

Experimentele bepaling van de permeabiliteit van rattenhuid

Citation for published version (APA):

Breebaart, D. J. (1995). *Experimentele bepaling van de permeabiliteit van rattenhuid*. (DCT rapporten; Vol. 1995.183). Technische Universiteit Eindhoven.

Document status and date:

Gepubliceerd: 01/01/1995

Document Version:

Uitgevers PDF, ook bekend als Version of Record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.tue.nl/taverne

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

openaccess@tue.nl

providing details and we will investigate your claim.

Experimentele bepaling van de Permeabiliteit van rattenhuid

door D.J. Breebaart

December 1995

WFW-rapport 95.183

Begeleiders:

ir. P.M. van Kemenade

dr. ir. P.H.M. Bovendeerd

Vakgroep Fundamentele Werktuigbouwkunde

Faculteit werktuigbouwkunde

Technische Universiteit Eindhoven

Verslag van een experimentele stage

Samenvatting

Binnen het promotie project 'huid en omgeving' wordt onderzoek verricht naar het transport van water en ionen in de normale en de beschadigde huid. Ter beschrijving van het watertransport is de zogenaamde permeabiliteit van belang. Deze materiaalparameter beschrijft de verhouding tussen een aangelegde drukgradiënt en de daaruit resulterende waterflux.

Ter bepaling van de permeabiliteit is een opstelling ontworpen door Timmermans [26]. Het doel van deze stage was het bepalen van de permeabiliteit van huid van de rat met behulp van deze opstelling.

Eerst is gekeken naar 'de' gemiddelde permeabiliteit van de huid. Bij het meten is gekeken naar spreiding tussen verschillende preparaten, richtingafhankelijkheid en drukafhankelijkheid. Vervolgens is onderzocht wat de invloed is van het beschadigen van de huid, door het verwijderen van de buitenste laag van de epidermis, het stratum corneum.

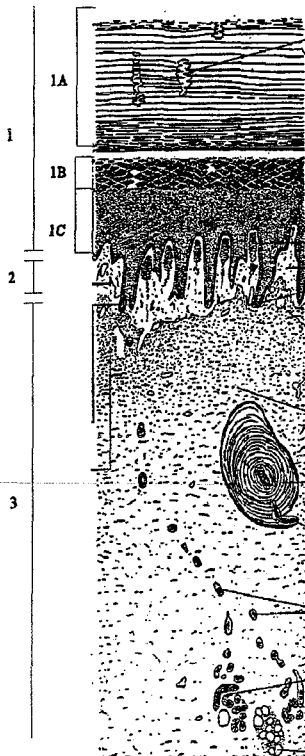
Tenslotte is een schatting gemaakt voor de stijfheid van de huid.

Inhoudsopgave

Samenvatting	2
1. Inleiding	5
1.1 Anatomie van de huid	5
1.1.1 Epidermis	5
2. Poreuze media	6
2.1 Permeabiliteit	6
2.2 De permeabiliteit van biologisch weefsel	6
2.3 Consolidatie theorie van Terzaghi	8
2.4 Mengseltheorie	9
2.5 Meerlagige systemen	9
3. Experimentele opzet	10
3.1 Opstelling	10
3.2 Materiaal	10
3.3 Meetprotocol	11
3.4 Verwerking van resultaten	12
4. Resultaten	13
4.1 Inleiding	13
4.2 Permeabiliteit bij lage drukgradiënten	13
4.2 Hogere drukgradiënten	14
4.2.1 Permeabiliteit & compressie-modulus	14
4.2.2 Richtingsafhankelijkheid binnen één preparaat	14
4.2.3 Drukafhankelijkheid binnen één preparaat	16
4.2.4 Invloed van de opstelling op de meetgegevens	16
5. Discussie en Conclusies	17
5.1 Permeabiliteit en compressiemodulus	17
5.2 Significantie van invloedsfactoren	17
5.2.1 Scheren	18
5.2.2 Verwijderen van het stratum corneum	18
5.2.3 Richtingsafhankelijkheid	19
5.2.4 Invloed van de drukgradiënt	19
5.2.5 Trillingsgevoeligheid	20
6. Aanbevelingen	21
Referenties	22

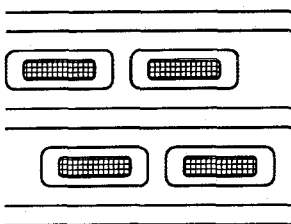
Appendix A	24
Statistiek	24
A.1 Lineaire regressie	24
A.2 Correlatie coefficient	25
A.3 Variantie	25
A.4 Foutenvoortplanting	25
A.5 Variantie-analyse	26
Appendix B	27
Praktische aspecten	27
B.1 Algemeen	27
B.2 Aanbrengen van het preparaat	27
B.3 Automatische opslag van meetgegevens	28
Appendix C	29
Anatomie van de huid	29
C.1 Epidermis	29
C.2 Basale membraan	29
C.3 Dermis	29

I. Inleiding



Afbeelding 1 - Doorsnede van de bovenste lagen van de huid van de vinger [7].

- 1: epidermis
- 1a: stratum corneum
- 1b: stratum granulosum
- 1c: stratum spinosum
- 2: basale membraan
- 3: dermis



Afbeelding 2 - twee compartimentensysteem voor het stratum corneum [9].

I.1 Anatomie van de huid

Een van de belangrijkste functies van de huid is bescherming. Tegen micro-organismen, afkoeling, maar ook tegen uitdroging. Daarom is de huid zeer impermeabel. Deze impermeabiliteit wordt veroorzaakt door de afwezigheid van gespecialiseerde transportsystemen, en de structuur van de bovenste laag van de hypodermis [14].

De huid bezit een relatief complexe structuur: zij bestaat grofweg uit 4 grote compartimenten:

1. epidermis of opperhuid
2. basale membraan of grenslaag epidermis/dermis
3. dermis of lederhuid of cutis
4. hypodermis of onderhuids vetweefsel of subcutis

De compartimenten één tot en met drie zijn weergegeven in afbeelding 1. Een uitgebreidere beschrijving van de huid is opgenomen in appendix C.

I.1.1 Epidermis

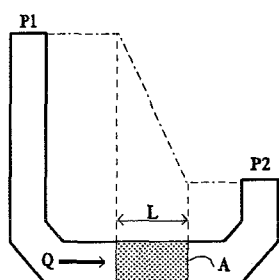
De epidermis speelt een belangrijke rol in de mechanische bescherming. De hoornlaag met de daarop liggende hydro-lipide film, welke afgescheiden wordt door talgklieren, zorgt dat uitdroging voorkomen wordt. Deze lipidelaag is dus een belangrijke waterbarrière. Het verwijderen van deze vetlaag leidt tot een belangrijke verhoging van de permeabiliteit [11]. Behandeling van het stratum corneum met vetoplosmiddelen levert een waterflux op in vivo die bijna gelijk is aan de situatie waarin het stratum corneum verwijderd is. De intacte huid heeft een waterverlies wat in de grootte orde ligt van $10 \text{ [g m}^{-2} \text{ h}^{-1}]$, wanneer de huid is gestript loopt dit op tot ongeveer $140 \text{ [g m}^{-2} \text{ h}^{-1}]$ [22], [4].

De lipide-barrière bestaat uit meerdere lipide-dubbellagen in de intercellulaire ruimte. Deze vetmatrix voorkomt zowel waterflux door de cellen (transcellulair) als waterflux tussen de cellen door (paracellulair). Een veel gebruikte schematische weergave voor het stratum corneum is het zogenaamde twee compartimenten systeem (brick and mortar model): dit bestaat uit cellen (keratinocyten) verrijkt met proteïnen ingebed in een lipide intercellulaire matrix [9]. Dit model is weergegeven in afbeelding 2.

De lipidesamenstelling van het menselijke stratum corneum varieert sterk, tevens is er een variatie in dikte van de huid. Er bestaat wel een inverse relatie tussen het massapercentage lipiden in het stratum corneum en de permeabiliteit [24].

2. Poreuze media

2.1 Permeabiliteit



Afbeelding 3 - Experiment van Darcy

De permeabiliteit van een materiaal is een maat voor de weerstand tegen doorstroming van een vloeistof, en is afhankelijk van het materiaal en van de vloeistof.

Vorige eeuw heeft Darcy een aantal proeven uitgevoerd met betrekking tot de doorlaatbaarheid of permeabiliteit van zandbedden. De proef bestond uit het onderwerpen van met water verzadigde cilindervormige zandmonsters aan een constante drukgradiënt en het debiet door het monster te meten. Uit deze proeven bleek dat het debiet (Q) evenredig was met de drukgradiënt (p/L) en de dwarsdoorsnede (A) van het monster:

$$Q = \frac{K(p_1 - p_2)A}{L} \quad (1)$$

De evenredigheidsconstante K noemt men de permeabiliteit. Uit experimenten blijkt dat de wet van Darcy redelijk opgaat voor vele biologische weefsels [3].

2.2 De permeabiliteit van biologisch weefsel

De huid vormt een belangrijke waterbarriere van het lichaam. Hiervoor is het afsluitende karakter van de epidermis verantwoordelijk, en in het bijzonder het stratum corneum. De weerstand tegen doorstroming van water van de geïsoleerde epidermis is praktisch identiek aan die van de gehele huid [1]. Er zijn drie 'kanalen' waarlangs water door de huid kan diffunderen:

- Kanaalvormige structuren, zoals zweet- en haarkanalen. De invloed van deze kanalen is echter twijfelachtig. Wel is aangetoond, dat haarkanalen, wanneer de haren geplukt zijn, een verhoging van de permeabiliteit veroorzaken [20]. Het oppervlak van dit soort kanalen is slechts klein.
- De intercellulaire ruimte. Deze ruimte omvat circa 0,4% van een oppervlaktelaag van het stratum corneum. De aanwezige glycosaminoglycanen aan de randen van de cellen, welke water binden, vormen een absorptie-kanaal waarlangs water kan diffunderen.
- De cellen zelf. Water kan in en uit de keratinocyten stromen [1].

In dit onderzoek is het experiment van Darcy gebruikt voor het bepalen van de permeabiliteit van huid. In vergelijking met het oorspronkelijke experiment van Darcy, treden er bij het bepalen van de permeabiliteit van biologische weefsels de volgende problemen op.

- Er moet een proefstukje gemaakt worden, hetgeen leidt tot verstoring van de structuur van het weefsel. Tevens is het in het geval van huid zeer moeilijk te bepalen of bij het beschadigen (strippen) het gehele stratum corneum verwijderd is en of de gehele hypodermis is weggeprepareerd.
- In principe worden de eigenschappen van dood materiaal gemeten. Degeneratie van weefsel heeft invloed op de permeabiliteit. De vraag is echter, in welk tijdsbestek deze invloed een rol gaat spelen.
- Biologische materialen hebben vrijwel altijd inhomogene materiaal-eigenschappen. Met het experiment van Darcy is het slechts mogelijk globale (gemiddelde) schattingen te maken van de permeabiliteit de huid.
- Wanneer meerlagige preparaten gebruikt worden, is het moeilijk de dikte van de afzonderlijke lagen te bepalen.
- De temperatuur. Aangezien de viscositeit van een vloeistof afhankelijk is van de temperatuur, is de permeabiliteit ook afhankelijk van de temperatuur. Tevens is de snelheid waarmee weefsel degenereert afhankelijk van de temperatuur.
- De compressibiliteit. Wordt het weefsel gecompriëerd, dan zal de permeabiliteit dalen.
- De aanwezige drukgradiënt. Guyton *et al.* [10] hebben experimenteel aangetoond dat een grotere drukgradiënt zowel een grotere als een kleinere permeabiliteit tot gevolg kan hebben, afhankelijk van het weefsel.
- Uitstroom van proteoglycanen uit het weefsel. Door deze (zeer kleine) uitstroom zal de permeabiliteit enigszins toenemen [17].
- Hydratatie van het stratum corneum. Bij toenemende hydratatie wordt de permeabiliteit groter. De oorzaak hiervan is nog niet precies bekend. Men neemt aan dat er waterachtige kanalen ontstaan waardoor vloeistof beter kan diffunderen [8].
- Zwellgedrag van de huid. Omdat de huid in contact staat met een vloeistof, zal de huid vloeistof opnemen. Dit kan op verschillende manieren invloed uitoefenen op de vloeistofstromen door de huid.

2.3 Consolidatie theorie van Terzaghi

Wanneer op een biologisch materiaal een belasting wordt aangebracht, zal het materiaal op deze belasting reageren. Een inzichtelijke beschrijving van deze respons wordt verkregen door het gedrag van het totale weefsel te beschouwen als de som van de afzonderlijke componenten, waaruit het weefsel is opgebouwd, aangevuld met termen die de interactie tussen diverse componenten beschrijven. Het gedrag van de componenten wordt beschreven met behulp van behoudswetten en constitutieve relaties.

In het collegedictaat weefselmechanica [3] is een differentiaalvergelijking afgeleid voor het gedrag van weefsels, welke opgebouwd zijn uit twee fasen: een vaste stof en een vloeistof. Deze vergelijking wordt de consolidatievergelijking van Terzaghi genoemd:

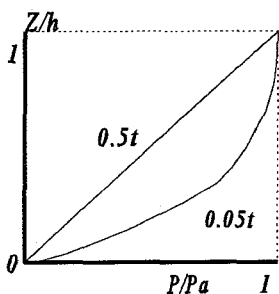
$$\frac{\partial p}{\partial t} - KH \frac{\partial^2 p}{\partial z^2} = 0 \quad (2)$$

Bij dit proces hoort een karakteristieke consolidatietijd t , waarvoor geldt:

$$\Delta t = \frac{(\Delta z)^2}{KH} \quad (3)$$

Voor het geval aan een weefsel een vloeistofdruk wordt opgelegd voor $z=h$ en het weefsel wordt ondersteund op $z=0$, zijn de randvoorwaarden voor vgl. (2):

$$\begin{aligned} p(z=0,t) &= 0 & u(z=0,t) &= 0 \\ p(z=h,t) &= p_a & \frac{\partial u}{\partial z}(z=h,t) &= 0 \end{aligned} \quad (4)$$



Afbeelding 4 - Genormeerde druk als functie van z en t , oplossing naar Harrison [12].

Experimenten van Harrison [12] geven de theoretische oplossing voor de drukgradiënt als in afbeelding 4. Hieruit volgt, dat pas na een bepaalde karakteristieke tijd t een stabiele situatie ontstaat. Tot die tijd geldt dat de drukgradiënt een monotoon dalend verloop heeft, en dus het debiet q via de Darcy vergelijking afhankelijk is van de coördinaat z . Dit veroorzaakt een vloeistofuitstroom bij $z=0$, waardoor in beginsel een hogere permeabiliteit wordt gemeten dan wanneer een stabiele situatie is ontstaan.

2.4 Mengseltheorie

De weefselsamenstelling van biologische weefsels geeft aanleiding tot een respons op zowel mechanische als chemische belasting. Bij het beschrijven van de respons worden de samengestelde componenten gegroepeerd. Er wordt onderscheid gemaakt tussen drie componenten:

- Vaste stof
- Water
- Ionen

Uit de literatuur [21] blijkt, dat de deformatie een functie is van z , en zoals bij de consolidatietheorie van Terzaghi duidelijk werd, tevens een functie van t . Een en ander heeft tot gevolg, dat de permeabiliteit K afhankelijk is van de coördinaat z , daar K afhankelijk van de deformatie is.

2.5 Meerlagige systemen

Voor meerlagige systemen waarbij de lagen verschillende permeabiliteit hebben, kan de gemiddelde permeabiliteit eenvoudig berekend worden. Stel een proefstuk bestaat uit twee homogene lagen met verschillende dikte en permeabiliteit. Voor beide lagen afzonderlijk geldt dan de Darcy-vergelijking (1). Echter, het debiet door beide lagen is in een stabiele situatie gelijk, dus geldt:

$$q = q_1 = q_2 = -K_1 \frac{\Delta p_1}{\Delta z_1} = -K_2 \frac{\Delta p_2}{\Delta z_2} \quad (5)$$

De totale drukval over het systeem is gelijk aan de som van de diskrete delen. Uit (16) en (4) volgt dan de gemiddelde permeabiliteit van het systeem:

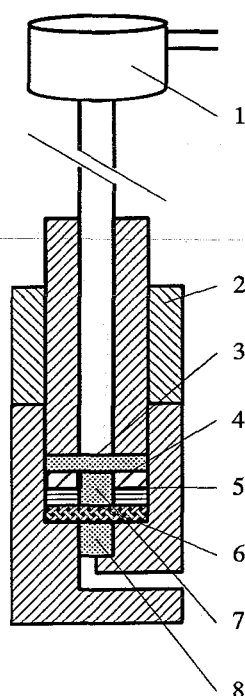
$$\frac{\Delta z}{K} = \frac{\Delta z_1}{K_1} + \frac{\Delta z_2}{K_2} + \dots \quad (6)$$

3. Experimentele opzet

3.1 Opstelling

Ter bepaling van de permeabiliteit van de huid is een opstelling gebruikt zoals ontworpen door Timmermans [26]. Deze bestaat uit een cilinder, waarin tussen glasfilters een drukgradiënt kan worden opgelegd op een huidpreparaat, zie afbeelding 5. De drukgradiënt wordt opgelegd door een vloeistofkolom, met een fysiologische zoutoplossing (0.15 M NaCl).

Aan de ene zijde van het proefstuk bevindt zich een voorraadvat met vloeistof, waarvan de hoogte instelbaar is, zodat verschillende drukgradiënten kunnen worden opgelegd. Aan de andere zijde van het proefstuk wordt de doorgelaten vloeistof afgevoerd naar een Mettler precisie-balans, die de massastroom meet. Deze balans is met behulp van een data-interface verbonden aan een PC, die de meetgegevens opslaat.



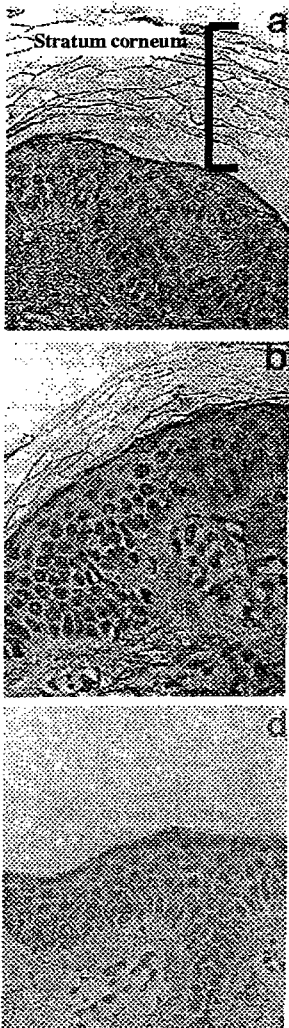
Afbeelding 5 - Schematische voorstelling van de experimentele opzet. (1) voorraadvat, (2) K-meter, (3) glasfilter, (4) afdichtring, (5) o-ring, (6) preparaat, (7) glasfilter, (8) glasfilter.

De gebruikte glasfilters hebben poriën ter grootte van 100 - 160 [μm]. De permeabiliteit van deze filters is dusdanig hoog, dat de weerstand tegen waterdoorstroming te verwaarlozen is ten opzichte van de weerstand van de proefstukjes.

Door de hoogte van de vloeistofkolom te variëren, kan een drukgradiënt opgelegd worden van ca. 7 [MPa/m] tot 14 [MPa/m]. Om de druk nog verder op te voeren, wordt gebruik gemaakt van perslucht. Hiermee kan een drukgradiënt van maximaal 100 [MPa/m] worden bereikt.

3.2 Materiaal

Voor de bepaling van de permeabiliteit zijn proefstukjes van mannelijke Lewisratten gebruikt. Bij het prepareren zijn eerst haren verwijderd door deze weg te knippen, zoals aanbevolen door Michielsen [21]. Bij enkele proefstukjes wordt vervolgens het stratum corneum verwijderd, door Scotch tape op de huid te plakken en te verwijderen totdat de huid begint te glimmen. Histologisch onderzoek heeft aangetoond dat deze glimmende laag het stratum granulosum is [22], zie afbeelding 6,7 en 8. Bij enkele te strippen preparaten zijn de haren verwijderd door deze weg te scheren. Hierdoor werd het strippen van de huid aanzienlijk eenvoudiger, omdat de tape beter hecht op de huid.



Afbeelding 6, 7 en 8 -
Doorsnede van de huid
voor (a), na 10 maal
strippen (b) en na 100
maal strippen (d). [22]

Het aantal malen dat gestript moet worden is afhankelijk van de tape die wordt gebruikt en van het preparaat, en varieert ruwweg van 30 tot 100 maal om het stratum corneum van de menselijke huid volledig te verwijderen.

Vervolgens wordt een o-ring met een binnendiameter van 1 cm op de huid geplakt, zodat de natuurlijke voorspanning van het materiaal behouden blijft. Daarna wordt het proefstukje uitgesneden, en wordt de hypodermis zo veel mogelijk verwijderd. Tenslotte worden de proefstukjes diepgevroren in isopentaan en opgeslagen in een vriezer bij -30 [°C]. Uit de literatuur [13] blijkt dat dit proces geen invloed heeft op de permeabiliteit van de huid.

3.3 Meetprotocol

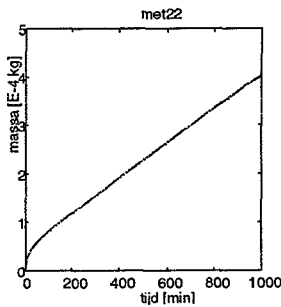
Ten eerste is de massa en het effectieve oppervlak van het proefstuk bepaald. Na het ontdooien is de (gemiddelde) dikte van het proefstuk bepaald, door twee met fysiologische vloeistof doordrenkte glasfilters op beide kanten van het preparaat te plaatsen en vervolgens met een schuifmaat de afstand tussen de glasfilters te bepalen. Vervolgens is het proefstuk tussen de glasfilters in de permeabiliteitsmeter geplaatst. Daarna wordt de druk aangebracht door de kraantjes in aan- en afvoerslangen te openen.

De PC meet gedurende 20 uur elke minuut de massa van het afvoerbakje op de balans. Tijdens het meten kan de druk gevarieerd worden, zodat drukafhankelijkheid getest kan worden. Tenslotte wordt het proefstukje weer uit de opstelling gehaald en nogmaals gewogen. De richting van de drukgradiënt wordt bij verschillende experimenten afgewisseld, en er worden verschillende drukniveau's gebruikt om drukafhankelijkheid te testen.

De metingen zijn verricht in een ruimte met continue lucht-afzuiging bij een temperatuur van 20.5 ± 1 [°C], atmosferische druk en een luchtvochtigheid variërend van 65-75%. Zie ook appendix B.

Ten eerste is bepaald hoeveel vloeistof verdampt en hoe lang het duurt voordat de plastic slangetjes na het aansluiten van de opstelling geen invloed meer hebben op het meetresultaat. Hieruit bleek, dat het vastplakken van de slangen op de tafel zeer effectief is. Vooral wanneer dit op verschillende plaatsen tussen de permeabiliteitsmeter en de balans gebeurt, eventueel met gebruik van een standaard of klemmetje. De tijd waarin het systeem stabiel wordt is dan veel kleiner dan de duur van het inschakelverschijnsel van de meting. Verdamping bleek geen rol te spelen, mits alle kanalen luchtdicht afgesloten zijn. In een periode van 20 uur verdampte er minder dan het kleinste schaaldeel van de Mettler-balans, dus minder dan 0.1 mg.

3.4 Verwerking van resultaten



Afbeelding 9 - karakteristiek resultaat van de meetgegevens.

Een karakteristiek resultaat van een meting is gegeven in afbeelding 9. Na een inschakelverschijnsel is er een lineair verband tussen de massa van de vloeistof op de balans en de tijd.

Uit de meetresultaten wordt met behulp van lineaire regressie (appendix A.1) de hoeveelheid doorgestroomde massa per tijdseenheid bepaald. Uit dit debiet wordt met behulp van de Darcy vergelijking de permeabiliteit bepaald volgens:

$$K = \frac{Q_m \Delta z}{\rho p A} \quad (7)$$

Hierin is Q het berekende massadebiet uit de meetpunten, Δz de (gemiddelde) dikte van het proefstukje, ρ de dichtheid van de vloeistof, g de gravitatieconstante, p de aangebrachte vloeistofdruk en A de oppervlakte van het proefstukje.

Bij metingen aan tweelagige systemen kan met behulp van vergelijking (18) de permeabiliteit van afzonderlijke delen berekend worden, mits de dikte van de afzonderlijke lagen bekend is, en de permeabiliteit van één van de beide lagen. De variantie van K volgt uit standaardformules voor foutenvoortplanting zoals beschreven in appendix A.4.

Enige praktische aspecten van het meten zijn opgenomen in appendix B. Nadat uit het lineaire stuk de permeabiliteit K bepaald is, kan met behulp van de vergelijking voor de karakteristieke consolidatietijd (3) uit de duur van het inschakelverschijnsel een schatting gemaakt worden voor de compressiemodulus H van het materiaal:

$$H = \frac{(\Delta z)^2}{K \Delta t} \quad (8)$$

De duur van het inschakelverschijnsel wordt als volgt bepaald. Eerst wordt een lineaire regressie uitgevoerd op een deel van de meting, waar zeker een lineair verband tussen massa en tijd is. De regressievergelijking wordt vervolgens van alle meetpunten afgetrokken. Uit een grafiek, waarin dit verschil uitgezet is als functie van de tijd, kan de duur van het inschakelverschijnsel eenvoudig worden afgelezen.

4. Resultaten

4.1 Inleiding

In dit hoofdstuk worden de resultaten van de uitgevoerde metingen gepresenteerd. In hoofdstuk 5 zullen deze resultaten nader worden geanalyseerd, waarna in hoofdstuk 6 enige aanbevelingen volgen die de inrichting van de experimenten betreffen.

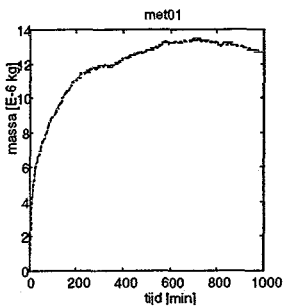
4.2 Permeabiliteit bij lage drukgradiënten

Bij de eerste serie metingen is slechts gebruik gemaakt van druk die veroorzaakt wordt door de vloeistofkolom boven de glasfilters. Alle metingen gaven bij drukken variërend van 8000 tot 13000 [Pa] (grootteorde van de drukgradiënt 1 [MPa/m]) ongeveer hetzelfde verloop van de massastroom door het materiaal per tijdseenheid.

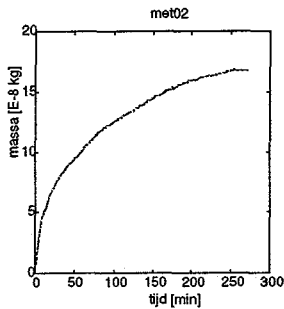
In eerste instantie vindt een zeer grote doorstroming plaats, die langzamerhand minder wordt en tenslotte reduceert tot nul (zie afbeelding 11). Bij sommige preparaten vindt daarna terugstroming plaats (zie afbeelding 10). Er is geen lineair verband tussen tijd en massa, het debiet bereikt nooit een constant niveau. Het is dan ook niet mogelijk de permeabiliteit te bepalen.

Dit gebeurt zowel bij intacte als gestripte huid en in beide richtingen van de drukgradiënt. De gestripte preparaten zijn hier slechts 30 maal gestript, waardoor vrijwel zeker nog een deel van het stratum corneum aanwezig is [22].

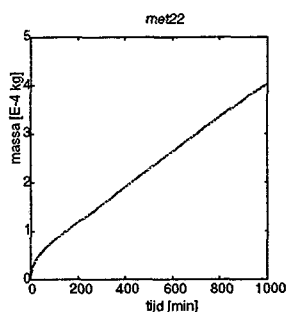
Na de meting kunnen met het blote oog veranderingen in de structuur van het preparaat waargenomen worden. Vooral in de meetsectie is de aanvankelijk roze kleur wit geworden.



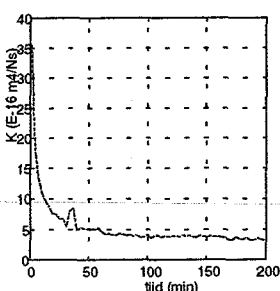
Afbeelding 10 - gemeten massa als functie van de tijd voor preparaat 01.



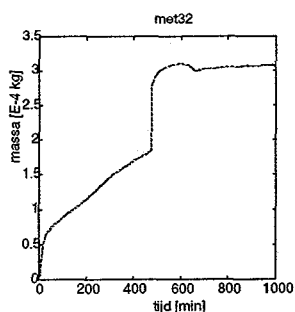
Afbeelding 11 - gemeten massa als functie van de tijd voor preparaat 02.



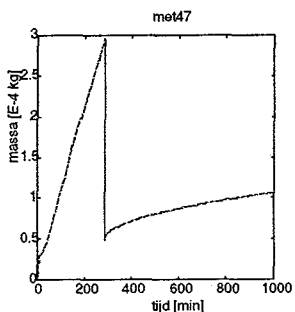
Afbeelding 12 - massa als functie van tijd voor preparaat 22.



Afbeelding 13 - Gemeten permeabiliteit als functie van tijd voor preparaat 22



Afbeelding 14 - invloed van richtingsverandering van de drukgradiënt



Afbeelding 15 - invloed van richtingsverandering van drukgradiënt.

4.2 Hogere drukgradiënten

4.2.1 Permeabiliteit & compressie-modulus

Wanneer met behulp van perslucht een drukgradiënt over het weefsel wordt bereikt in de grootte orde van 100 [MPa/m], ontstaat er wel een lineair verband tussen doorgestroomde massa en tijd. Een representatief verloop hiervan is weergegeven in afbeelding 12.

Van het begin van de meting tot ongeveer 200 minuten (afhankelijk van de dikte) is er sprake van een inschakelverschijnsel. De (schijnbare) permeabiliteit is hier hoger (zie afbeelding 13). Na dit inschakelverschijnsel ontstaat een situatie, waarbij een konstant debiet optreedt. Dit houdt in bijna alle gevallen tot het eind van de meting aan (ca. 17 uur). Met behulp van lineaire regressie (appendix A.1) is het debiet berekend, waaruit via (7) de permeabiliteit volgt. Deze resultaten staan in tabel 1.

Met behulp van de consolidatietheorie van Terzaghi kan een schatting worden gemaakt voor de compressiemodulus H van de vaste stof matrix uit de mengseltheorie. De waarden voor H zijn berekend uit de duur van het inschakelverschijnsel met behulp van vergelijking (8).

De standaardafwijking voor K wordt hoofdzakelijk bepaald door de fout in de meting van de dikte van het proefstuk (zie appendix A.4). Deze is moeilijk te bepalen vanwege het golvende karakter van de huidpreparaten. Bij alle metingen geldt voor de correlatie-coëfficiënt dat $r > 0,998$ (zie appendix A.2).

4.2.2 Richtingsafhankelijkheid binnen één preparaat

Er is een experiment uitgevoerd waarbij de drukgradiënt eerst +93 [Mpa/m] bedroeg, waarna op $t=475$ minuten de druk werd omgedraaid waarbij een drukgradiënt werd opgelegd van -100 [MPa/m]. In de eerste periode ontstaat weer een inschakelverschijnsel, waarna zich een konstant debiet ontwikkelt. Na het omdraaien van de drukgradiënt, waardoor de vloeistof die eerst door het preparaat was gespoeld nu langs de zelfde weg terug moest, stroomde slechts korte tijd enige vloeistof door, waarna de doorstroming stagneerde. Het gemeten tijd-massaprofiel is weergegeven in afbeelding 14. De discontinuïteit in de massa is het gevolg van het achtereenvolgens los en vast maken van aan- en afvoerslangen.

Een soortgelijke druk-cyclus is opgelegd op een ander preparaat. Eerst is een drukgradiënt aangebracht van +54 [MPa/m]. Na het bereiken van een 'steady state' is op $t=287$ minuten, de drukgradiënt van richting veranderd. In afbeelding 15 is de volumestroom als functie van de tijd weergegeven.

Experimentele bepaling van de permeabiliteit van rattenhuid

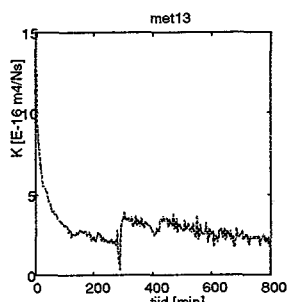
Proefstuk	Strip	Dikte [10^{-3} m]	Druk [10^5 Pa]	K [10^{-16} m ⁴ /Ns]	H [10^5 Pa]
2.1	0	0,75	-1,00	$2,5 \pm 0,3$	2,5
2.2	0	1,1	-1,50	$4,8 \pm 0,5$	2,1
1.1	30	1,0	-1,50	$3,7 \pm 0,4$	***
1.3	30	1,0	-2,00	$2,1 \pm 0,2$	4,7
2.3	0	1,2	-1,00	$8,8 \pm 0,9$	***
3.2	60	0,7	+0,65	$5,5 \pm 0,6$	2,5
3.2	60	0,7	-0,70	$2,5 \pm 0,3$	2,5
3.1	60	0,3	+1,00	$1,0 \pm 0,1$	3,1
3.1	60	0,3	+1,40	$0,8 \pm 0,1$	3,1
3.1	60	0,3	+0,80	$0,8 \pm 0,1$	3,1
4.1	0	2,3	+0,80	$1,8 \pm 0,2$	1,6
4.2	0**	1,6	+0,80	14 ± 1	0,8
4.3	0**	0,8	+0,80	$9,1 \pm 1$	1,2
4.4	0**	2,0	+0,80	11 ± 1	2,2
4.5 *	10**	0,9	+0,80	$1,0 \pm 0,1$	4,2
4.6 *	30**	0,3	+0,50	$0,6 \pm 0,1$	1,2
4.7	60**	1,5	+0,80	32 ± 3	***
4.8 *	100**	0,7	+1,00	$0,6 \pm 0,1$	***

Tabel 1 - Permeabiliteit van preparaten. In de kolom 'strip' is aangegeven hoeveel maal desbetreffend preparaat ongeveer is gestript. In de rechter kolom de compressiemodulus volgens Terzaghi.

(*) Na het meten duidelijk sporen van hypodermis zichtbaar.

(**) Haren zijn verwijderd m.b.v. een scheermes i.p.v. schaar.

(***) Waarde voor H niet te bepalen



Afbeelding 16 - permeabiliteit als functie van de tijd. Drukverlaging op t=290 minuten.

4.2.3 Drukafhankelijkheid binnen één preparaat

Bij proefstuk 13 (30 maal gestript, druk tegengesteld aan in vivo) is voor t=0 tot t=290 minuten een druk opgelegd van 2,0 bar, op t=290 is de druk verlaagd tot 1,0 bar. Afbeelding 16 geeft het gemeten verband tussen massa en tijd. Op het interval t=200 tot t=290 minuten, dus na het inschakelverschijnsel en voor de drukverlaging, is door regressie K berekend: $K = (2,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-16} \text{ [m}^4/\text{Ns}]$. Na het verlagen van de druk volgt weer een inloopverschijnsel, hierbij loopt het debiet langzaam terug. De permeabiliteit loopt dan terug in ongeveer 400 minuten tot een waarde van $K = (2,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-16} \text{ [m}^4/\text{Ns}]$.

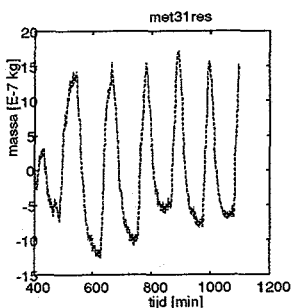
Bij preparaat 31 (60 maal gestript) is een drukbelastingsprofiel opgelegd. Op t=0 is een druk aangebracht van 0,5 bar. Op t=95 is deze verhoogd tot 1,0 bar, op t=195 naar p=1,4 bar. Van t=308 tot t=371 is er geen druk opgelegd, waarna op t=371 een druk is opgelegd van 0,8 bar.

Op alle trajecten volgde na een inloopverschijnsel, dat steeds minder sterk aanwezig was, een permeabiliteit van $(0,8 \pm 0,1) \cdot 10^{-16} \text{ [m}^4/\text{Ns}]$.

4.2.4 Invloed van de opstelling op de meetgegevens

Opmerkelijk is het massaresidu na een lineaire fit, zoals weergegeven in afbeelding 17. Hier is voor t=400 tot t=1200 het residu geplott van meting 31. Er treedt een repetitief verschijnsel op met een duur van ca. 111 minuten. Dit patroon is bij praktisch alle gedane metingen herkenbaar.

Het vloeistofreservoir op de balans staat via een plastic slang met de vaste wereld in verbinding. Door deze verbinding is het mogelijk dat de veerkracht van de slang invloed uitoefent op de gemeten massa. Om deze invloed te kunnen schatten, is de massa van enige voorwerpen gemeten zonder en met slang aan de vaste wereld.



Afbeelding 17 - massaresidu als functie van de tijd na een lineaire fit.

Massa los [g]	Massa vast [g]	Relatieve afwijking [%]
0,3382	0,3379	0,08 %
0,3808	0,3808	0 %
0,4255	0,4254	0,02 %
0,5228	0,5226	0,04 %
2,1435	2,1415	0,09 %
10,0240	10,0189	0,05 %

Tabel 2. Invloed van slangverbinding op gemeten massa.

5. Discussie en Conclusies

5.1 Permeabiliteit en compressiemodulus

De gemeten permeabiliteiten zijn in de orde van 10^{-16} en soms 10^{-15} [m^4/Ns], afhankelijk van een aantal invloedsfactoren, die hieronder besproken worden. De schaarse literatuurwaarden van de permeabiliteit van huid zijn gefit op de orde van 10^{-14} [m^4/Ns], exponentieel afnemend bij deformatie.

Wat betreft de compressie-modulus worden waarden gemeten in de orde van 10^5 [Pa]. Literatuurwaarden voor de stijfheid van de vaste stof matrix bij rekken van ca. 20% variëren van $3 \cdot 10^5$ [Pa] tot $5 \cdot 10^5$ [Pa] [19], [20], [5]. Over het algemeen mag de stijfheid in dit geval gelijk worden gesteld aan de compressie-modulus [16]. Voor het schatten van de stijfheidsmodulus lijkt de consolidatietheorie uit het twee-fasenmodel het gedrag goed te voorspellen. Echter, het gedrag van de huid is complexer; de huid zal gaan zwellen en kan zo de door 'diffusieve drag' veroorzaakte compressie weer te niet doen. Het tijdsbestek waarin dit zwelgedrag optreedt is uit de meetresultaten niet duidelijk.

De gemeten waarden voor de permeabiliteit hebben een onnauwkeurigheid van 10%, die volledig bepaald wordt door de lastige diktemeting van het preparaat. Alle andere factoren, zoals de invloed van de slangverbinding op de balans, onnauwkeurigheden van de gefitte volumestromen, druk, dichtheid van de vloeistof en het meetoppervlak zijn hieraan ondergeschikt. De spreiding tussen de preparaten wordt veroorzaakt door plaatselijke verschillen van de huid en de preparatiemethoden.

5.2 Significantie van invloedsfactoren

Door middel van variantie-analyse (appendix a.5) is bepaald in hoeverre de factoren drukgradiënt, -richting, het scheren van de huid en strippen van het stratum corneum significante invloed hebben op de permeabiliteit. De resultaten staan in onderstaande tabel. Het significantieniveau duidt hier op de kans, dat de hypothese (een invloedsfactor heeft een significante invloed) als waar beschouwd wordt, terwijl deze niet waar is.

Factor	Vrijheidsgraden	F-ratio	Sign. Niveau
Drukgradiënt	5	1.664	0.2386
Scheren	1	3.326	0.1015
Strippen	3	0.871	0.4911
Richting	1	2.268	0.1663

Tabel 3. Significantieniveau van verschillende factoren voor metingen bij hoge drukgradiënten.

5.2.1 Scheren

Het scheren van de huid heeft het grootste effect op de permeabiliteit. Dit verschijnsel kan worden verklaard door aan te nemen, dat tijdens het scheren haren worden meegetrokken, waardoor kanalen ontstaan waardoor vloeistof kan stromen, wat zorgt voor een grotere permeabiliteit ($K=(4,5\pm 3,0)\cdot 10^{-16}$ [m⁴/Ns] tegenover $K=(17\pm 10)\cdot 10^{-16}$ [m⁴/Ns] voor geschoren preparaten, $p=0.1$). Het effect van het uittrekken van haren is ook aangetoond door Michiels [21]. Mogelijk wordt de huid bij het scheren ook beschadigd. Het is daarom raadzaam bij het prepareren niet te scheren, maar de haren weg te knippen.

5.2.2 Verwijderen van het stratum corneum

Het verwijderen van het stratum corneum heeft in dit onderzoek geen invloed op de permeabiliteit ($p=0.5$). Dit in tegenstelling tot de algemene aanname, dat het stratum corneum als een van de belangrijkste water-barrières van de huid wordt gezien. Er is een aantal verklaringen mogelijk:

1. Het stratum corneum is niet geheel weggestript; de achtergebleven laag vormt nog steeds een afsluitende laag. Dit is echter erg onwaarschijnlijk, daar sommige preparaten zo'n 90 maal gestript zijn, zodat het overgrote deel van het stratum corneum verwijderd moet zijn. Bovendien is bij die preparaten duidelijk zichtbaar dat de huid beschadigd is.

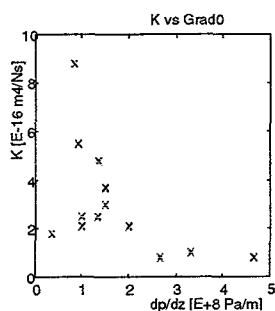
2. Er bevindt zich in het preparaat een andere laag die zeer impermeabel is. Tijdens het wegprepareren van de hypodermis lijkt zich aan de onderzijde van de huid nog een soort vlies te bevinden. Verwijderen van dit vlies is erg lastig. Het is misschien mogelijk dat dit vlies zeer impermeabel is, en dat de gemeten permeabiliteit door dit vlies of door een eventueel achtergebleven laag hypodermis wordt bepaald. Deze stelling wordt nog eens bevestigd door het feit, dat bij enkele preparaten na het meten nog duidelijk restanten van de hypodermis aanwezig zijn. Na het meten is over het algemeen veel duidelijker te zien of er nog een restant van de hypodermis op het preparaat aanwezig is, dan voor het meten. De preparaten die duidelijk sporen vertoonden van een soort vlies, vertoonden een veel lagere permeabiliteit dan vergelijkbare andere preparaten, waarbij dit vlies niet zo duidelijk aanwezig was ($K=(4,5\pm 3,0)\cdot 10^{-16}$ [m^4/Ns] tegenover $K=(0,8\pm 0,2)\cdot 10^{-16}$ [m^4/Ns] voor preparaten met een subcutaan vlies).
3. Het weefsel wordt door de aangebrachte drukgradiënt dusdanig gecompriemd, dat de permeabiliteit lager wordt, zodat het stratum corneum niet meer de bepalende factor is voor de gemiddelde permeabiliteit. Dit is echter onwaarschijnlijk, daar de huid volgens het 2-fasenmodel een rek zou moeten hebben van ongeveer 20%. Voor biologische weefsels zijn dit vrij kleine rekken. Bovendien is het gedrag van de huid complexer: de huid zal gaan zwellen en zo de onstane compressie weer teniet doen.

5.2.3 Richtingsafhankelijkheid

Wat betreft de richtingafhankelijkheid kan het volgende geconcludeerd worden. Volgens de variantie-analyse van tabel 3 is er een kleine richtingsafhankelijkheid wat de permeabiliteit betreft ($p=0.16$). De permeabiliteit is enigszins hoger wanneer de vloeistofstroom in de richting loopt van epidermis-dermis ($K=(4,4\pm 2,7)\cdot 10^{-16}$ [m^4/Ns] tegenover $K=(1,1\pm 0,5)\cdot 10^{-16}$ [m^4/Ns] voor dermis-epidermis richting). Een mogelijke verklaring is opgenomen in 5.2.4.

5.2.4 Invloed van de drukgradiënt

Wat betreft de drukgradiënt moet er een onderscheid gemaakt worden tussen twee effecten. Het blijkt dat de drukgradiënt een bepaalde minimale waarde moet hebben om tijdens het meten een steady-state te bereiken. Wanneer een kleine drukgradiënt wordt aangelegd, zal de volumestroom door het weefsel relatief klein zijn, en raakt het weefsel 'verstopt'. Dit effect overlapt het inschakelverschijnsel, zodat op geen enkel moment een constante volumestroom ontstaat. Deze volumestroom is in die gevallen slechts een fractie van het volume van het proefstukje, de drukgradiënten liggen in de orde van 1 [MPa/m].



Afbeelding 18 -
Permeabiliteit [$10^{-16} \text{ m}^4/\text{Ns}$]
als functie van drukgradiënt
[10^8 Pa/m].

Wanneer een grotere drukgradiënt wordt opgelegd (ca. [100 MPa/m]) treedt wel een steady-state op, die uren aanhoudt. Er is enige correlatie tussen de aangebrachte drukgradiënt en de permeabiliteit: bij een hogere drukgradiënt neemt de permeabiliteit af. Deze trend is weergegeven in afbeelding 18. De verlaging van de permeabiliteit met een verhoging van de drukgradiënt is in de literatuur terug te vinden [23].

Het mechanisme dat bij lage drukgradiënten voor verstopping zorgt zou gezocht kunnen worden in het feit, dat er een noodzakelijke volumestroom door het weefsel noodzakelijk is, om afbraak- en degeneratieproducten uit het weefsel te spoelen, zodat het materiaal niet meer zo snel bederft. Deze stelling wordt door drie waarnemingsfeiten bevestigd. Ten eerste is na het meten de meetsectie van de huid zijn aanvankelijk roze kleur kwijt. Het weefsel is wit, terwijl in de glasfilters soms een lichtbruin tot rode kleur aanwezig is. Dit wijst op uitspoelen van stoffen uit het weefsel. Ten tweede is het praktisch niet mogelijk om vloeistof, welke al eens door de huid is gespoeld, nogmaals door de huid te spoelen. Dit gebeurt bijvoorbeeld, wanneer bij een bepaald experiment een steady-state is bereikt, de drukgradiënt omgedraaid wordt. De doorstroming stagneert dan zeer snel. Ten derde is er de richtingafhankelijkheid van de permeabiliteit, welke veroorzaakt zou kunnen worden doordat mee te spoelen stoffen bij een drukgradiënt van dermis naar epidermis door het dichtgepakte stratum corneum heen moeten, wat een lagere permeabiliteit tot gevolg zou kunnen hebben.

5.2.5 Trillingsgevoeligheid

De opstelling heeft een vrij grote trillingsgevoeligheid, die hoofdzakelijk bepaald wordt doordat bij aanstoten het reservoir op de balans van plaats verandert. Hierdoor wordt ten eerste een andere massa gemeten (het reservoir moet altijd in het midden staan) en wordt de positie van de aanvoerslangen veranderd, waardoor deze opnieuw moeten relaxeren. Om een stabiel systeem te verkrijgen, moeten trillingen voorkomen worden. De relaxatietijd van de slangen kan van ca. 15 uur beperkt worden tot minder dan 1 uur, door deze op meerdere plaatsen op de tafel en op de balans vast te plakken met behulp van Scotch tape.

6. Aanbevelingen

Om beter inzicht te krijgen in de processen en invloedsfactoren die een rol spelen bij de permeabiliteitsmeting is er een aantal aspecten die nader onderzoek vereisen.

- 1 Temperatuur-afhankelijkheid. Het is mogelijk de opstelling in een temperatuur-geconditioneerde ruimte te zetten. Hierdoor kan de invloed van de temperatuur op de permeabiliteit gemeten worden. Het is waarschijnlijk, dat degeneratie-effecten ook afhankelijk zijn van de temperatuur. Het is dan mogelijk meer inzicht te verkrijgen in de degeneratieprocessen en het verband tussen degeneratie en het 'verstopt' raken van het weefsel.
- 2 Grootte van de benodigde drukgradiënt. Er is een minimale drukgradiënt nodig om een steady-state te bereiken. Omdat tot nu toe alleen zeer ruwe grootte-orde bekend zijn, kan het handig zijn deze benodigde gradiënt wat preciezer vast te stellen.
- 3 Effect van strippen. Omdat de tijdens deze stage uitgevoerde metingen geen duidelijke invloed lieten zien van het verwijderen van het stratum corneum, is het raadzaam preparaten te maken waarbij het zeker is, dat restanten van de hypodermis verwijderd zijn of juist zeker nog aanwezig zijn. Er kan dan meer inzicht verkregen worden in de invloed van vetlaagjes en bindweefselsepten.
- 4 Ionenconcentraties. Door vloeistoffen te gebruiken met verschillende osmotische zoutconcentraties kan inzicht verkregen worden in de osmotische effecten die optreden. Eventueel kunnen door het plaatsen van een electrode beide kanten van de huid worden kortgesloten.
- 5 Uitbouwen van goede variantie-analysetabel. Omdat tot nu toe een vaste druk is ingesteld, onafhankelijk van de dikte van het preparaat, komen veel verschillende drukgradiënten voor. Dit heeft tot gevolg dat voor een goede variantie-analyse waarbij meerdere invloedsfactoren worden meegenomen, erg veel preparaten doorgemeten moeten worden. Wanneer de druk aangepast wordt aan de dikte van het weefsel, zodat een serie van vaste drukgradiënten wordt opgelegd, zijn minder vrijheidsgraden nodig om een variantie-analyse uit te voeren.
- 6 Onderzoek van uitgespoelde stoffen. Door de door de huid gespoelde vloeistof nader te onderzoeken bijvoorbeeld met behulp van een gaschromatograaf, kan inzicht verkregen worden in de samenstelling van de uitgespoelde vloeistof. Dit zou beter inzicht kunnen geven in het mechanisme dat voor de verstopping van de huid verantwoordelijk is.

Referenties

- [1] Baker, A. The skin as a barrier. *Textbook of dermatology*. Blackwell scientific publications, 1979.
- [2] Bernards, J.A. & Bouman, L.N. *Fysiologie van de Mens*. Bohn, scheltema & Holkema, 1976.
- [3] Bovendeerd, P.H.M., Huyghe, J.J.R.J. *Weefselmechanica*. Collegedictaat Technische Universiteit Eindhoven, 1994.
- [4] Blank, I.H. Cutaneous barriers. *Journal of investigative dermatology*, 45: 249-256, 1965.
- [5] Brown, . A scanning electron microscopy study of the effects of uniaxial tension of human skin. *Br. J. Derm.* 89: 383-393, 1973.
- [6] Chatfield, C. *Statistics for technology, a course in applied statistics*. Third edition, Chapman & Hall, 1983.
- [7] de Coninck, A. *Cursus Dermato Cosmetische Wetenschappen*. Dienst dermatologie AZ- VUB, 1994.
- [8] Elden, H.R. *Biophysical properties of the skin*. Wiley-Interscience, 1971.
- [9] Elias, P.M. & Menon, G.K. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Advances in lipid research* 24: 1-30, 1991.
- [10] Guyton, A.C., Scheel, K. & Murphree, D. Interstitial fluid pressure III. Its effects on resistance to tissue fluid mobility. *Circulation Research*. 19: 412-419, 1966.
- [11] Hadley, N.F. Integumental lipids of plants and animals: comparative function and biochemistry. *Advances in lipid research* 24: 303-320, 1991.
- [12] Harrison, R.G., Jr *Water flow across the isolated artery wall*. Ph. D. Thesis. University of Wisconsin, 1975
- [13] Harrison, S.M., Barry, B.W., Dugard, P.H. Effects of freezing on human skin permeability. *J. Pharm. Pharmacol.* 36: 261-262, 1984.
- [14] Hibbott, H.W. *Handbook of cosmetic science*. Pergamon Press, 1963.
- [15] Huson, A. *Functionele anatomie*. Dictaat Technische Universiteit Eindhoven, 1993.
- [16] Kenyon, D.E. A Mathematical model of water flux through aortic tissue. *Bulletin of mathematical Biology*. 41: 79-90, 1979.

- [17] Laurent, U.B.G. & Laurent, T.C. On the origin of hyaluronate in blood. *Biochemistry International*. 2: 195-199, 1981.
- [18] Levick, J.R. Flow through interstitium and other fibrous matrices. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*. 72:409-438, 1987.
- [19] Manschot, J.F.M. *The mechanical properties of human skin in vivo*. Proefschrift Katholieke Universiteit Nijmegen, 1985.
- [20] Manschot, J.F.M. & Brakkee, A.J.M. The measurement and modelling of the mechanical properties of human skin in vivo - I: the measurement. *J. Biomechanics* 10:511-515, 1986.
- [21] Michielsen, B. *Experimental determination of skin permeability*. WFW-report 95.035, Technische Universiteit Eindhoven, 1995.
- [22] Ohman, H. & Vahlquist, A. In vivo studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis. *Acta Derm Venereol*. 74: 375-379, 1994.
- [23] Oomens, C.W.J. *A mixture approach to the mechanics of skin and subcutis*. PhD-thesis, Technische Universiteit Twente, 1986.
- [24] Schurer, N.Y. & Elias, P.M. Biochemistry and function of stratum corneum lipids. *Advances in lipid research* 24: 27-51, 1991.
- [25] Swabb, E.A., Wei, J. & Gullino, P.M. Diffusion and convection in normal and neoplastic tissues. *Cancer Research* 34: 2814-2822, 1974.
- [26] Timmermans, B.M. *Herontwerp van een permeabiliteitsmeter*. WFW-report 95.165, Technische universiteit Eindhoven, 1995.

Appendix A

Statistiek

Uit: [6].

A.1 Lineaire regressie

Uit een serie meetresultaten $(x, y)_i$ kan met behulp van de kleinste kwadratenmethode een rechte lijn gefit worden. Een rechte lijn wordt beschreven door de volgende vergelijking:

$$y = a_0 + a_1 x$$

Het verschil tussen de werkelijke waarde y en de gefitte waarde y bij gegeven x :

$$e_i = y_i - (a_0 + a_1 x_i)$$

De kleinste kwadratenschatters voor de parameters a worden bepaald door de kwadratensom S van de fouten e :

$$S = \sum [y_i - (a_0 + a_1 x_i)]^2$$

Deze som kan worden geminimaliseerd door partieel te differentieren naar de parameters a en deze afgeleiden nul te stellen. De schatters voor de parameters a zijn dan:

$$\hat{a}_0 = \bar{y} - \hat{a}_1 \bar{x}$$

$$\hat{a}_1 = \frac{\sum x_i (y_i - \bar{y})}{\sum x_i (x_i - \bar{x})}$$

A.2 Correlatie coefficient

Correlatie coefficient voor een set data (x,y) wordt gegeven door :

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

A.3 Variantie

De standaardafwijking voor de schatting van de helling van de rechte lijn zoals gegeven in A.1, kan berekend worden via:

$$\text{Variantie}(\hat{a}_1) = \frac{\sum (y_i - \hat{a}_0 - \hat{a}_1 x_i)^2}{(n-2) \sum (x_i - \bar{x})^2}$$

A.4 Foutenvoortplanting

Voor de berekening van de variantie van een responsievariabele z, die een functie is van een aantal onafhankelijke gemeten variabelen x, geldt:

$$z = f(x_1, x_2, x_3, \dots)$$

$$\sigma_z^2 = \left(\frac{\partial z}{\partial x_1}\right)^2 \sigma_1^2 + \left(\frac{\partial z}{\partial x_2}\right)^2 \sigma_2^2 + \left(\frac{\partial z}{\partial x_3}\right)^2 \sigma_3^2 + \dots$$

A.5 Variantie-analyse

Variantie-analyse kan gebruikt worden om de hypothese te testen dat er geen verschil is tussen verschillende behandelingen. De totale variantie van de observaties wordt in twee delen opgesplitst: een voor de spreiding van de gemiddelde waarde van een groep, een voor de spreiding tussen groepen. Deze twee componenten worden vervolgens met elkaar vergeleken met een F-test.

De schatting voor de variantie tussen groepen is gegeven door:

$$s^2 = \sum_i \frac{s_i^2}{c} = \sum_i \sum_j \frac{(x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{c(n-1)}$$

met c groepen van n metingen. De variantie van de gemiddelde waarden van de groepen is:

$$s_g^2 = n \sum_i \frac{(\bar{x}_i - \bar{x})^2}{c-1}$$

De verhouding s_g^2/s^2 volgt een F-verdeling met $c-1$ en $c(n-1)$ vrijheidsgraden, wanneer de hypothese waar is. Wanneer de verhouding F groter is dan de waarde van de F-verdeling bij gegeven vrijheidsgraden en bij een gegeven significantieniveau α , moet de hypothese verworpen worden.

Appendix B

Praktische aspecten

B.1 Algemeen

Hier volgen enige praktische tips en aspecten voor het uitvoeren van de metingen. In het algemeen moet goed opgelet worden op luchtbellens in het systeem, deze moeten vermeden worden. Tevens moet bij het inbrengen van het preparaat in de opstelling op een aantal zaken gelet worden, zodat er zo goed mogelijke resultaten gemeten worden.

B.2 Aanbrengen van het preparaat

Eerst moeten de glasfilters die het preparaat moeten ondersteunen op maat geschuurd worden. Hierbij moet er op gelet worden dat deze precies passen, en niet te dik zijn, omdat dit een deformatie van het preparaat-materiaal tot gevolg heeft.

Na het schuren moeten de glasfilters en de opstelling goed schoongemaakt worden met behulp van gedestilleerd water. Daarna de glasfilters doordrenken met fysiologische vloeistof. De opstelling kan nu van onder af gevuld worden. Er mogen geen luchtbellens blijven zitten. Vervolgens kan het onderste glasfilter in de opstelling geplaatst worden. Nu de opstelling tot de bovenste rand vol laten lopen met de fysiologische vloeistof.

Preparaat uit de vriezer halen, en tijdens het ontdooien de binnendiameter van de o-ring waar de huid op geplakt zit met behulp van een schuifmaat opmeten.

Vervolgens het gewicht van het proefstukje bepalen. Wanneer het preparaat ontdooit is, het tussen twee met fysiologische vloeistof doordrenkte glasfilters plaatsen en de afstand tussen de glasfilters opmeten.

De afdichtring kan nu op de o-ring met preparaat gelegd worden, en het geheel moet zonder vorming van luchtbellens, boven in de opstelling worden gelegd. Er moet wel gezorgd worden dat bij het plaatsen van het preparaat aan de onderkant van de opstelling vloeistof uit kan stromen. Dit is erg belangrijk! Is er geen uitstroombmogelijkheid, dan zal de aanwezige druk het proefstuk beschadigen. Hierna kan het bovenste glasfilter geplaatst worden en de opstelling afgesloten worden. Goed opletten dat de afsluitende kraantjes niet lekken.

Zorg ervoor dat de gehele opstelling trillingsvrij staat en dat er niet te veel activiteiten in de directe omgeving plaatsvinden, omdat het systeem daar zeer gevoelig voor is.

B.3 Automatische opslag van meetgegevens

Om lang en nauwkeurig te kunnen meten is het gebruik van een PC erg handig. Deze kan eenvoudig op de Mettler-balans aangesloten worden.

Plaats achter op de Mettler-balans de optionele 012 Data-interface. Deze interface heeft verschillende modi. Om de juiste modus wat data-transmissie betreft te krijgen, moeten enige dip-switches in de interface in de goede stand gezet worden. Schroef de interface open en zet de aanwezige dip-switches 3 en 4 in stand 'out only' respectievelijk 'send continuous'. Zie hiervoor ook de handleiding!

Met behulp van een 25 polige RS-232 kabel kan de balans nu op de seriele poort van de PC worden aangesloten. Softwarematig kan nu de seriele poort geopend worden. Het programma moet wel continu de poort uitlezen, anders zal door het 'send continuous' karakter van de data interface de seriele buffer van de pc overlopen met alle gevolgen van dien.

In het programma wordt vervolgens een guard gebruikt die zorgt dat op het juiste moment de uitlezing wordt opgeslagen in een bestand. Ik heb hiervoor een tijdsinterval van 1 minuut gebruikt. Dit blijkt voor alle metingen ruim voldoende te zijn. Bij een aantal metingen heb ik de PC zo'n 17 uur laten meten. Dit geeft een goed beeld van de tijdsaspecten die een rol spelen.

Appendix C

Anatomie van de huid

C.1 Epidermis

De epidermis is de meest oppervlakkig gelegen laag, welke bestaat uit twee soorten cellen: de keratinocyten en dendritische cellen. De keratinocyten zijn verantwoordelijk voor de synthese van keratine, een proteïne waaruit het stratum corneum bestaat.

De epidermis bestaat uit 4 lagen, van boven naar onder kan onderscheiden worden::

- a. Stratum corneum. De celstructuren zijn onherkenbaar door verhoorning. Deze laag heeft een belangrijke barrière functie tegen toxische stoffen, allergenen en mikro-organismen.
- b. Stratum granulosum. Genoemd naar het voorkomen van dikke korrels in het cytoplasma van de cellen, welke voorlopers zijn van de keratine in het stratum corneum. De cellen zijn afgeplat en evenwijdig gerangschikt.
- c. Stratum spinosum. De intercellulaire brugjes (desmosomen) zorgen voor de celcohesie. De laag bestaat uit een variabel aantal cellagen. De cellen zijn veelhoekig en platten zich af.
- d. Stratum basale. Opgebouwd uit cellen die voortdurend celdelingen ondergaan, waardoor volledige vernieuwing van de epidermis kan optreden.

De keratinevezels in de stevige hoornlaag staan quasi loodrecht op de dermo-epidermale grenslaag, waardoor een skelet gevormd wordt dat de cohesie van de epidermiscellen verzekert. Verder zorgt de hoornlaag met de daarop liggende hydro-lipide film, welke afgescheiden wordt door talgklieren, dat uitdroging voorkomen wordt. Deze lipidelaag is dus een belangrijke waterbarrière.

C.2 Basale membraan

Deze grenslaag verloopt golvend, en is verbonden met de epidermis door de hemidesmosomen en met de dermis door fijne vezeltjes. De laag zorgt voor een stevige binding tussen epidermis en dermis.

C.3 Dermis

Men onderscheidt twee delen, de papillaire dermis en de reticulare dermis. De papillaire dermis ligt direct onder de epidermis en heeft een losse structuur. De reticulare dermis is het breedste en stevigste deel van de dermis, opgebouwd uit dikke collageenbundels en elastinevezels. De vezels liggen in een amorf materiaal, dat de grondstof vormt, en bestaat uit mucopolysacchariden. De collageenvezels zijn het echte steunweefsel van de huid, de elastinevezels zijn verantwoordelijk voor de elasticiteit.