodno preskušanih na živalih, pa je v celoti začela veljati leta 2013, ne glede na razpoložljivost alternativnih metod testiranja. Ti prelomni prepovedi kažeta na vodilno vlogo EU unije na področju zaščite poskusnih živali in njeno zavezanost k dokončni odpravi poskusov na živalih.

Alternativni testni sistemi *in vitro* so večinoma hitrejši, cenovno ugodnejši in zahtevajo manjše količine preskušanih snovi ali učinkovin v primerjavi z modeli *in vivo*, sočasno pa omogočajo, da se izognemo testiranju na živalih. Med testne sisteme *in vitro* sodijo tako enostavne enoslojne celične kulture človeških keratinocitov in fibroblastov kot tudi tridimenzionalni rekonstruirani kožni modeli.

Rekonstruirani tridimenzionalni (3D) kožni modeli

Rezultat razvoja modernega tkivnega inženirstva in modeliranja so 3D kožni modeli, ki predstavljajo povezavo med testnimi sistemi *in vivo* ter enoslojnimi celičnimi kulturami *in vitro*. Rekonstruirani kožni modeli so lahko epidermalni in epidermalno-dermalni. Slednje sestavljajo sloj fibroblastov z zunajceličnim matriksom, razvito bazalna membrana v dermalno/epidermalnem stiku ter stratificirano epidermalno komponento. Slednje pomeni, da je tako v epidermalnih kot epidermalno-dermalnih 3D kožnih modelih epidermis diferenciran v več plasti keratinocitov, kar omogoča ustrezno vrednotenje vpliva kozmetično aktivnih sestavin na vrhnjico kože. Dodatni prednosti 3D kožnih modelov pred enoslojnimi celičnimi kulturami pa sta še možnost topikalnega nanosa dermalnih formulacij ter možnost vrednotenja sinergističnega odziva keratinocitov in fibroblastov na testirano spojino.



Slika 2: Rekonstruirani kožni model epidermisa. Prirejeno po: www.mattek.com

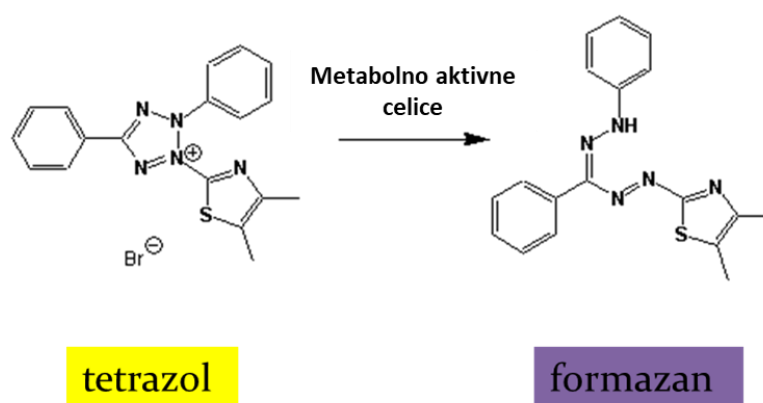
TEST DRAŽENJA KOŽE Z UPORABO REKONSTRUIRANEGA 3D ČLOVEŠKEGA EPIDERMISA EpiDermFT

Izvedbo tega testa teoretično in praktično nazorno prikazuje naslednji posnetek: [Skin Irritation Test: EpiDerm Reconstructed Human Epidermal Model | Protocol \(jove.com\)](#). Test draženja kože se izvaja v časovnem obdobju 4 dni. Sestavljajo ga predinkubacija, 60-minutna izpostavljenost testirani spojini, 42-urna inkubacija in test celične viabilnosti MTT [MTT je tetrazolijeva sol, in sicer: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid)] (Preglednica 1).

Po prevzemu komercialnih vstavkov epidermalnih tkiv in njihovi rekonstituciji s predinkubacijo preko noči (**dan 0**), te nato tretiramo s testiranimi spojinami (**dan 1**). Slednje so lahko tekoče, poltrdne, trdne ali viskozne. Za vsako testirano spojino, pozitivno kontrolo (5 % raztopina natrijevega dodecilsulfata - SDS) in negativno kontrolo (PBS) uporabimo po 3 tkivne vstavke. Izpostavljenost testiranim spojinam v celičnem inkubatorju pri standardnih pogojih (37 °C, 5 % CO₂ v zraku in 95 % relativna vlažnost) traja 60 minut. Testirane spojine nato z obsežnim postopkom spiranja odstranimo s površine tkiva, potem pa tkivne inserte prenesemo v svež medij.

Po 24-urni inkubaciji v inkubatorju pod standardnimi pogoji (**dan 2**), zamenjamo medij. Odstranjeni medij lahko zamrznemo in tako shranimo za morebitno nadaljnjo analizo citokinov in drugih analitov. Po zamenjavi medija tkivne inserte v celičnem inkubatorju inkubiramo še dodatnih 18 ur.

Ob koncu celokupne 42 urne inkubacije (**dan 3**) tkivne vstavke prenesemo v rumeno obarvano raztopino MTT in inkubiramo še 3 ure v celičnem inkubatorju pri standardnih pogojih. Nastali modro-vijolični formazan ekstrahiramo 2 uri z izopropanolom. Absorbanco ekstrahiranega formazana izmerimo spektrofotometrično pri valovni dolžini 492 nm. S testom MTT določamo obseg celične metabolne aktivnosti, ki odraža stopnjo viabilnost celic (Slika 3). Spojino opredelimo kot **dražečo**, kadar je izmerjeni obseg **celične viabilnosti <50%** glede na netretirano kontrolo.



Slika 3: Redukcija rumeno obarvanega reagenta MTT v modro-vijolično obarvan formazan, ki jo povzročijo **metabolno aktivne, žive celice**. Prirejeno po: <https://www.sigmaaldrich.cn/CN/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt>).

Preglednica 1: Protokol izvedbe testa draženje kože z uporabo rekonstruiranega 3D modela EpidermFT

Dan	Protokol
0	Predinkubacija v mediju
1	Izpostavitve testiranim spojinam, pozitivni in negativni kontroli
2	Menjava medija
3	Test MTT

1. Negativna kontrola (NK):

V primeru negativne kontrole (NK) 3 vstavke z rekonstituiranim 3D epidermisom tretiramo s sterilnim PBS. Test izpolnjuje pogoje sprejemljivosti, če je povprečna viabilnost tkiv, tretiranih z negativno kontrolo $\geq 1,0$ in $\leq 2,5$ %.

2. Pozitivna kontrola (PK):

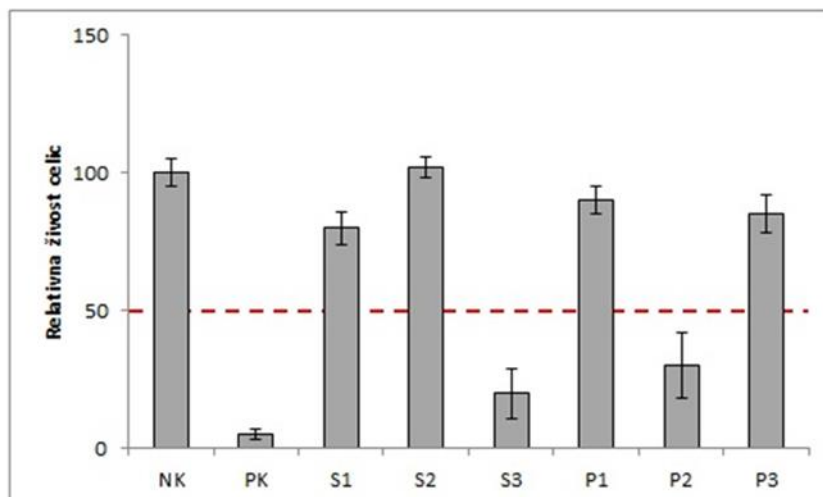
Pozitivna kontrola (PK) pripravimo tako, da 3 vstavke z rekonstituiranim 3D epidermisom tretiramo s 5 % raztopino SDS. Test izpolnjuje pogoje sprejemljivosti, če je povprečna viabilnost tkiva treniranega s pozitivno kontrolo < 20 %.

3. Relativni standardni odklon (RSD):

Dražilnost spojine izračunamo iz povprečnih vrednosti viabilnosti, določene na 3 posameznih tkivnih vstavkih z rekonstituiranim 3D epidermisom. Variabilnost treh meritev je sprejemljiva, kadar je vrednost RSD (*angl. relative standard deviation*) $< 18\%$.

Rezultati testa draženja kože

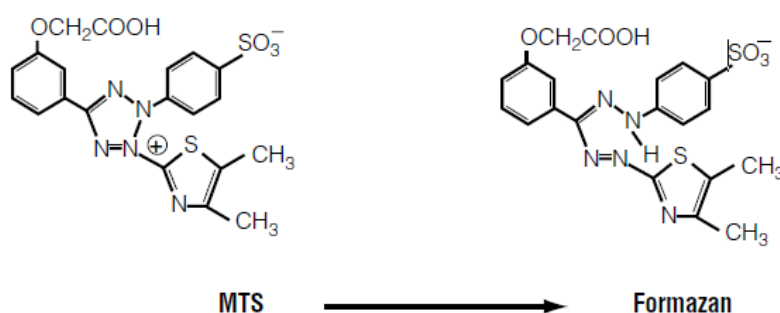
Slika 4 prikazuje rezultate ustrezno izvedenega testa, pri čemer je zadoščeno vsem trem prej opisanim kriterijem sprejemljivosti za negativno in pozitivna kontrolo ter vrednosti RSD meritev vzorcev). Na sliki 4 vidimo, da testirane spojine S1, S2, P1 in P3 nimajo dražičih lastnosti (viabilnost celic v rekonstruiranem 3D epidermisu je $> 50\%$), medtem ko spojin S3 in P2 dražita kožno povrhnjico.



Slika 4: Grafični prikaz rezultatov testa draženja kože z uporabo rekonstruiranega 3D epidermalnega modela EpiDermFT.

Ugotavljanje metabolne aktivnosti celic s testoma MTT ali MTS

Za vrednotenje metabolne aktivnosti celic pogosto uporabljamo kolorimetrične metode. V našem primeru bomo za izvedbo vaje v ta namen namesto prej opisanega testa MTT uporabili test MTS [MTS je tetrazolijeva sol, in sicer: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva notranja sol].



Slika 5: Redukcija rumeno obarvanega reagenta MTS v modro-vijolično obarvan formazan, ki jo povzročijo **metabolno aktivne, žive celice**. (Vir: https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-_mts_/?catNum=G3582.)

MTS je tetrazolijeva sol, ki se v prisotnosti mitohondrijske reduktaze (NADPH, NADH) živih, metabolno aktivnih celic reducira v vijolično obarvan vodotopni formazan (Slika 5). Količina nastalega produkta je sorazmerna z metabolno aktivnostjo celic. Formazan absorbira svetlobo pri 492 nm, kar merimo kolorimetrično.

Količino metabolno aktivnih celic v analiziranem vzorcu izračunamo tako, da rezultat vsake meritve normiramo na netretirano kontrolo. Vse eksperimentalne meritve absorbanc izvedemo v trojnikih, nato pa izračunamo njihove povprečne vrednosti. Obseg metabolne aktivnosti celic izračunamo z uporabo enačbe 1.

$$\% \text{ metabolne aktivnosti} = \frac{A(\text{vzorec}) - A(\text{slepa kontrola})}{A(\text{netretirana kontrola}) - A(\text{slepa kontrola})} \times 100\%$$

Enačba 1: Izračun obsega metabolne aktivnosti celic:

A – povprečje izmerjenih absorbanc trojnikov

Vzorec – rekonstruirana 3D epidermalna tkiva, izpostavljena testirani spojini/kremi, PBS (negativna kontrola) ali 5 % raztopina SDS v PBS (pozitivna kontrola)

Slepa kontrola – medij in reagent MTS

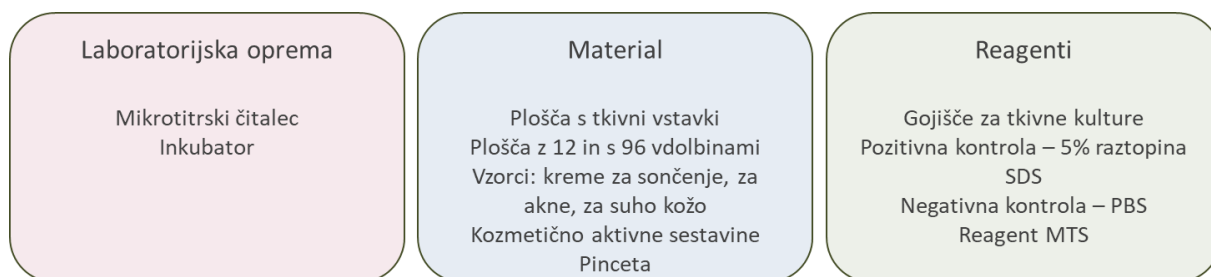
Netretirana kontrola – netretirano rekonstruirano 3D tkivo

Viri

1. [Test Guideline No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Methods \(oecd-ilibrary.org\); https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264242845-en.pdf?expires=1648551634&id=id&accname=guest&checksum=E67051E22E7EE18C6FF1AE80AFC11611](https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264242845-en.pdf?expires=1648551634&id=id&accname=guest&checksum=E67051E22E7EE18C6FF1AE80AFC11611); dostopano: 11.6.2025
2. [Products • MatTek Life Sciences](#); dostopano: 11.6.2025
3. [Zdravje in varnost: Snovi, dražilne za kožo - SAMANCTA \(europa.eu\); https://ec.europa.eu/taxation_customs/dds2/SAMANCTA/SL/Safety/SkinIrritants_SL.htm](https://ec.europa.eu/taxation_customs/dds2/SAMANCTA/SL/Safety/SkinIrritants_SL.htm), dostopano: 29.3.2022
4. Lah Tomšič, Suzana, 2015, *Napovedovanje dražljivosti in jedkosti spojin na koži in očeh z računalniško aplikacijo Toxtree*. Diplomsko delo
5. Markovič, Tijana, 2011, *Evaluation of glucocorticoid-induced skin atrophy on reconstructed skin models : graduation thesis*. Diplomsko delo.

IZVEDBA VAJE - POSTOPEK

Na vaji bomo izvedli test draženja kože z uporabo rekonstruiranega 3D človeškega epidermisa EpiDermFT. Za izvedbo vaje bomo uporabili laboratorijsko opremo, material in reagente, ki so navedeni na sliki 6.



Slika 6: Laboratorijska oprema, materiali in reagenti, ki jih potrebujemo za izvedbo vaje.

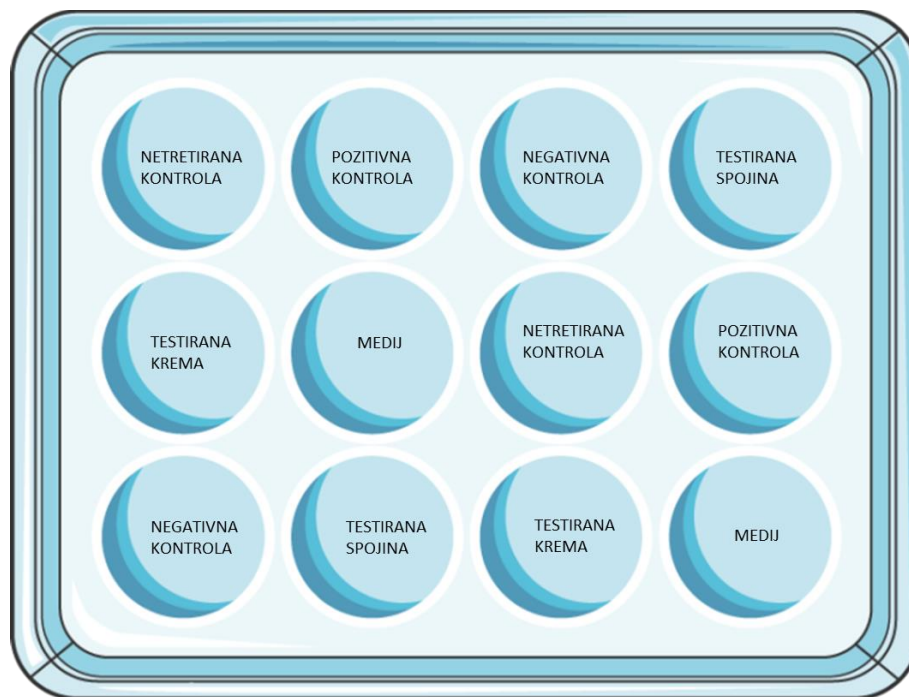
Vajo bomo opravili v obliki simulacije izvedbe testa draženja kože, zato so format in predpisani časovni intervali temu prilagojeni.

1. del: Pred-inkubacija 3D kožnih modelov EpiDermFT

1. Po prejemu komercialnega kompleta 3D kožnih modelov preverite celovitost vseh njegovih sestavin.
2. Pripravite eno sterilno ploščo z 12 vdolbinicami in vanje odpipetirajte po 600 μ L gojitvenega medija.
3. Odprite ploščo z 12 vdolbinicami, v katerih so vstavki z 3D kožnimi modeli in odstranite sterilno gazo.
4. Nato s sterilno pinceto prenesite tkivne vstavke v vdolbinice sterilne prazne plošče z 12 vdolbinicami.
5. Odstranite vso preostalo transportno agarozo, ki se je oprijela zunanjih strani vstavkov ali tkiv, tako da jo nežno popivnate s sterilnim filtrirnim papirjem.
6. Vizualno pregledajte tkiva v vstavkih. Ne uporabljajte poškodovanih tkiv ali tkiv, ki so popolnoma prekrita s tekočino. S sterilno bombažno palčko previdno posušite površino tkiv v vstavkih., pri čemer se tkiv ne dotikajte neposredno, saj za odstranitev vlage z njihovih površin zadostujejo že kapilarni učinki.
7. Po osušitvi tkivnih površin s sterilno pinceto prenesite 5 tkivnih vstavkov v zgornji dve vrstici plošče z 12 vdolbinicami, v katere ste predhodno dodali po 600 μ L gojitvenega medija (točka 2).
8. Sprostite morebitne zračne mehurčke, ujete v mediju pod tkivnimi inserti.
9. Plošče z 12 vdolbinicami, ki vsebujejo vstavke tkiv v mediju, postavite v celični inkubator (37 °C, 5 % CO₂, 95 % relativna vlažnost) in jih pustite v njem 5 min (predinkubacija 3D epidermalnih tkiv EpiDermFT)
10. Po predinkubaciji lahko posamezne testirane spojine in kreme nanese na rekonstruirane 3D kožne modele tkiva EpiDermFT.

2. del: Izpostavitve rekonstruiranih 3D tkiv EpiDermFT vzorcem testiranih spojin, krem ter pozitivni in negativni kontroli

1. Preglejte površino rekonstruiranih 3D kožnih tkiv EpiDermFT v vstavkih in s sterilnimi bombažnimi paličkami odstranite vso vlago z njihovih površin.
2. Ustrezno označite vse pokrove plošč z 12 vdolbinicami (Slika 7), kot sledi: netretirana kontrola, pozitivna kontrola (PK), negativna kontrola (NK), testirana spojina, testirana krema, medij.
3. Nato na tkiva v vstavkih nanesite pozitivno kontrolo (5% raztopina SDS), negativno kontrolo (PBS), vzorec testirane spojine v raztopini in testirano kremo.
 - Za testiranje tekočih spojin nanesite 30 μ L raztopine vzorca neposredno na tkivo in pri tem ne pritiskajte na površino tkiva.
 - Za testiranje poltrdne snovi uporabite pipeto s poševno odrezanim nastavkom, da lahko 30 μ L kreme nanesete neposredno na tkivo. Po potrebi nežno in previdno razporedite kremo po tkivu tako, da v čim večji meri pokrijete njegovo celotno površino.
4. Nanesite 30 μ L PBS kot negativno kontrolo in 30 μ L 5 % raztopine SDS kot pozitivno kontrolo.
5. Ko končate z nanosi, pokrijte plošče s pokrovi in jih za 5 minut prenesite v celični inkubator.
6. Nato začnite s postopkom spiranja tkivnih vstavkov s sterilnim PBS, pri čemer vsakega od njih sperite 7-krat.
7. Po spiranju vsak tkivni insert 3x zapored popolnoma potopite v 150 mL PBS in pretresite, da odstranite morebitni preostanek testirane snovi.
8. Na koncu vsak tkivni insert s sterilnim PBS še enkrat sperite od znotraj in enkrat od zunaj.
9. Odstranite morebitni presežek PBS s tkiv tako, da vstavke/inserte nežno stresete na sterilnem filter papirju.
10. Nato tkivne vstavke/inserte prenesite v spodnji dve vrstici vdolbin na plošči z 12 vdolbinami, predhodno napolnjenih s po 600 μ L testnega medija.
11. Medij v vdolbinah zgornjih dveh vrstic na plošči prenesite v epruvetke in shranite za nadaljnje analize citokinov.



Slika 7: Shema razporeda (oznake na pokrovu) tretiranih rekonstruiranih 3D tkiv EpiDermFT v tkivnih vstavkih na plošči z 12 vdolbinami. (Slika je bila ustvarjena s programom Biorender.)

3. Test viabilnosti MTS in komentiranje rezultatov

- Dodajte po 100 μ L reagenta MTS v spodnjih 6 vdolbin (5 tkivnih vstavkov v mediju; slika 7) na plošči z 12 vdolbinami in inkubirajte 3h v inkubatorju.
- Nato iz vsake od teh vdolbin prenesite po 100 μ L medija v vdolbinice mikrotitrne plošče s 96 vdolbinicami, in sicer v trojnikih (po tri ponovitve). Iz vsake vdolbinice odstranite morebitne zračne mehurčke.
- Pomerite absorbanco v mikrotitrskem čitalcu, pri valovni dolžini 492 nm.

Analiza rezultatov

- Izračunajte povprečje in relativno standardno deviacijo (RSD) vseh trojnikov posameznih meritev. Nato od vsake povprečne vrednosti absorbanc trojnikov posameznih meritev odštejte povprečno vrednost absorbance trojnika meritev medija (slepa kontrola).
- Povprečne vrednosti absorbanc trojnikov meritev pozitivne in negativne kontrole ter vzorcev testirane spojine in KI (kreme), delite s povprečno vrednostjo absorbanc trojnika meritev netretirane kontrole.
- Rezultate predstavite v obliki stolpičastega grafa.

REZULTATI IN KOMENTAR

1. Opis materiala in aparatur:

2. Oglejte si posnetek izvedbe testa draženja kože in shematsko prikažite postopek izvedbe:

[Skin Irritation Test: EpiDerm Reconstructed Human Epidermal Model | Protocol \(jove.com\)](#)

3. Rezultati meritev in izračun:

4. Komentar rezultatov:

Komentirajte dobljene rezultate testa draženja kože, in sicer: ustreznost izvedbe testiranja (pozitivna kontrola, negativna kontrola, testirana spojina, testirana krema) ter opredelite dražilni potencial testiranih vzorcev spojin in kreme kot kozmetičnega izdelka (KI).

Datum:

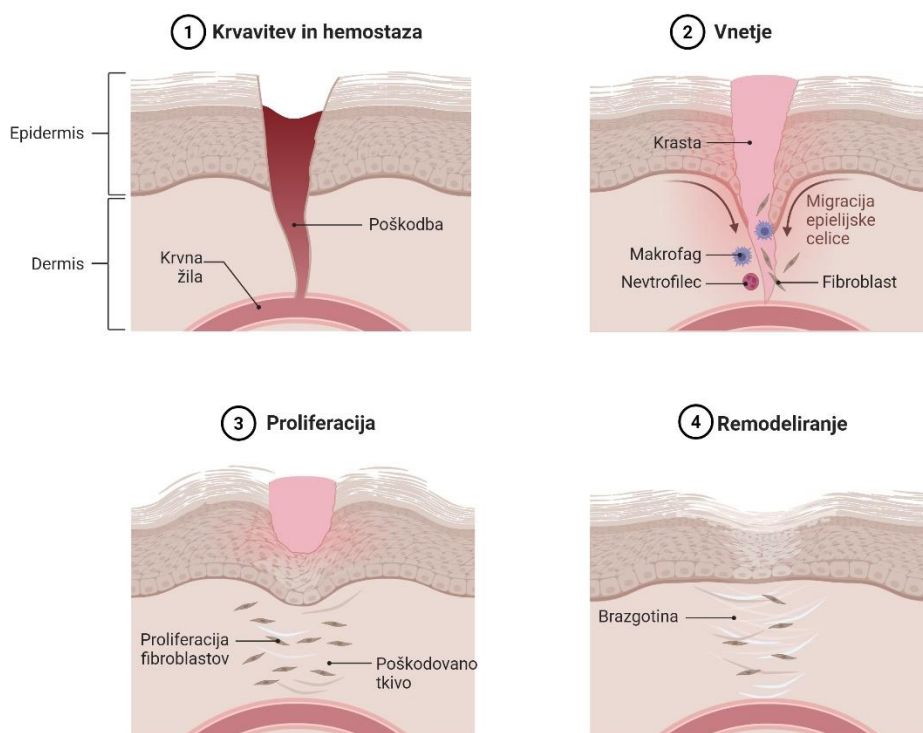
Pregledal/a:

3. vaja: CELJENJE RAN

asist. dr. Tijana Markovič, mag.farm.

PROCES CELJENJA RAN

Celjenje ran je kompleksen in izrazito reguliran regenerativni proces, s katerim telo popravi in obnovi poškodovano tkivo. Vključuje zapleteno zaporedje dogodkov, ki potekajo v **4 fazah** (slika 1): a) hemostaza, b) vnetje, c) celična proliferacija in d) remodeliranje. Tekom teh se rana zaceli, funkcija tkiva pa se obnovi.



Slika 1: Štiri faze celjenja ran. (Slika je bila ustvarjena s programom BioRender.)

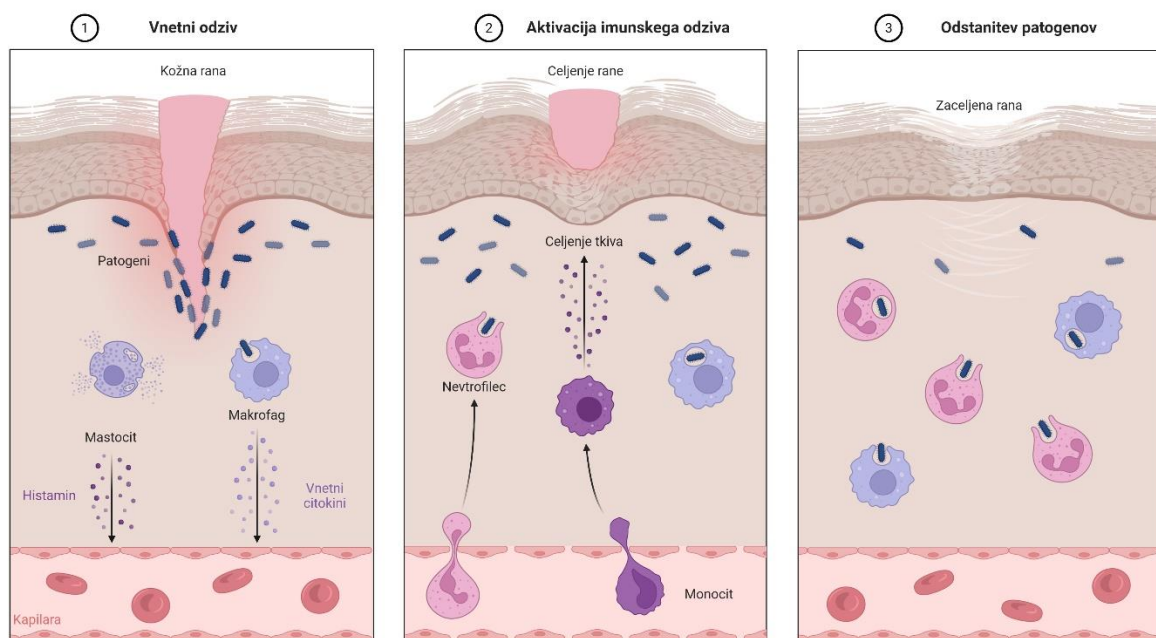
1. **Krvavitev in hemostaza:** ko se poškoduje kožna plast, se poškodujejo tudi krvne žile in kri se začne izlivati na površje kože. Ko se kri izliva iz rane, se na površju rane zbirajo trombociti, ki tvorijo strdek ali tromb, ki zapre poškodovane žile, seveda če poškodba ni prevelika oz. preobsežna, in tako ustavi nadaljnje krvavenje.
2. **Vnetje:** ob nastanku rane se imunski sistem odzove tako, da na to območje pošlje bele krvne celice (levkocite) in tako skuša preprečiti morebitne okužbe. Posledično pride do vnetja, za katerega so značilni tkivna rdečina, toplota, oteklina in bolečina.

3. **Celična proliferacija:** v tej fazi se začne obnavljati poškodovano tkivo. Oblikujejo se nove krvne žile, ki celečo se rano oskrbujejo s kisikom in hranili, kožni fibroblasti, pa proizvajajo kolagen, beljakovino, ki tvori strukturno ogrodje tkiva.
4. **Remodeliranje:** v tej zaključni fazi celjenja, ki lahko traja več mesecev, se novo tkivo preoblikuje in utrdi. Kolagenska vlakna postanejo bolj organizirana in poravnana, odvečno brazgotinsko tkivo pa se odstrani.

Na proces celjenja rane lahko vpliva več dejavnikov, vključno s starostjo, prehrano, osnovnimi zdravstvenimi težavami ter vrsto in lokacijo poškodbe. Pomembno je tudi, da so rane čiste in zaščitene, s čimer preprečujemo okužbo in pospešujemo celjenje.

VNETNI ODZIV

Vnetni odziv ob nastanku kožne rane se sproži v treh korakih (slika 2). V začetni fazi vdor patogenov v rano povzroči, da začnejo makrofagi in nevtrofilci sproščati vnetne citokine in histamin, ki povečajo prepustnost krvnih žil in privabijo imunske celice iz krvi v poškodovano tkivo. Aktivirani nevtrofilci odstranijo patogene, pri čemer povzročajo tudi poškodbe okoliškega tkiva, infiltrirani monociti pa se diferencirajo v tkivne makrofage in sproščajo dejavnike, pomembne za celjenje. Po odstranitvi patogenov nevtrofilci in makrofagi zapustijo mesto vnetja in se premaknejo nazaj v krvni obtok.



Slika 2: Prikaz vnetnega odziva v procesu celjenja ran. (Slika je bila ustvarjena s programom BioRender.)

METODE ZA VREDNOTENJE CELJENJA RAN *IN VITRO*

1. Test celjenja ran ali test preraščanja vrzeli ustvarjene s praskanjem

Test celjenja ran ali test preraščanja vrzeli, ustvarjene s praskanjem (*angl. scratch assay*) je enostavna, poceni in uveljavljena metoda za merjenje migracije epitelijskih kožnih celic *in vitro*. Izvedemo ga tako, da naredimo prasko na enoslojni kulturi človeških keratinocitov. Celice nato tekom gojenja migrirajo z obeh strani vrzeli in jo postopno zapolnijo v celoti, kar dokumentiramo z zajemanjem slik v rednih časovnih intervalih pod invertnim mikroskopom.

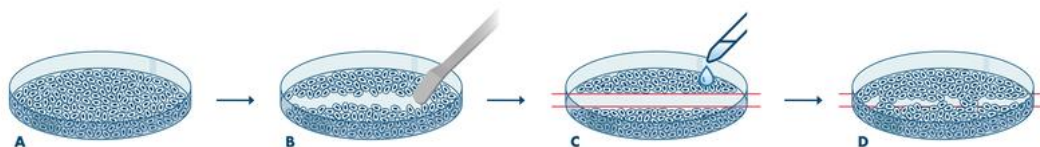
Ta test ima številne prednosti. Prvič, je razmeroma poceni, enostaven za izvedbo in omogoča vrednotenje v realnem času, poleg tega pa lahko pogoje testiranja enostavno prilagodimo različnim eksperimentalnim ciljem (2, 3). Ker model omogoča izrazito usmerjen celični migracijski odziv, je tudi vrednotenje podatkov preprosto (2).

Ena od omejitev tega testa je, da lahko pride do neskladnosti med globino in velikostjo spraskane vrzeli. Ker vrzel ustvarimo ročno, s praskanjem, lahko pride do neravnih oz. "raztrganih" mej njenih robov, kar seveda oteži analizo zbranih podatkov. Poleg tega lahko s praskanjem tudi fizično poškodujemo celice, ki mejijo na vrzel, kar ustvari območja neenakomerne velikosti tovrstne umetne rane. Ta omejitev z avtomatiziranimi tehnologijami počasi postaja manjša težava. Na tržišču so prisotni tudi različni vstavki *in vitro*, ki omogočajo ustvarjanje enakomerne umetne rane z definiranimi dimenzijami, in sicer v vdolbinicah mikrotitrskih plošč različnih formatov, s 6, 12, 24, 96 ali 384 vdolbinicami. Tako lahko izvajamo visoko zmogljivo presejanje učinkov večjega števila spojin *in vitro*, kar je velika prednost za izvedbo raziskovalnih študij. Kljub novim tehnologijam, ki povečujejo natančnost in učinkovitost testa celjenja ran oz. preraščanja umetno ustvarjene vrzeli, še vedno obstajajo moteči dejavniki, ki lahko izkrivljajo rezultate, npr. skupki celic na robu vrzeli in adhezija med celicami.

Standardni postopek za izvedbo testa celjenja ran:

Prikaz izvedbe metode si lahko ogledate v naslednji video povezavi:

[Scratch Assay Tutorial](#)



Slika 3: Shematski prikaz testa celjenja ran oz. testa preraščanja vrzeli, ustvarjene s praskanjem (*angl. scratch assay*): (a) na ustrezno rastno površino naselimo celice in jih v celičnem inkubatorju gojimo preko noči, da se pritrdijo na plastično rastno površino; b) na enoslojni celični kulturi naredimo umetno vrzel s praskanjem in zajamemo sliko; c) dodamo ali nanesemo preučevano spojino; d) zajemamo slike v različnih časovnih točkah. Prirejeno po ([Scratch Assay Tutorial](#)).

Človeške keratinocite v gojitvenem mediju naneseemo v vdolbine plošče s 6 vdolbinami in jo pokrito inkubiramo preko noči v inkubatorju pri standardnih pogojih (37 °C, 5 % CO₂, 95 % relativna vlažnost), da se pritrdijo na rastno površino. Pomembno je, da se v tem času oblikuje enojni celični sloj in so celice enakomerno razporejene po rastni površini. Pred nanašanjem celic moramo določiti optimalno gostoto celične suspenzije, ki zadošča za prerast rastne površine v posamezni vdolbini.

Ko je konfluentnost oz. preraščenost celic idealna, s konico pipete naredimo prasko tako, da konico pipetnega nastavka brez postanka enakomerno povlečemo čez celoten središčni premer vdolbine. Za optimalno ustvarjane vrzeli oz. umetne rane uporabimo pipeto z merilnim območjem od 10 – 200 µL in nastavek rumene barve. Če je vrzel narejena ročno, s praskanjem, je pomembno, da je vidna na obeh straneh vidnega polja pod mikroskopom, za kar mora biti široka približno 0,5 mm. Vrzeli v vseh vdolbinah plošče nato pregledamo na invertnem svetlobnem mikroskopu, z uporabo relativnega objektivja 20x ter digitalno zajamemo slike.

Na pokrovu plošče ustrezno označimo vsako vdolbino, nato pa v vdolbine naneseemo testirane spojine in kontrolo ter ploščo pokrijemo. Za negativno kontrolo uporabimo pufer PBS. Po 24 h gojenja v inkubatorju pri standardnih pogojih (37 °C, 5 % CO₂, 95 % relativna vlažnost) vdolbine pregledamo na invertnem svetlobnem mikroskopu, z uporabo relativnega objektivja 20x ter digitalno zajamemo slike.

2. Test celjenja umetnih ran z uporabo rekonstruiranih kožnih modelov

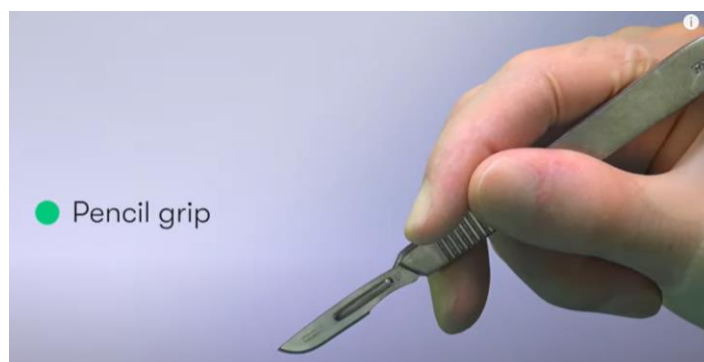
Rezultat razvoja tkivnega modeliranja so tridimenzionalni (3D) kožni modeli, ki predstavljajo povezavo med testnimi sistemi *in vivo* ter enoslojnimi celičnimi kulturami *in vitro*. Rekonstruirani 3D kožni modeli so lahko epidermalni in epidermalno-dermalni. Slednje sestavljajo sloj fibroblastov z zunjceličnim matriksom, razvita bazalna membrana v dermalno/epidermalnem stiku ter stratificirana epidermalna plast. Tako v epidermalnih kot epidermalno-dermalnih kožnih modelih je epidermis diferenciran v več dobro definiranih plasti keratinocitov. Dodatni prednosti 3D kožnih modelov pred enoslojnimi celičnimi kulturami sta še možnosti topikalnega nanosa dermalnih formulacij ter ovrednotenja sinergističnega odziva keratinocitov in fibroblastov na testirano spojino.

3D rekonstruirani kožni modeli celjenja ran predstavljajo korak naprej v razvoju metod *in vitro*, ki vsaj delno posnemajo kompleksno mikrookolje tega procesa, zato bi lahko pomagali pri začetnih študijah novih terapevtikov, ki spodbujajo migracijo in proliferacijo epitelijskih celic. Umetne rane oz. vrzeli v teh modelih lahko ustvarimo s pomočjo skalpela ali laserja.

Kako varno in pravilno uporabljamo skalpel?

Pri uporabi skalpela v laboratoriju je **varnost** na prvem mestu, saj so skalpeli **izjemno ostri in nevarni**. Pri njihovi uporabi bodite vedno zbrani in pozorni. Pred uporabo skalpela obvestite sošolce, da ga boste uporabljali. Pred en ga uporabite, mu snemite zaščitni pokrov, izvedite

rez in ga mu takoj namestite nazaj ponovno namestite pokrov. Skalpela nikoli ne puščajte nezaščitenega na laboratorijskem pultu.



Slika 4: Prikaz varne drže skalpela. Varno uporabo skalpela si lahko ogledate na naslednji video povezavi: [Introduction to Scalpels | What You Need to know to Safely Use this Essential Instrument](#))

Izračun koncentracije pozitivne kontrole – raztopine dekspantenola

Pripravili bomo raztopino dekspantenola, ki jo bomo nanесли na 3D kožni model kot pozitivno kontrolo. Uporabili bomo priporočeno koncentracijo: 5% (w/v) deksapantenola deksapantenola za zdravljenje ran. • Končni volumen raztopine bo 30 µL. Na voljo imamo 10% (w/v) osnovno raztopino dekspantenola. Opomba: 5% (w/v) pomeni 5 g učinkovine v 100 mL raztopine.

1. Izračunajte, koliko µL 10% raztopine dekspantenola potrebujete, da pripravite 30 µL 5% raztopine.
2. Izračunajte, koliko µL topila (sterilne vode) morate dodati, da boste pripravili želeni volumen in koncentracijo raztopinr deksapantenola.

1. Izračun volumna 10% raztopine:

Uporabimo enačbo za redčenje: $C_1 * V_1 = C_2 * V_2$

$$C_1 = 10\%, C_2 = 5\%, V_2 = 30 \mu\text{L}$$

$$V_1 = (5 * 30) / 10 = 15 \mu\text{L}$$

Odgovor: Potrebujemo 15 µL 10% raztopine dekspantenola

2. Izračun volumna topila:

$$V_{\text{topilo}} = V_2 - V_1 = 30 \mu\text{L} - 15 \mu\text{L} = 15 \mu\text{L}$$

Odgovor: Dodati je potrebno 15 µL sterilnega topila.

Dodatno gradivo

1. <https://www.youtube.com/watch?v=TLVwELDMDWs>
2. <https://www.youtube.com/watch?v=Wu8CXYFqvc4>
3. <https://www.jove.com/v/56825/a-novel-in-vitro-wound-healing-assay-to-evaluate-cell-migration>
4. <https://youtu.be/F4-YFK0gHZs>
5. <https://www.youtube.com/watch?v=1kGWYAyCGMw>

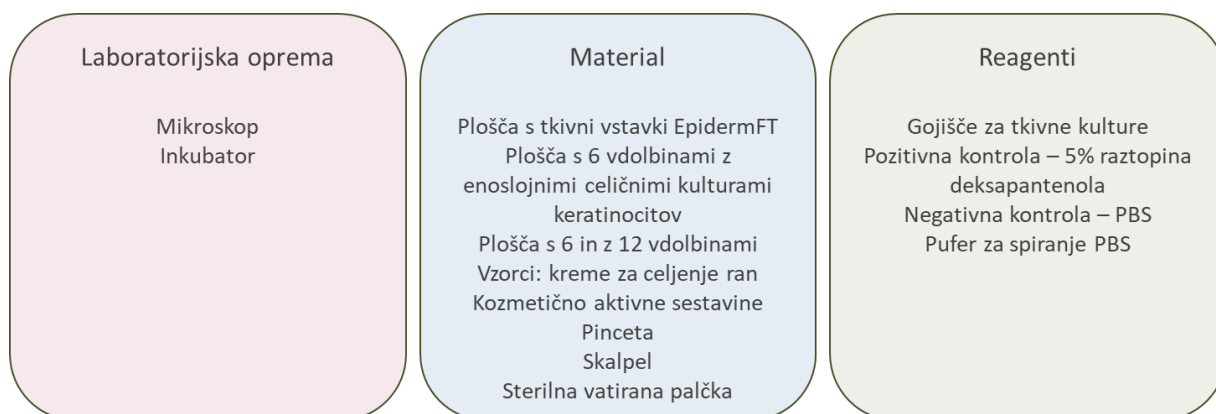
Viri

1. Murphy, K.; Weaver, C. Pattern recognition by cells of the innate immune system. Janeway's Immunobiology. 2017
2. Masson-Meyers DS, Andrade TAM, Caetano GF, Guimaraes FR, Leite MN, Leite SN, Frade MAC. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. Int J Exp Pathol. 2020; 101(1-2):21–37. doi:10.1111/iep.12346
3. PMCID: PMC7306904. [Wound Healing Assay \(cellbiolabs.com\)](https://www.cellbiolabs.com) dostopano: 11.6.2025
4. <https://www.iprasense.com/migration-assay/> dostopano: 11.6.2025

IZVEDBA VAJE - POSTOPEK

Na vaji bomo izvedli test preraščanja vrzeli, ustvarjene s praskanjem (angl. *scratch assay*). Uporabili bomo enoslojno celičnih kulturo človeške keratinocitne celične linije HaCat in test celjenja ran z uporabo rekonstruiranih celičnih modelov EpidermFT.

Za izvedbo vaje bomo uporabili laboratorijsko opremo, material in reagente, ki so navedeni na sliki 5.



Slika 5: Laboratorijska oprema, materiali in reagenti, ki jih potrebujemo za izvedbo vaje.

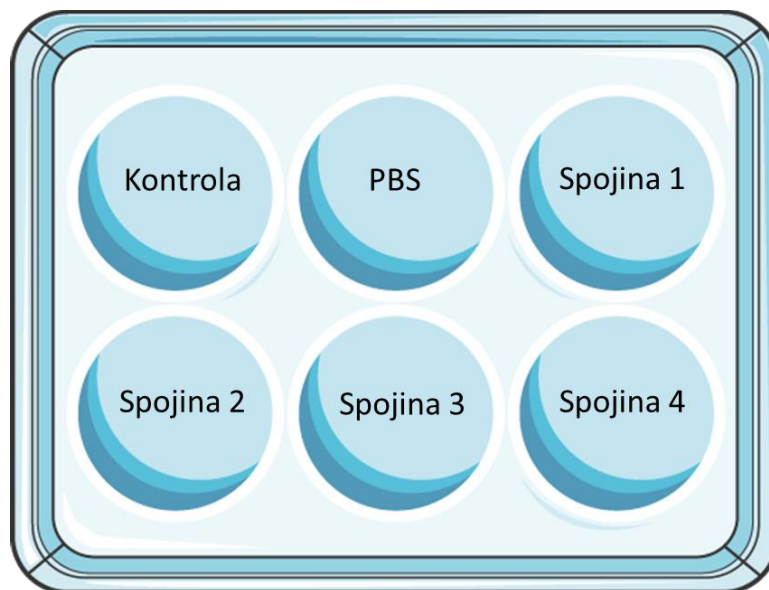
1. TEST CELJENJA RAN OZ. PRERAŠČANJA VRZELI USTVARJENE S PRASKANJEM

Človeške keratinocite (celična linija HaCaT) smo predhodno že prenesli v vdolbine plošče s 6-vdolbinami in inkubirali preko noči v celičnem inkubatorju, da se celice pritrdijo. Z invertnim svetlobnim mikroskopom preverimo, ali so celice enakomerno razporejene po rastni površini.

V primeru idealne konfluentnosti oz. preraščenosti celic (90-100%), s konico pipete s praskanjem ustvarimo vrzel tako, da konico pipetnega nastavka previdno in z občutkom, z enakomernim pritiskom in hitrostjo, brez postanka, povlečemo čez celotni središčni premer vdolbine. Za kreiranje optimalne vrzeli uporabimo pipeto z merilnim območjem od 10 – 200 μ L in nastavek rumene barve.

Z uporabo invertnega svetlobnega mikroskopa preverimo, da so vrzeli vidne na obeh straneh vidnega polja (vrzel naj bo široka približno 0,5 mm). Narejene vrzeli (umetne rane) nato pregledamo na mikroskopu z relativnim objektivom 20x ter zajamemo slike.

Na pokrovu plošče označimo vsebino vdolbin na plošči in vanje nanesimo testirane kozmetično aktivne sestavine. Za negativno kontrolo uporabimo pufer PBS (slika 5).

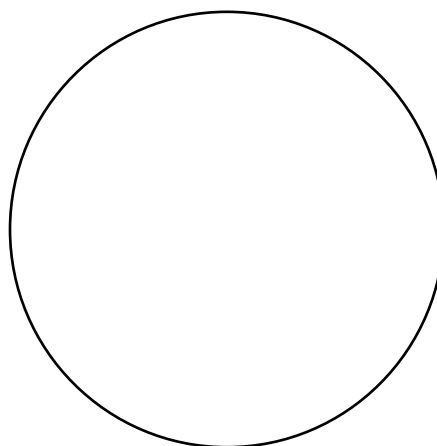
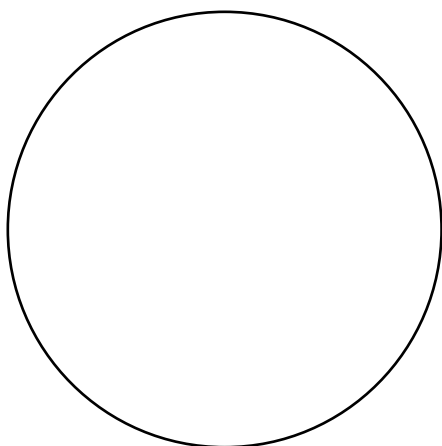


Slika 6: Shema razporeda (oznake na pokrovu) tretiranih enoslojnih kultur človeških keratinocitov z ustvarjenimi vrzelmi.(Slika je bila ustvarjena s programom BioRender.)

Po 24 h vdolbinice pregledamo pod invertnim svetlobnim mikroskopom in zajamemo digitalne slike.

REZULTATI IN KOMENTAR:

1. Skicirajte izgled enoslojne kulture keratinocitov pod mikroskopom, pred in po ustvarjeni vrzeli oz. umetni rani.



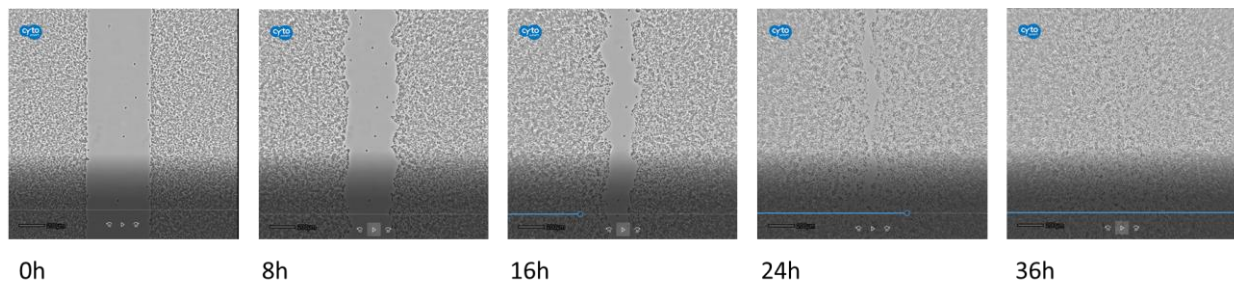
2. Pred prvim zajemom slik, takoj po kreiranju vrzeli, smo pomerili njihovo širino (μm) (0 h). Postopek smo ponovili po 12 h inkubacije (12 h) ter izmerjene vrednosti vnesli v spodnjo preglednico:

	0 h (μm)	12 h (μm)
Kontrola	478	350
PBS	501	368
Spojina 1	485	215
Spojina 2	500	360
Spojina 3	498	160
Spojina 4	487	370

- a) Izračunajte deleže vrzeli v %, ki so jih prerasle oz. zapolnile celice po 12 h.

- b) Katera spojina bi bila najbolj obetavna, da bi jo uporabili v formulaciji kreme za celjenje/ zdravljenje ran?

- Oglejte si video posnetke zapiranja vrzeli (vir: M. Jeras, 2022) v enoslojni kulturi človeške keratinocitne celične linije NCTC 2544. Čas 1 s v časovno pospešenem video posnetku ustreza 1 h. Izmerite vrzel po časovnih točkah: 0h, 8h, 16h, 24h in 36h. Merilo na slikah označuje 200 μ m (Slika 7).



Slika 7: Zapiranje vrzeli v enoslojni celični kulturi človeških keratinocirov. Vir: M. Jeras, 2022

V kateri časovni točki opazite, da se je vrzel popolnoma prerastla?

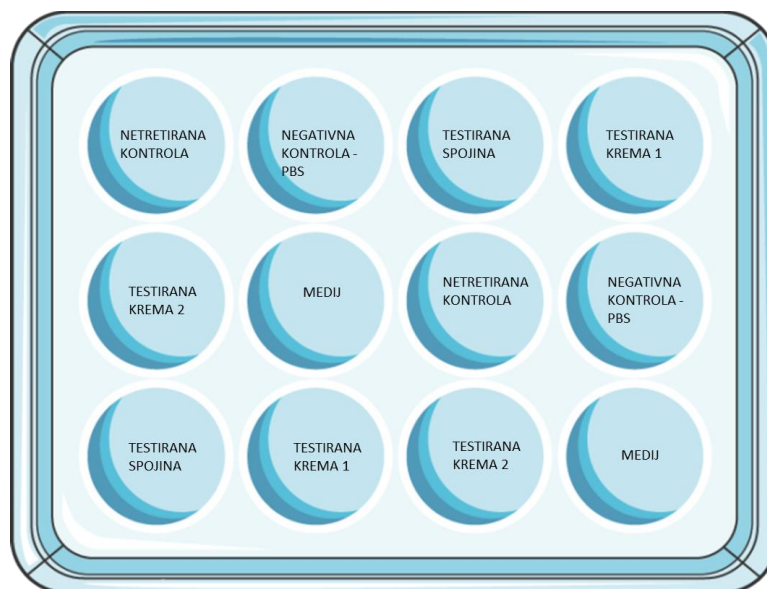
2. TEST CELJENJA UMETNE RANE Z UPORABO REKONSTRUIRANIH 3D EPIDERMALNIH KOŽNIH MODELOV

1.del Pred-inkubacija epidermalnih kožnih modelov

- Po prejemu kompleta epidermalnih kožnih modelov EpiDerm (MatTek) preverimo celovitost vseh njegovih komponent.
- Pripravimo sterilno ploščo z 12 vdolbin, v katero predhodno prenesemo po 600 μ l gojitvenega medija.
- V aseptičnih pogojih odpremo ploščo z 12 vdolbinami, ki vsebuje vstavke z epidermalnimi kožnimi modeli in odstranimo sterilno gazo.
- V naslednjih 5 minutah vizualno preglejmo tkiva v vstavkih. Ne uporabljamo poškodovanih tkiv ali tistih, ki so popolnoma prekrita s tekočino. S sterilno bombažno palčko previdno osušimo površino tkiv v vstavkih. Tkiv se s palčko ne dotikamo neposredno, saj za odstranitev vlage z njihovih površin zadostuje že kapilarni učinek.
- Nato 5 vstavkov/ insertov z osušenimi tkivi prenesemo v zgornji dve vrstici vdolbin na plošči z 12 vdolbinami, v katere ste predhodno dodali po 600 μ l gojitvenega medija (točka 2).
- Odstranimo morebitne zračne mehurčke, ujete pod tkivnimi vstavki.
- Plošče nato postavimo za 5 min v celični inkubator pri standardnih pogojih (37 °C, 5 % CO₂, 95 % relativna vlažnost) in tako izvedemo predinkubacijo.
- Po predinkubaciji so rekonstruirana 3D tkiva EpiDermFT pripravljena za izvedbo nadaljnjih testov.

2 del: Ustvarjanje vrzeli oz. umetnih ran in izpostavitve tkivnih vstavkov kozmetično aktivnim sestavinam, kremam in negativni kontroli

1. Vizualno ocenite nepoškodovanost površin tkiv v vstavkih in s sterilnimi bombažnimi palčkami odstranite vso površinsko vlago.
2. Na pokrovu plošče z 12 vdolbinami označite razpored: netretirana kontrola, negativna kontrola PBS, testirana kozmetično aktivna sestavina 1 (KAS 1), testirana krema 1, testirana krema 2 (slika 8):



Slika 8: Načrt razporeda (oznake na pokrovu) preskušanih kozmetično aktivnih sestavin in krem na 3D epidermalnih tkivih v vstavkih plošče z 12 vdolbinami. Slika je bila ustvarjena s programom BioRender.

3. Na tkivih v vstavkih s skalpelom previdno in z občutkom ustvarimo umetno rano oz. vrzel tako, da nežno zarežemo v tkivo. Ustvarjena rana naj bo plitka, da ne prerežemo spodnje membrane vstavka. Pri ravnanju s skalpelom smo zelo pozorni, da ne poškodujemo sebe ali sošolcev. Pred uporabo skalpela obvezno obvestimo sošolce, da ga bomo uporabljali. Odstranimo zaščitni pokrov skalpela, izvedemo zarezo in rezilo skalpela takoj očistimo in pokrijemo nazaj. Skalpela nikoli ne puščamo nezaščenega na laboratorijskem pultu.
4. Nato v ustrezne vdolbine s tkivom, skladno z oznakami (slika 6), naneseemo negativno kontrolo (PBS), testirano kozmetično aktivno sestavino v tekoči obliki in testirani kremi.
 - Za testiranje tekočih spojin naneseemo po 30 μ L raztopine neposredno na tkivo. Ne pritiskamo na površino tkiva.
 - Po potrebi nežno razporedimo kremo, da čim bolj pokrijete celotno površino tkiva.
5. Ploščo postavimo za 5 minut v celični inkubator pri standardnih pogojih.
6. Po inkubaciji vzamemo ploščo iz inkubatorja in začnemo s postopkom spiranja s sterilnim PBS. Vsak tkivni vstavek 10-krat napolnimo do vrha pod stalnim tokom PBS in

ga vsakič izpraznimo. Po 10. izpiranju vsak vstavek s tkivom 3x popolnoma potopimo v 150 mL PBS in nežno pretresemo, da odstranimo preostanek testiranih snovi.

7. Na koncu tkivne vstavke še enkrat speremo od znotraj in enkrat od zunaj s sterilnim PBS.
8. Morebitni presežek PBS odstranimo s tkiv tako, da vstavke nežno stresemo na sterilni filter papir.
9. Nato tkivne vstavke s pinceto prenesemo v spodnji dve vrstici vdolbinic na novi sterilni plošči z 12 vdolbinicami, v katere smo predhodno odpipetirali po 600 μ L gojitvenega medija.
10. Medij v zgornjih dveh vrsticah shranimo za nadaljnjo analizo citokinov.
11. Vstavke inkubiramo v celičnem inkubatorju in v določenih časovnih intervalih pod svetlobnim mikroskopom spremljajte postopno zmanjševanje/ zapiranje umetne rane oz. vrzeli.

REZULTATI IN KOMENTAR

1. Opis materiala in aparatur:

2. Rezultati meritev in izračun:

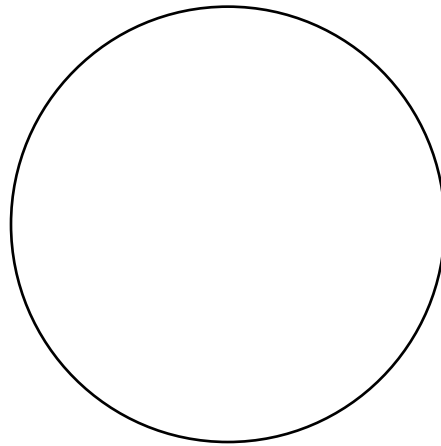
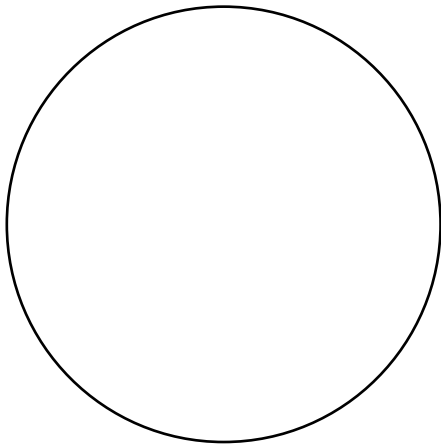
Izračunajte koncentracijo pozitivne kontrole – raztopine dekspantenola

Pripravili bomo 5% raztopino dekspantenola, ki jo nato bomo 30 μL nanegli na 3D kožni model kot pozitivno kontrolo. Uporabite priporočeno koncentracijo deksapantenola za zdravljenje ran. Na voljo imamo 15% (w/v) osnovno raztopino dekspantenola. 5% (w/v) pomeni 5 g učinkovine v 100 mL raztopine.

a) Izračunajte, koliko μL 15% osnovne raztopine dekspantenola potrebujete, da pripravite 30 μL 5% raztopine.

b) Izračunajte, koliko μL topila (sterilne vode) morate dodati, da boste pripravili želeni volumen in koncentracijo raztopine deksapantenola.

3. Skicirajte videz tkiva v vstavku/ insertu pred in po ustvaritvi umetne rane oz. vrzeli:



4. Komentar rezultatov:

Datum:
Pregledal/a:

Stran za zapiske

Stran za zapiske