

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové



katedra farmaceutické technologie

Transdermální in vitro permeace terbinafinu. II.

Hana Doubravová

školitel: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Hradec Králové , leden 2006

OBSAH

1. ÚVOD	4
2. CÍL PRÁCE	5
3. TEORETICKÁ ČÁST	6
3.1 Náplast'ová strippingová technika	6
3.1.1 Souhrn podmínek pro provádění strippingové metody	7
3.1.2 Obvyklá doporučení	8
3.1.3 Určení uptake léčiva	10
3.1.4 Určení eliminace léčiv	11
3.2 Terbinafin	18
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
4.1 Použité suroviny	19
4.2 Použitá zařízení	19
4.3 Biologický materiál	20
4.4 Příprava donorových vzorků	20
4.5 Provedení strippingu	21
4.6 Analytická metodika	21
4.7 Stanovení terbinafinu	22
4.8 Zpracování výsledků	23
5. VÝSLEDKY	25
6. KOMENTÁŘ A DISKUSE	30
7. ZÁVĚR	33
8. SOUHRN	34
9. LITERATURA	35

1. ÚVOD

Testování průniku léčiva kožní bariérou a návazně potom často i hodnocení biodostupnosti léčivé látky u topických a transdermálních přípravků je metodicky a především interpretačně obtížné. Platí to pro hodnocení výsledků *in vitro* a zejména v údaje získané v podmínkách *in vivo*, respektive v kinických pokusech.

Dokladem tohoto faktu je vývoj dosavadních doporučení vydávaných v posledních letech americkou FDA, která před deseti lety doporučila k hodnocení průniku léčiv přes kůži metodu založenou na snímání adhezivní pásky (náplastí) nalepené na kůži a hodnocení obsahu zachycených vrstev buněk, tzv. strippingovou metodu. Z diskusního dění kolem této problematiky v dalších letech vzešla nakonec také doporučení k permeačním technikám pro posuzování topické bioekvivalence topických léčiv. K formulaci dostatečně věrohodného rozhodnutí o bioekvivalenci topických přípravků je často potřebná znalost výsledků získaných oběma metodikami.

Předkládaná rigorózní práce představuje v zásadě druhou část studie, která je zaměřena na *in vitro* hodnocení permeace terbinafinu kůží prasečího ucha s návazným orientačním hodnocením případného efektu přídavku permeačního akceleraantu transkarbam 12. V teoretické části doplňuje předcházející diplomovou práci. Svoji náplní práce spadá do širšího výzkumného programu, který již řadu let realizují katedry farmaceutické technologie společně s katedrou anorganické a organické chemie FaF UK v Hradci Králové.

2. CÍL PRÁCE

Úkolem teoretické části práce bylo podat stručný přehled informací o provedení a uplatnění strippingových metod při studiu průniku látek kůží.

Cílem experimentální části práce bylo nalézt pokusný protokol pro provádění permeačních *in vitro* strippingovou technikou tak, aby mohly být použity k následnému srovnávání permeačního potenciálu topických krémů s obsahem terbinafinhydrochloridu.

Dílní úkoly experimentu byly formulovány takto:

2.1 Dopracovat HPLC metodiku kvantifikace terbinafinu v akceptorové fázi vhodné pro *in vitro* hodnocení průniku z topických přípravků

2.2 Provést pilotní penetrační *in vitro* pokusy na kůži z prasečího ucha strippingovou metodou

2.3 Ověřit použitelnost metodiky pro hodnocení průniku terbinafinhydrochloridu a přídavkem transkarbamu 12 z topického krému

3. TEORETICKÁ ČÁST

Bioekvivalence je dokumentována srovnáním nově testovaného přípravku, obvykle generika, s referenčním registrovaným léčivým přípravkem. Podle statě v dokumentu 21 CFR 320.24 pro potvrzení BA/BE jsou požadována:

- 1) farmakokinetická měření založená na měření aktivní látky nebo metabolitů v krvi, plazmě a/nebo v moči
- 2) farmakodynamická měření
- 3) srovnávací klinické zkoušky
- 4) in vitro studie

Pro topické dermatologické léčivé přípravky není měření koncentrací léčiv v krvi, plazmě a/nebo moči vhodné nebo proveditelné.¹

Množství využitelných *in vitro* a *in vivo* experimentálních technik napovídá, že hodnocení topické bioekvivalence nebo topické terapeutické ekvivalence různých přípravků s obsahem stejné léčivé látky není jednoduché. Rovněž kritérium ekvivalence akceptované v rozpětí 80 až 125 %, vhodné pro parenterální přípravky, je sice i pro topické přípravky akceptováno, je v zásadě hodně problematické. Experimentální stanovení příslušných parametrů je totiž vždy zatíženo nezanedbatelnými chybami, vyžaduje testování jejich srovnatelnosti v uvedeném intervalu a tím použití relativně náročnějšího statistického aparátu.²

3.1 Náplast'ová strippingová technika

Technika odstraňování vrstev korneocytů opakovaným postupným použitím adhezivní pásky (tape stripping, TS) dnes patří k nejvíce používaným metodikám při zkoumání procesů probíhajících při penetraci látky kůží a určení množství léčiva v každé vrstvě stratum corneum (SC) epidermis odstraněné páskou a tloušťku SC.^{1,3}

Množství korneocytů odstraněných při snímání lepidla pásky, stripování, se liší interindividuálně i intraindividuálně. Také typ aplikované látky a čas, po který probíhá penetrace má na množství korneocytů zachycených na individuálním stripu vliv.⁴ Bylo vyzkoušeno, že k odstranění většiny SC postačuje užití 30 stripů. Množství odstraněné SC je přímo úměrné počtu stripů, asi 2/3 z plochy pásky je po strippingu těmito buňkami pokryta. Je to dáno výskytem fyziologických rýh a vrásek na kožním povrchu, které významně zmenšují možnost přilnutí všech buněk a následně zkreslují výsledky pokusu. Proto se ke kontrole TS používá světelný mikroskop a skenovací elektronický mikroskop.⁵

TS technika je nástrojem k měření koncentrace léčiva v SC a určení uptake a eliminace léčiva z SC.⁶ Může být také použita k získání mykologických kultur nebo ke zjišťování kvality SC. Obzvláště se hodí ke zkoumání iritantů kůže a alergenů.⁷

TS je možno provádět jako pokus *in vivo* i *in vitro*, ve většině případů se k následnému stanovení léčiva používá metoda HPLC, někdy také ATR-FTIR.⁸

K detekci je také často používána založená na vlastnostech radioaktivně značených složek.⁹

3.1.1 Souhrn podmínek pro provádění strippingové metody

Většina studií je z praktických důvodů zaměřena na předloktí, ačkoli oblast zad, stehna nebo jiné části těla může být pro techniku TS použita také.

Velký důraz je kladen na snahu vyvarovat se fyzikálního, mechanického nebo chemického podráždění (např. mýdlem, detergenty, aj. čínidly). Měla by zůstat zachována přirozená hydratace kůže. Po umytí kůže by se mělo vyčkat nejméně 2 hodiny do nanesení testovaného přípravku, dokud nedojde k úplné obnově kožního pláště.

Měl by být předem vypracován podrobný standardní operační postup vymezení oblasti a množství nanášené látky, včetně přebytku aplikované látky a způsobu stripování kůže.

Měla by být testována míra stability penetrantu a aplikační soustavy v průběhu celé studie. Pokud je penetrant nestabilní, měla by být upřesněna míra jeho odbourávání a následně zpětně aplikována jako korekční faktor.

Ke srovnání by měla být použita kůže na levém i pravém předloktí (paži) v počtu 8 a více míst na jedné končetině.

Měly být vzaty v úvahu odlišnosti vnitřní a vnější části předloktí (paže) a pokusná místa přiměřeně randomizována.

Pokud zadavatel nebo vedoucí studie využívá více posuzovatelů (hodnotících osob) v jednoduché studii, měla být věnována pozornost reprodukovatelnosti získaných dat.

3.1.2 Obvyklá doporučení

Použitím strippingové metody by měl být na kůži rovněž vyhodnocen vztah mezi koncentrací v aplikační lékové formě a koncentrací ve SC. Dermatofarmakokinetický vztah koncentrace a dávky je analogický údajům získávaným při hodnocení s jiných lékových forem.

Kožní strippingová metoda může poskytnout detekovatelné rozdíly na úrovni $\pm 25\%$ testované látky.

Tento údaj může být určen aplikací předem zvolených různých koncentrací (např. 75 %, 100 %, 125 %) jako testované dávkovací schéma pro jednoduché roztoky a pro specifický čas expozice (např. 3 hodiny), s následným využitím vhodné statistické metody pro srovnání koncentrace penetrantu aplikační soustavě a v SC.

Pro použití srovnávacího referenčního produktu je požadováno přibližné určení minimálního času potřebného k dosažení saturační koncentrace v SC.

Časový koncentrační profil léčiva se může odlišovat podle penetrantu (léčiva), jeho koncentrace, vehikula, místa aplikace, denních rytmů, teploty a vlhkosti. Všechny tyto faktory by měly být kontrolovány a srovnávány tak často, jak jen je to možné.

Denní rytmy mohou ovlivňovat měření lékové koncentrace, pokud jsou léčiva současně látky tělu vlastní (např. některé kortikosteroidy nebo retinoová kyselina).

Pilotní studie spočívá v použití referenčního léku, který je srovnatelným způsobem aplikován na 8 míst předloktí jedné ruky s provedením strippingu ve vzrůstajících časech po aplikaci (např.: 15, 30, 60 a 180 minut). Každé místo je určeno pro jeden časový interval. Pro vlastní výzkumný projekt se vždy vybírají zdraví dobrovolníci bez jakékoli předchozího kožního onemocnění typu atopického ekzému, s dostatečně homogenní plochou kůže, která pojme nejméně 8 pokusných míst.

Protože strippingová metoda je velmi citlivá k mnoha místně působícím vlivům, měl by být kladen důraz na dokonalé provedení metodiky a dostatečný počet subjektů. Vhodné je také použití cross-over studie, ve které jsou subjekty studovány ve dvou odlišných skupinách. Po provedeném strippingovém zákroku je vhodné nechat kůži v pokusných místech regenerovat nejméně 28 dní.

Exponovaná oblast se označuje použitím vymezení šablony, která svým působením nebude poškozovat SC nebo kůži samotnou. Velikost plochy vymezující pokusné místo závisí na mnoha faktorech včetně koncentrace látky aplikované ve vehikulu, citlivost analytické metody, velikost difúze léčiva a expozičního času. SC je citlivé k četným zevním faktorům. K tomu, abychom se vyvarovali arteficiálního rozptylu a k získání dostatečné věrohodnosti výsledků, měla by být místa určená k aplikaci randomizována. Uptake, steady state a eliminační fáze, pokud jsou podrobně zkoumány, by měly být randomizovány provedením shodného pokusu na pravé i levé ruce. Předem označená místa jsou vystavena známému množství léčiva (např.: 5mg/cm²) a zakryta neokluzivním krytím.

Okkluzivní krytí je použito jen pokud je to doporučeno se zřetelem k druhu léčivého přípravku. Odstranění léčiva je určeno předem vypracovaným standardním operačním postupem (SOP) s ohledem na možné poranění SC, nejčastěji použitím bavlněného tamponu. V případech lipofilních přípravků jako jsou masti, je plocha před vlastním strippingem omyta jemným mýdlem. Případné omytí mýdlem musí být pečlivě zaznamenáno v SOP.

BA/BE studie zahrnuje měření uptake léčiva a jeho eliminace z kůže. Každý z těchto dějů je důležitý k získání vědomostí o biodostupnosti a bioekvivalenci. Proto je doba trvání aplikace a rozmezí mezi sejmutím stripů určena především charakterem přípravku. Při strippingové metodě jsou odstraněny první 1-2 vrstvy sejmutím 2 adhezivních pásek (jsou běžně komerčně dostupné). Tyto první stripy obsahují zejména neabsorbované množství aplikovaného léčiva a jsou analyzovány odděleně od ostatních stripů. Zbytek vrstev SC je stripován v předem stanovených intervalech, většinou použitím 10 stripů. Všechny 10 stripů získaných z jednoho místa je společně extrahováno a následně analyzováno ověřenou analytickou metodou.

Výsledky jsou obvykle vyjádřeny v jednotkách množství/plocha (např.: ng/cm²). Data mohou být taktéž zpracována počítačovým programem s vyjádřením všech lékových koncentračně-časových profilů: T_{max} , T_{max-ss} a AUC pro testovaný a referenční přípravek.

3.1.3 Určení uptake léčiva

K určení uptake jsou důležitá následující doporučení:

- Aplikovat testovaný a referenční přípravek konkurenčně na více srovnatelných místech
- Po přiměřeném časovém intervalu odstranit přebytečné množství léčiva z aplikačního místa třikrát opakovaným lehkým setřením látkovými nebo bavlněnými tampony
- Provést pilotní studii, ze které jsou následně vyvozeny vhodné časové intervaly ke strhnutí jednotlivých stripů
- Zopakovat aplikaci lepicí pásky vždy shodným tlakem, s oddělením prvních dvou stripů od ostatních analyzovaných
- Pokračovat strippingem do získání 10 sesbíraných stripů z jednoho aplikovaného místa

- Zopakovat postup pro každé aplikační místo se zachováním daných časových intervalů
- Extrahovat léčivo ze stripovaných lepicích pásek a určit koncentraci použitím ověřené analytické metody
- Vyjádřit výsledky v podobě množství léčiva na plochu aplikační oblasti

3.1.4 Určení eliminace léčiva

V tomto případě ke je doporučeno:

- Aplikovat testovaný a kontrolní referenční přípravek konkurenčně na více místech vybraných podle výsledků pilotní studie
- Poskytnout dostatečnou časovou prodlevu pro získání zřejmé steady state úrovně
- Odstranit zbytky léčiva z povrchu tak, jak je popsáno výše, včetně oddělení prvních 2 stripů
- Sesbírat stripy v časových intervalech odvozených z pilotní studie s následnou analýzou¹

Další podmínky pro provádění klinických testů tape strippingu: Pokusné subjekty by měly mít normální kůži, čímž se myslí:

Nepřítomnost ekzému, dermatitidy a dischromatózy

Žádné zranění ani jizvy

Žádné popálení sluncem

Nepřítomnost atopické dermatitida, a to ani v anamnéze

Žádná léková přecitlivělost

Žádná abnormalita kůže v místě, kde bude látka aplikována

Vhodná místa jsou záda, hrud'; předloktí může být použito pro jakýkoli topický kožní produkt. Počet stripovaných vrstev záleží na typu použité pásky a

mění se s použitou strippingovou technikou odlišných experimentátorů a také se liší v závislosti na hodnoceném subjektu.²

Před vlastní analýzou bývá extrakci podrobena samotná čistá lepicí páska, pro případ, že by při analýze docházelo k interferenci lepicí směsi s léčivem. Při dodržení shodného pracovního postupu se jedná o dobře reprodukovatelnou metodu s variačním koeficientem 25-30 %¹⁰.

Před strippingem bývá obvyklé, že se lepicí páska před přilnutím zváží, aby bylo možno zjišťovat množství odstraněné SC.¹¹

Vlastnímu pokusu (pivotal test) předchází pilot test, jež má za úkol předem určit:

- Množství aplikované látky, délku trvání působení produktu a velikost plochy kůže, která bude stripována.

- Způsob extrakce látky z adhezivní pásky a analytickou metodiku

- Čas k dosažení steady state: délka aplikace látky může být stejně dlouhá nebo delší než čas k dosažení steady state

- Počet pokusných plošek: měl by být určen na základě variability ověřené v pilotním testu

- Pokud je uptake léčiva měřen pomocí metody TEWL, TEWL by měl být opakovaně proměřován za konstantních podmínek a okolních vlivů (teploty a vlhkosti), aby se minimalizoval vliv okolního prostředí

Vlastní test

Množství pokusných subjektů a počet pokusných míst na pokožce jak testované, tak i referenční látky by měl být určen na základě variability zjištěné v pilotním testu

Randomizované rozdělení míst pro testovaný a referenční produkt by mělo být označeno užitím značky, která kůži neporuší

Následuje aplikace testované a referenční látky na předem rozdělená místa

Odstranění produktu v daném čase je provedeno setřením zbytků krému nebo masti z kůže tamponem. Potom se sloupnou povrchové vrstvy dvěma adhezivními páskami. Počet stripů získaných z jednoho místa bývá obvykle v rozmezí od 10 do 20 nebo do doby než se TEWL dostane pod hranici 50 g/m²/h. Většinou se stripping opakuje, dokud není odstripováno asi 80 % tloušťky SC.³

Výzkumné aplikace metody TS

V následujících odstavcích je shrnut výběr podstatných metodických informací o z TS studií publikovaných v posledních letech, které byly dostupné prostřednictvím počítačové databáze Science Direct.

Vlivem anatomického místa, aplikačního tlaku, délky trvání a způsobem odstranění adhezivních pásek se zabývá studie,¹² v níž na předem označená místa byl pro přilnutí pásky definován jednotný tlak (330 g/cm² a 165 g/cm²), po definovaný čas (2s a 10 s) použitím cylindrického závaží. Testován byl také způsob stržení pásky (trvání 2s až k dosažení co největší rychlosti). Počet opakovaných aplikací z jednoho místa byl 40 stripů. Změny v kožní fyziologii byly v průběhu pokusu detekovány měřením TEWL a hydratace. V závěru bylo ověřeno, že všechny zkoumané parametry mají významný vliv na vlastnosti kůže a výsledky strippingu.

Stejná technika byla využita také při výzkumu lipidů obsažených v kůži.¹³ Problémy se vyskytly při analýze lipidů, která je rušena kontaminací lipidů látkami společně extrahovanými z lepicí směsi pásky použitým organickým rozpouštědlem. Při tomto pokusu byl adhezivní film Leukoflex použit na vnitřním předloktím na plochách o velikosti 1,5 x 1,5 cm. Adhezivní páska byla z kotouče cívky sejmuta pinzetou. Strippingová metoda byla opakována na stejném úseku kůže, dokud její povrch nezískal lesklé vzezření. Přibližně se jednalo o 18 – 20 stripů z jednoho místa. Páska po strippingu byla umístěna do zkumavky s obsahem 6 ml směsi ethylacetát : metanol (20:80). Poté byla páska vyjmuta a rozpouštědlo odpařeno při

teplotě 50 °C pod dusíkem. Extrakt byl rozpuštěn v 0,25 ml směsi chloroform : methanol (2:1) a do analýzy uchován při teplotě -20 °C.¹⁴

Strippingová technika byla také použita v pokusu o určení dermatofarmakokinetických (DPK) údajů při topické aplikaci ketoprofenu in vitro (na odstraněné kůži). Při pokusu bylo použito 15 dobrovolníků (3 muži a 12 žen ve věku 21 – 27 let, bez jakýchkoli známek předchozích kožních onemocnění, slunečních spálenin, tetování a jizev v místech aplikace. Kůže byla skladována při teplotě -20 °C. Produkt byl aplikován ve formě vodného gelu o složení 2,5 % ketoprofenu a 30 % ethanolu o pH 6-7. V DPK studii byly použito 5 oblastí o rozměrech 1,8 x 2,5 cm² na předloktí. Čtyři z těchto oblastí byly současně vystaveny aplikaci gelu (2μl/cm²) po dobu 45, 90, 180 a 360 min, Páté oblast zůstala prázdná. V průběhu trvání expozice byla místa překryta gázovým tamponem. Po dané době bylo z každého místa použitím stejného tlaku získáno 30 stripů, které byly pro analýzu sdruženy podle schematu 1-3, 4-7, 8-18, 19-30 do 4 zkumavek. Sdružené adhezivní pásky byly extrahovány v metanolu za využití ultrazvukové vodní lázně, centrifugovány při 5500 otáčkách/min po dobu 10 min. Následně byly odpařeny, precipitát rozpuštěn v metanolu a před analýzou HPLC filtrován.(4)

V jiné studii byl užit čistý malathion značený ¹⁴C a 50 % komerční produkt ve zkrácené in vivo dermální studii na potkanech. Kůže určená k aplikaci byla rozdělena na 4 segmenty a stripována 8 adhezivními páskami. Rozpouštědlo použité k detekci malathionu bylo podrobena radiochemické analýze a taktéž vnitřní orgány zvířete byly této analýze podrobeny.(5)

Další studie srovnává in vitro průnik léčiva , in vivo kožní stripping a kožní blanching (výbledová reakce) při hodnocení triamcinolonacetoniidového krému za proměnných, jako jsou trvání aplikace, koncentrace léčiva a odlišnost pokusného zvířete (potkana). Po aplikaci léčiva po ukončení doby působení, byl zbytek léčiva odstraněn z aplikační oblasti třemi suchými vatovými tampony. SC bylo odstraněno jak z aplikované, tak z kontrolní nezasazené plochy, jednalo se přibližně o 75 % tloušťky SC. První adhezivní disk byl odstraněn, zbývajících 9 bylo uchováno k detekci.¹⁵

Na 6 zdravých dobrovolnících byla provedena studie, při které byly subjekty aklimatizovány 2 hodiny před vlastním pokusem a aplikovaná látka byla technologicky zpracována do dvou druhů náplastí: jedna obsahovala extrakt z komonice lékařské, druhá syntetický kumarin. Oba druhy náplastí byly aplikovány simultánně na odlišná randomizovaná místa. Po předem určeném čase byly náplasti odstraněny. Případný zbytek náplasti byl odstraněn užitím PVC filmu, První vrstva SC byla odstraněna komerční adhezivní páskou (Transpore tape, 3M, USA). Všechny stripy byly aplikovány jednou osobou přitlačením ukazováčkem stejným tlakem po dobu 10 s a následně jemně sloupnuty. První vrstva obsahovala neabsorbované léčivo, proto byla analyzována odděleně od zbývajících 9 stripů. Stripy byly macerovány v ethanolu, filtrovány. Množství permeovaného kumarimu bylo zjištěno odečtem z detekce zbytku v odstraněné náplasti a následně kvantifikováno ze stripů. Výsledek byl vyjádřen v $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.¹⁶

Strippingový postup byl též použit k úprava kůže pro následující permeaci. Tomuto pokusu byly získána lidská kůže post mortale, dermatomována na tloušťku 1 mm, uchována při $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Následně byl každý kousek stripován celofánovou lepicí páskou (Scotch) 15krát tak, aby se odstranilo SC. Pak byla kůže umístěna do penetračních cel.¹⁷

V této studii byl také zkoumán penetrační potenciál terbinafinu, který je uvolňován z jednoduchých vehikul. Terbinafin byl extrahován jako volná base a rozpuštěn na čtvrtinu nasycené koncentrace v isopropylmyristátu, čistém ethanolu a směsi 50:50 obou rozpouštědel. Pro extrakci terbinafinu z adhezivní pásky a pro HPLC analýzu byla použita směs voda, acetonitril a tetrahydrofuran. Pro pokus byli vybráni 3 zdraví dobrovolníci bez jakékoli kožního onemocnění v anamnéze, ošetřená místa byla bez chlupů, velikosti $7 \times 1\text{ cm}^2$, umístěna asi 4 cm od zápěstí. Léčivo o objemu $700\ \mu\text{l}$ bylo aplikováno na gázu, přikryto okluzivním polyesterovým filmem a upevněno ke kůži. Po odstranění byla kůže ošetřena třemi čistými tampony a stripována páskou (Scotch Book Tape). Stripy byly předem zváženy, aby bylo možno zpětně zjistit množství odstraněné SC. Z každého ošetřeného místa bylo získáno 20 stripů. Terbinafin byl kvantifikován dvěma metodami: ATR-IR a HPLC

po extrakci (16 hodinová macerace ve směsi acetonitril a triethylamin 80:20). Koncentrační profil terbinafinu byl následně upřesněn výpočtem z II. Fickova zákona. Výsledkem bylo, že difuzivita terbinafinu skrze SC nebyla výrazně ovlivněna použitým vehikulem. Bohužel výsledky nebyly natolik homogenní, aby se z nich daly vyvodit přesnější závěry.¹⁸

V další studii zabývající se terbinafinem bylo na předloktí 5 zdravých dobrovolníků ve vymezených oblastech aplikovány po dobu 2 hodin topické přípravky s obsahem terbinafinu ve vehikulu obsahujícím 50% ethanolu a 50% isopropylmyristátu. Tři z těchto formulací navíc ještě obsahovaly penetrační urychlovače v zastoupení: 5 % kyseliny olejové, 10 % pyrrolidonu a 1 % urea. Koncentrační profil terbinafinu v SC byl měřen infračervenou spektroskopií z jednotlivých stripovaných vrstev. Tato metoda byla předtím ověřena HPLC analýzou terbinafinu.¹⁹

Další práce popisuje experiment s využitím trans-retinoové kyseliny aplikované volně či enkapsulované lipozómech z SC. Stripping byl zde proveden 12 krát a rozpouštědlem byl tetrahydrofuran.²⁰ Ve studii srovnávající in-vivo a in-vitro model s lipofilním penetranem fluazifopbutylem bylo provedeno celkem 21 stripů, extrakčním činidlem byl hexan. V této studii byly aplikovány komerčně získané krémy s obsahem 2 % ketokonazolu a 2% mikonazolu na 3,8 cm² obou předloktí u zdravých dobrovolníků. Po očištění bylo získáno 11 stripů z každého místa v časech 1, 4, 8, 24 hodin po odstranění léčiva. První strip byl vyloučen, ostatní byly analyzovány metodou HPLC.²¹ V další studii byly zkoumány elastické micely založené na bázi tenzidu, které byly in-vivo aplikovány na kožní povrch. Před vlastním nanášením byl kožní povrch ošetřen setřením tamponem namočeným v ethanolu, po 30 minutách se nanasla na 1 cm² směs vehikula. Byl zkoumán efekt trvání aplikace: TS byl proveden 1 a 4 hodiny po uschnutí nanesené směsi, zkoumán byl efekt aplikovaného objemu a efekt okluze. Stripovací páska byla silně přitisknuta k aplikované oblasti a poté prudce stržena. První, devátý a patnáctý strip byl detekován metodou FFEM (freeze fracture electron microscopy).²²

Také ke sledování penetrace fluoresceinu sodného enkapsulovaného v liposomech byla použita strippingovou techniku. Po 30 min kontaktu kůže s aplikovaným vzorkem bylo pořízeno 15 stripů s dodržением definovaných podmínek (tlak 1 kg závaží, rychlé strhnutí, jeden vyšetřovatel). Stripy byly sdruženy podle schématu: 4-6, 7-9, 10-12, 13-15 a analyzovány spektrofluorometricky.²³

Další studie se zabývá penetrací látek ze supersaturovaných roztoků. V normálních pokusných podmínkách je flux léčiva významně ovlivněn jeho rozpustností ve vehikulu a významně ovlivňuje jeho biodostupnost. Proto byla při tomto pokusu připravena supersaturovaná soustava, jež měla zaručit vzrůst biodostupnosti. Pro tento pokus byl jako modelová léčivá látka vybrán piroxikam. Kůže použitá ke strippingové metodě byla předtím podrobena permeaci v difúzních celách, ke strippingu se přistoupilo 24 hodin po odstranění donoru a omytí. První strip byl odstraněn, následujících 15 bylo umístěno do zkumavky s rozpouštědlem a analyzováno.²⁴

Ve studii zkoumající míru absorpce látek z opalovacích přípravků u člověka činila měla testovaná plocha na předloktí u 21 zdravých lidí vždy 4 cm², aplikováno bylo 25 µl vodného roztoku nebo 25 mg krému, ke stripování se přistoupilo po časové prodlevě 1, 2, 5, a 7 hodin po aplikaci. První strip byl odstraněn, následujících 6 protřepáno v rozpouštědle v mixéru a následovala analýza.²⁵

V další studii in vivo byla použita páska předem nastříhaná na 2,5 x 4,0 cm a testována na 10 dobrovolnících ke zjištění postupu odstraňování deposit akrylátového materiálu z kůže. Sledovanými oblastmi byly břívka prstů, dlaních a předloktí. Po expozici byla místa kryta okluzí, po aplikaci po 2 min byla páska velmi opatrně sejmuta. Pásky po stripování byly umístěny do vialek naplněných 10 ml acetonu.²⁶

K výzkumu esteráz a jejich proteolytické aktivity v SC, které bylo získáno TS metodou. Předloktí dobrovolníků bylo předem očištěno vodou a mýdlem, osušeno a krátce otřeno papírovým ubrouskem napuštěným ethanolem. Adhezivní páska předem nastříhaná na kusy 5 x 12cm byla těsně přiložena na kůži s tlakem odpovídajícím 6 přejetími válečkem, poté byla prudce stržena. První strip byl

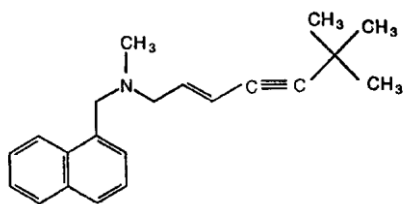
odstraněn. Stripovací páska byla před a po použití zvážena a poté použita k vlastnímu pokusu.²⁷ Existují také studie užívající metodu strippingovou techniku ke standardizovanému narušení kůže a změně jejích permeačních vlastností, které předchází vlastnímu pokusu.^{28, 29}

3. 2 Terbinafin

Terbinafin, N-[(2E)-6,6-Dimethyl-2-hepten-4-ynyl]-N-methyl-1-naphthalenmethanamin, patří do skupiny perorálně i lokálně účinných allylaminových antimykotik.

Jedná se o bazickou látku, $C_{21}H_{25}N$ o molekulární hmotnosti 291,43, terapeuticky je využíván terbinafin-hydrochlorid ($C_{21}H_{25}N.HCl$) o molekulární hmotnosti 327,9.

Bod tání: 195°C -198°C



Terbinafin-hydrochlorid je bílý krystalický prášek, velmi dobře rozpustný v methanolu a metylenchloridu, dobře rozpustný v ethanolu a jen nepatrně rozpustný ve vodě.

Rozdělovací koeficient terbinafinu je $P_{o/v} = 3,3$ ³⁰

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité suroviny

Aerotape (self adhesive tape crystal)	Aeror, Dod Activa
Acetonitril	Sigma-Aldrich
Azid sodný	Penta Praha
Isolan	Goldschmidt
Isopropylmyristát	Fluka
Lamisil krém	Zentiva, Praha
Terbinafin-hydrochlorid	(Herbacos-bofarma, Pardubice)

Uvedené komerčně dostupné látky odpovídaly deklarované jakosti příslušných norem výrobců a dodavatelů, resp podle ČL 2002.

Transkarbam 12 (T12), karbamat dodecylesteru kyseliny (ϵ)-aminokapronové, tj. dodecyloxykarbonylpentylammoniumdodecyloxykarbonylpentylcarbamát byl o čistotě vyšší než 99,0 % syntetizován doc. A. Hrabálkem, CSc. (FaF UK v Hradci Králové).

4.2 Použitá zařízení

Analytické váhy	(Sartorius, Göttingen)
Biologický termostat BT 120	(Laboratorní přístroje, Praha)
Digitální pH-metr GRYF 209S	(Elektronické přístroje, Havl. Brod)
Elektronická míchačka	(Cole Parmer, USA)
Ultrazvuková lázeň	(Tesla, Vráble)
UV detektor ISCO V4	(Lincoln, USA)

4. 3. Biologický materiál

Vzorky kůže byly získány z boltce prasečího ucha. Čerstvá prasečí ucha byla omyta, štětiny oholeny a byla odpreparována chrupavka a podkožní tuková tkáň. Takto připravená kůže plné tloušťky byla konzervována ponořením do fyziologického roztoku s přísadou azidu sodného a po následném vysušení zatavena do folie a uchována v mrazicím zařízení o teplotě -20 °C. Před upotřebením byla kůže rozmrazena ponecháním v prostředí s pokojovou teplotou a ručně seříznuta na vymezenou tloušťku skalpelem. Následně byla kůže nastříhána na čtverce vhodné velikosti.

4.4 Příprava donorových vzorků

Kapalné donorové vzorky byly připraveny dispergací terbinafin-hydrochloridu (TER-HCl) a transkarbamu 12 (T12) v Isolanu a isopropylmyristátu. Tímto způsobem byly připraveny srovnávací vzorky bez přítomnosti T12. Všechny donorové vzorky byly při dispergaci míchány a zahřívány na teplotu maximálně 40 °C. Toto opatření mělo zabránit uvolnění oxidu uhličitého při rozkladu termolabilního T12. Po přípravě byly vzorky aplikovány ještě téhož dne.

Donorové vzorky byly **kódovány** následujícím způsobem:

Všechny vzorky obsahovaly shodnou 1% koncentraci TER-HCl.

ISO ...vzorek s obsahem TER-HCl ve vehikulu Isolanu

ISO T12 ...ISO s 1% koncentrací T12

IPM ...vzorek s obsahem TER-HCl ve vehikulu isopropylmyristát

IPM T12 ...IPM s 1% koncentrací T12

LAM ...vzorek originálního krému Lamisil (1% TER-HCl)

Uspořádání strippingových pokusů

Pro tape-stripping pokusy byly kožní štěpy fixovány mezi dvěma destičkami z plexiskla s centrálním otvorem o velikosti 2 cm², který vymezoval plochu kožního štěpu vystavenou působení naneseného donorového vzorku. Po aplikaci donorového vzorku o hmotnosti 0,500 g byly destičky s kožními štěpy přikryty podložním sklíčkem, položeny na gázu nasycenou fyziologickým roztokem, přikryty víkem, aby se zabránilo odpařování a vysychání. Takto připravené kožní štěpy byly uloženy na 15 hodin do termostatu s teplotou 32 °C. Následně byly destičky vyjmuty, rozebrány, vzorek z kožních štěpů byl setřen 3 gázovými tampony navlhčenými acetonem. Plocha vystavená nanesenému donorovému vzorku byla vystřižena nůžkami a podrobena tape-strippingu.

4.5 Provedení strippingu

Z jednostranně lepicí pásky o velikosti 25mm x 33mm byla vystřižena plocha odpovídající velikosti exponované kůže a přilepena na kůži. Pro standardizované přilnutí byla páska zatížena shodnou silou 98,1 N na plochu 2 cm² přiložením 1kilového závaží po dobu 30 s. Následovalo prudké strhnutí pásky a její okamžité ponoření do lahvíček naplněných 5 ml rozpouštědla, které mělo shodné složení jako mobilní fáze, tj.: směs vodného roztoku kyseliny ortho-fosforečné s triethylaminem a acetonitrilu v poměru 1:1. Z každého kožního vzorku bylo provedeno 10 stripů. Stripy 1 - 2 a 3 - 10 byly macerovány samostatně v tmavých lékovkách s broušenými uzávěry po dobu 1 hodiny, kůže po strippingu byla podrobena maceraci po dobu 24 hodin. Během macerace byly vzorky protřepávány.

4.6 Analytická metodika

Analytická metodiky byly převzata z mé diplomové práce Transdermální in vitro permeace terbinafinu I.

Příprava kalibračních roztoků

Základní roztok TER-HCl byl připraven navážením 1 mg TER-HCl a jeho rozpuštěním ve 100 ml mobilní fáze v odměrné baňce (koncentrace 1 mg %). Ze základního roztoku a mobilní fáze byly připraveny pracovní kalibrační roztoky těchto koncentrací: 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 mg / 100ml. Každý kalibrační roztok byl proměřen třikrát. Kalibrační přímka a její parametry byly stanoveny lineární regresí s využitím šablony LINREG.

Regresní funkce : $y = kx + q$			
počet: bodů n = 2		počet stupňů volnosti: v = 0	1
Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek			
Směrnice	=	375	± 0
absolutní člen	=	2,3	± ,9
koeficient korelace	=	0,9961	
reziduální odchylka	rez =	12,3	
hodnota F-statistiky	F =	1,28E+3	
Závislost y na x	prokázána se		99,9 %
	spolehlivostí		

4. 7 Stanovení terbinafinu

Množství terbinafinu v odebraných vzorcích bylo stanoveno metodou HPLC. Jako mobilní fáze byla použita směs vodného roztoku 0,02 M kyseliny ortho-fosforečné a 0,01 M triethylaminu s acetonitrilem v poměru 1:1. Před vlastní

analýzou byla mobilní fáze odvzdušněna v ultrazvukové vodní lázni (10 až 15 min). Stacionární fázi tvořila kolona LiChroCART Merk o průměru 4 mm, délce 250 mm s náplní Lichrospher®100 Rp 18 o velikosti částic 5 µm.

Při výběru lepicí pásky bylo zohledněno zejména fakt, že lepicí vrstva nebude při detekci metodou HPLC interferovat s měřenými píky TER-HCl. Před vlastním stanovením TER-HCl byl proveden na kolonu nástřik rozpouštědla po maceraci čisté lepicí pásky. Důvodem byla obava, aby nedocházelo po uvolnění lepicích složek ke zkreslení píků TER-HCl.

Detekce byla prováděna UV spektrofotometricky při vlnové délce 224 nm. Průtok mobilní fáze, temperované na teplotu 65 °C, činil 1,6 ml/min.

Objem vzorku dávkovaný na kolonu byl 100 µl, každé stanovení bylo provedeno nejméně dvakrát, při rozdílu nalezených hodnot ploch pod píkem větším než 10% byl proveden třetí nástřik daného vzorku na kolonu.

Retenční čas TER-HCl byl za daných podmínek 7,2 min až 8 min.

4. 8 Zpracování výsledků

Naměřené hodnoty plochy pod píkem byly na základě kalibrační rovnice přepočítány na koncentraci látky v objemu 100 ml rozpouštědla a následně převedeny na koncentraci v objemu 5 ml (obsah TER-HCl rozpuštěného po maceraci v 5 ml rozpouštědla, tj. množství TER-HCl v g uvolněného ze stripů) a přepočítány na množství permeovaného z aplikovaného vzorku v procentech. Výsledné údaje jsou zpracovány v tabulkách 1 až 5, pro každý aplikovaný donorový vzorek zvlášť (pozn.: SEM = SMODCH.VÝBĚR.)

5. VÝSLEDKY

Tabulka 1: Stanovení průniku terbinafinu z 1% disperze v isopropylmyristátu

IPM 1% ter-HCl					
	mg/100ml	mg/5ml	podíl z aplik. množství [%]	průměr [%]	SEM
strip 1-2 SC	1,09	0,0545	1,09	0,62	0,29
	0,7036	0,03518	0,7036		
	0,4439	0,022195	0,4439		
	0,38952	0,019476	0,38952		
	0,4602	0,02301	0,4602		
strip 3-10 Epidermis	0,1153	0,00575	0,1153	0,15	0,03
	0,1255	0,006275	0,1255		
	0,1277	0,006385	0,1277		
	0,1763	0,008815	0,1763		
	0,1935	0,009675	0,1935		
Dermis	0,534917	0,026746	0,534917	0,53	0,08
	0,58547	0,029274	0,58547		
	0,58826	0,021941	0,58826		
	0,39876	0,019938	0,39876		
	0,54008	0,027004	0,54008		

Tabulka 2: Stanovení průniku terbinafinu z 1% disperze v isopropylmyristátu a 1 % transkarbamu 12

IPM 1%ter-HCl, 1%T12					
	mg/100ml	mg/5ml	podíl z aplik. množství [%]	průměr [%]	SEM
strip 1-2	0,232	0,0116	0,232	0,24	0,11
SC	0,15291	0,007646	0,15291		
	0,14253	0,007127	0,14253		
	0,256892	0,012845	0,256892		
	0,41614	0,020807	0,41614		
strip 3-10	0,12268	0,006134	0,12268	0,20	0,14
Epidermis	0,445776	0,022288	0,445776		
	0,176064	0,008803	0,176064		
	0,134805	0,00674	0,134805		
	0,14029	0,007145	0,14029		
Dermis	1,30152	0,065076	1,30152	0,83	0,29
	0,911418	0,015571	0,911418		
	0,660837	0,033419	0,660837		
	0,751234	0,037562	0,751234		
	0,539269	0,026963	0,539269		

Tabulka 3: Stanovení průniku terbinafinu z 1% disperze v isolanu

ISOL 1%ter-HCl					
	mg/100ml	mg/5ml	podíl z aplik. množství [%]	průměr [%]	SEM
strip 1-2	0,069424	0,003471	0,069424	0,055	0,016
SC	0,051586	0,002579	0,051586		
	0,062728	0,003136	0,062728		
	0,062488	0,003124	0,062488		
	0,029008	0,00145	0,029008		
strip 3-10	0,011058	0,000553	0,011058	0,032	0,02
Epidermis	0,063928	0,003196	0,063928		
	0,035693	0,001785	0,035693		
	0,026437	0,001322	0,026437		
	0,022229	0,001111	0,022229		
Dermis	0,54835	0,027418	0,54835	0,57	0,23
	0,610472	0,030524	0,610472		
	0,39668	0,019834	0,39668		
	0,356656	0,017833	0,356656		
	0,933925	0,046696	0,933925		

Tabulka 4: Stanovení průniku terbinafinu z 1% disperze v isolanu
s 1 % transkarbamu 12

ISOL 1%ter-HCl, 1% T12					
	mg/100ml	mg/5ml	podíl z aplik. množství [%]	průměr [%]	SEM
strip 1-2	0,0254	0,00127	0,0254	0,028	0,012
	0,041872	0,002094	0,041872		
SC	0,029245	0,001462	0,029245		
	0,010434	0,000522	0,010434		
	0,03532	0,001766	0,03532		
strip 3-10	0,047904	0,002395	0,047904	0,038	0,012
	0,022909	0,001145	0,022909		
Epidermis	0,04828	0,002414	0,04828		
	0,045973	0,002299	0,045973		
	0,02917	0,001459	0,02917		
Dermis	1,25675	0,062838	1,25675	0,923	0,322
	0,523736	0,026187	0,523736		
	1,2151	0,060755	1,2151		
	0,679314	0,033966	0,679314		
	0,943522	0,047176	0,943522		

Tabulka 5. Stanovení průniku terbinafinu z 1% Lamisilu

Lamisil crm 1% ter-HCl					
	mg/100ml	mg/5ml	podíl z aplik. množství [%]	průměr [%]	SEM
strip 1-2 SC	0,027192	0,00136	0,027192	0,048	0,042
	0,021216	0,001061	0,021216		
	0,057648	0,002882	0,057648		
	0,118384	0,005919	0,118384		
	0,015293	0,000765	0,015293		
strip 3-10 Epidermis	0,032048	0,001602	0,032048	0,046	0,028
	0,012666	0,000563	0,012666		
	0,035602	0,00178	0,035602		
	0,067555	0,003378	0,067555		
	0,08149	0,004075	0,08149		
Dermis	0,406298	0,020315	0,406298	0,61	0,18
	0,705029	0,035251	0,705029		
	0,790528	0,039764	0,790528		
	0,430099	0,021505	0,430099		
	0,7085	0,035425	0,7085		

6. KOMENTÁŘ A DISKUSE

Prvním krokem v rámci hledání podmínek pro bylo nalezení vhodného typu lepidla pásky, která by dostatečně adherovala k povrchu kůže, byla schopna dobře nést odlupované vrstvičky keratinocytů. Přitom by po extrakci terbinafinu do kapalné fáze, která je použitelná jako mobilní fáze pro HPLC stanovení daného léčiva neměla uvolňovat a rozpouštět žádné příměsi, které by nepříznivě interferovaly s terbinafinem. Vhodnou se po několika pokusech ukázala být náplast, která umožňovala sejmutí prakticky všech dobře vrstviček epidermis již pomocí 15 stripů. První dva byly vždy z pokusu pro další měření odstraněny. V uvažovaném zadání totiž nešlo o snahu dospět k procentuálně významnému recovery. V předchozí pokusech na pracovišti bylo ověřeno, že pro in vitro pokusy, u nichž se stanovuje rovněž obsah léčiva v dermálním kompartmentu, vycházejí absolutní hodnoty stanovovaného sejmutého léčiva jako nadměrně variabilní. Množství léčiva, které je při jeho jednocentní koncentraci v aplikovaných donorových vzorcích, v relativně několikařádovém nepoměru s velmi malými kvanty nalézány v jednotlivých sloupnutých vrstvičkách, neumožňuje přiměřené vyjádření relevantnějšího údaje, totiž poměru v jakém se léčivo nachází v jednotlivých kožních etážích. Proto bylo od snahy o vypracování takového protokolu, který by současně umožňoval právě zmíněné a vlastně zásadní hledané vyjádření a současně splňoval nároky na dopčet recovery, již předem upuštěno.

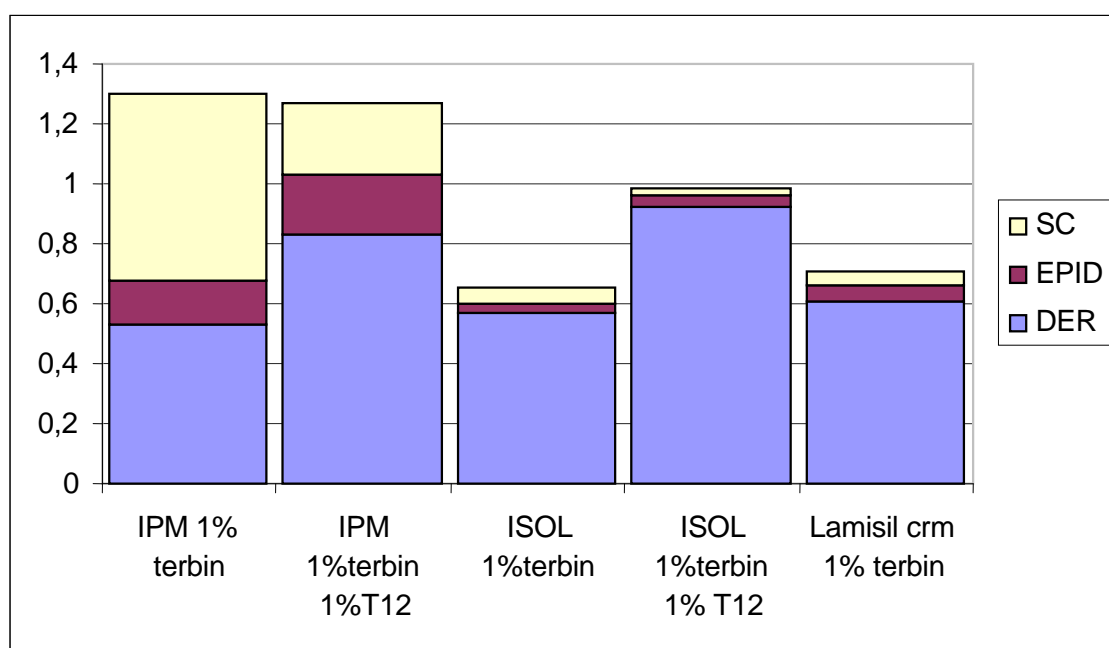
Vybraná náplast za podmínek popsaných v experimentální části tak nakonec vyhovovala nejen pokud jde o neinterferující detekci léčiva, ale také z ohledu na počet potřebných stripů. Bylo totiž možné použít pouhých cca 15 stripů, na rozdíl od obvykle uváděného až dvojnásobného počtu, což vlastní práci velice usnadnilo.

Získané výsledky, jak jsou v souhrnné podobě uvedeny v tabulkách 1 až 5, se ukázaly vzhledem k předchozím praktickým zkušenostem pracoviště, jako poměrně homogenní. Hodnoty příslušných směrodatných odchylek jsou pro jednotlivá

testovaná donorová vehikula uspokojující, někdy až skutečně nízké. Ve všech případech se tedy podařilo naměřit hodnoty, které lze poměrně dobře interpretovat.

Souhrné zásadní výsledky, k nimž je práce směřována, jsou v grafické podobě názorně shrnuty na **obrázku 1**. Z něho jsou patrné všechny potřebné informace, které sice bez nároku na tzv. statisticky významné hladiny spolehlivosti, avšak co do trendu zcela jednoznačně, ukazují na řadu zajímavých věcí.

Obrázek 1: Průměrný obsah terbinafinu [%] v rohové vrstvě (SC), epidermis a dermis kůže prasečího ucha po 15 hodinách



Množství proniknuvšího terbinafinu v žádné případě nepřevyšovalo 1 procento z aplikované dávky. Tento fakt neznamená za daných pokusných podmínek žádný relevantní informaci.

Podstatná část terbinafinu, který do kůže pronikl, se dostala až do dermálního kompartmentu, což je z hlediska místa zásahu antimykotik správné a vlastně se tak potvrzuje běžně nahlížený předpoklad.

Tento experimentální nález je ovšem významně rozšířen o skutečnost, že v případě obou strukturálně jednoduchých vehikul, isopropylmyristátu a isolanu jsou absolutní množství terbinafinu v dermálním kompartmentu na stejné úrovni a tyto

hodnoty odpovídají také dermální koncentraci terbinafinu nalezené po aplikaci Lamisilu.

Nejzajímavější je ovšem srovnání obsahu terbinafinu v dermálním kompartmentu z vehikul, které obsahují přídavek transkarbamu 12. V obou hodnocených případech, tedy jak pro vehikulum isopropylmyristatu tak isolanu přinesl přídavek 1 procenta akcelerantu jednoznačné a evidentní zvýšení obsahu terbinafinu v dermální kožní etáži.

Při pohledu na tento ukazatel je dokonce zřejmé, že v obou dvou výše zmíněných parametrech předčí průnik terbinafinu do dermis dokonce i průnik z krému Lamisil.

7. ZÁVĚR

1. Experimentální protokol vypracovaný v předpokusech přinést ve vlastním strippingovém experimentu dobře analyzovatelná data a vyhodnotitelné výsledky
2. Terbinafin se za daných pokusných pomínek převážně dostává až do dermis, jeho absolutní i relativní množství v rohové vrstvě kůže i epidermis je vždy nižší než v dermálním kompartmentu.
3. Hodnoty kvantifikující průnik terbinafinu do kůže prasečího ucha jsou srovnatelné pro případy jednoduchých vehikul isopropylmyristátu, isolanu i přípravku Lamisil krém.
4. Přídavek 1 procenta transkarbamu 12 přinesl zvýšení kvan terbinafinu, která se za daných podmínek dostala až do dermis.

8. SOUHRN

Práce přináší podrobný aktuální přehled současného pohledu na provedení a postavení strippingových metod při studiu průniku látek kůží.

S využitím předběžně ověřeného vlastního protokolu pro provedení strippingového pokusu byly zjištěno, že hlevní část terbinafinu proniká přes epidermis až do dermis. U obou hodnocených jednoduchých vehikul, isopropylmyristátu o isolanu je tento průnik kvantitativně srovnatelný s výsledky získanými pro přípravek Lamisil krém.

Arbitrárně zvolený přídavek 1 procenta transkarbamu 12 je v případě isopropylmyristátu i isolanu pozitivní ve smyslu výrazného zvýšení kvanta terbinafinu deponovaného v dermis.

9. LITERATURA

1 Guidance for Industry, Topical Dermatological Drug Product NDAs and ANDAs- In Vivo Bioavailability, Bioequivalence, In vitro Release, and Associated Studies, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), June 1998

2 Hollander M, Wolfe DA (ed.) Nonparametric statistical methods. 2nd ed. J .Wiley, New York 1999, 787 s.

3 Moser K., Kriket K., Naik A., Yogeshvar N. K., Guy R. H.,: Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. Eur J Biopharm **52** (2001) s. 103-112

4 Lademann J.: Tape stripping in combination with spectroscopic measurement: qualitative analysis of the penetration behaviour of sunscreens and drugs into the skin. Soc Dermopharm, **23** (11) 2000

5 van der Molen R. G., Spies F., van't Noordende J. M., Boelsma E., Mommaas A. M., Koerten H. K.: Tape stripping of human stratum corneum yields cell layers that originate from various depths because of furrows in the skin. Arch Dermatol Res **289** (1997) s. 514-518

6 Shah V. P: Dermatopharmacokinetics perspectives from bioequivalence viewpoint. Historical development of dermatopharmacokinetics and overview of the Guidance, Topical Drug Products WG OPS/CDER/FDA, 2000.

7 Löffler H., Dreher F., Maibach H. I.: Stratum corneum adhesive tape stripping: influence of anatomical site, application pressure, duration and removal, *Brit J Dermatol* **151**, (2004) s. 746-752

8 Moser K., Kriket K., Naik A., Yogeshvar N. K., Guy R. H: Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *Eur J Biopharm* **52** (2001) s. 103-112

9 Coderch L., Oliva M., Pons M., de la Maza A., Manich A. M., Parra J. L: Percutaneous penetration of liposomes using the tape stripping technique. *I J Pharm* **139** (1996) s. 197-203

10 Alberti I., Yogeshvar N. K., Nail A., Bonny J., Guy R. H.: Effect of ethanol and isopropylmyristate on the availability of topical terbinafine in human stratum corneum in vivo. *Int J Pharm* **219** (2001) s. 11-19

11 Honeywell-Nguyen P. L., Groenink H. W., Graaff A. M., Bouwstra J. A.: The in vivo transport of elastic vesicles into human skin: effects of occlusion, volume and duration of application. *J Control Rel* **90** (2003) s. 243-255

12 Trebilcock K. L., Heylings J. R., Wilks M. F.: In vitro tape stripping as a model for in vivo skin stripping. *Toxic. In Vitro* **8**, (4) (1994) s. 665-667

13 Lodén M., Akerström U., Lindahl K., Berne B.: Bioequivalence determination of topical ketoprofen used a dermatopharmacokinetic approach and excised skin penetration. *Int J Pharm* **284**, (2004) s. 23-30

14 Pershing L. K., Bakhtian S., Poncelet C. E., Corlett J. L., Shah V. P.: Comparison of skin stripping, in vitro release, and skin blanching response methods to measure dose response and similarity of triamcinolone acetonide cream strength from two manufactured sources. *J Pharm Sci.* **91** 2002

15 Minghetti P., Casiraghi A., Cilurzo F., Montanami L.: Development of local patches containing melilot extract and ex vivo-in vivo evaluation of skin permeation. *Eur J Pharm Sci* **10** (2001) s. 111-117

17 Xiong G. L., Juan D., Maibach I. H., Effects of penetration enhancers on in vitro percutaneous absorption of low molecular weight heparin through human skin. *J Control Rel* **42** (1996) s. 289-296

18 Alberti I., Yogeshvar N. K., Nail A., Bonny J., Guy R. H.: Effect of ethanol and isopropylmyristate on the availability of topical terbinafine in human stratum corneum in vivo. *Int J Pharm* **219** (2001) s. 11-19

19 Alberti I., Yogeshvar N. K., Nail A., Bonny J., Guy R. H.: In vivo assessment of enhanced topical delivery of terbinafine to human stratum corneum. *J Control Rel* **71** (2001) s. 319-327

20 Contreras M. J. F., Soriano M.M.J., Diéguez A. R.: In vitro percutaneous absorption of all-trans retinoic acid applied in free or encapsulated in stratum corneum lipid liposomes. *Int J Pharm* **297** (2005) s. 134-135

21 Pershing, L. K., Corlett, J., Jorgensen C.: In vivo pharmacokinetics and pharmacodynamics of topical ketoconazole and miconazole in human stratum corneum. *Antimicrobial Agents Chemother* **1** (1994) s. 90-95

22 Honeywell-Nguyen P. L., Groenink H. W., Graaff A. M., Bouwstra J. A.: The in vivo transport of elastic vesicles into human skin: effects of occlusion, volume and duration of application. *J Control Rel* **90** (2003) s. 243-255

23 Coderch L., Oliva M., Pons M., de la Maza A., Manich A. M., Parra J. L.: Percutaneous penetration of liposomes using the tape stripping technique. *Int J Pharm* **139** (1996) s. 197-203

24 Pellet M. A., Roberts M. S., Hadgraft J.: Supersaturated solutions evaluated with an in vitro stratum corneum tape stripping technique. *Int J Pharm* **151** (1997) s. 91-98

25 Couteau C., Cullel N. P., Connan A. E., Coiffard L- J. M.: Stripping method to quantify absorption of two sunscreens in human. *Int J Pharm* **222**, (2001) s. 153-157

26 Nylander-French L. A.: A tape-stripping method for measuring dermal exposure to multifunctional acrylates. *Ann Occup Hyg* **44** (2000) s. 645-5-651

27 Beisson F., Aoubala M., Marull S., Moustacas-Gardies A., Voultoury R., Verger R., Arondel V.: Use of the tape stripping technique for directly quantifying esterase activities in human stratum corneum. *Anal Biochem* **290** (2001) s.179-185

28 Hirsch A. C., Upasani R. S., Banga A. K.: Factorial design approach to evaluate interactions between electrically assisted enhancement and skin stripping for delivery of tacrine. *J Control Rel* **103**, (2005) s. 113-121

29 Visscher M., Hoath S. B., Conroy E., Wickett, R. R.:Effect of semipermeable membranes on skin barrier repair following tape stripping. Arch Dermatol Res 293 (2001) s. 491-499

30 Fritz P, Schmook JG, Meingassner AB: Effect of ethanol and isopropylmyristat on the availability of topical terbinafine in human stratum corneum. Int. J Pharm. 219 (2001) s. 11-19