

## **Penetracija i permeacija kortikosteroida iz farmaceutskih preparata za primenu na kožu**

**Snežana Savić\*, Gordana Vuleta**

Institut za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju  
Farmaceutski fakultet Beograd

---

### **Kratak sadržaj**

Kako kortikosteroidi (KS) predstavljaju veliku i značajnu grupu dermatoloških lekova sa brojnim indikacijama za primenu, sprovođenje *in vitro* i/ili *in vivo* studija penetracije/permeacije od velikog je značaja u proceni novih i generičkih lekova. Izbor efikasne terapijske doze sa prihvatljivim odnosom rizik/korist, pogodnog režima primene leka ili najprihvatljivije formulacije nosača su neke od brojnih primena ovih studija. Intencija je da se *in vitro* studije sa humanim SC-om ili rekonstruisanim humanim epidermom unaprede i standardizuju tako da budu komparativne sa *in vivo* procenom farmakodinamskog efekta KS (studija izbeljivanja kože) i tehnikom "tape stripping-a". Studija izbeljivanja kože je od FDA prihvaćena i odobrena metoda za procenu bioraspoloživosti i bioekvivalentnosti KS za dermatološku primenu, uz naglašenu potrebu dodatne standardizacije studija u kojima se koriste objektivna hromometrijska merenja. Takođe, trenutno angažovanje istraživača usmereno je ka daljoj optimizaciji i validaciji metode sa trakama (eng. *tape stripping*), kao "surogat" testu za ispitivanje bioraspoloživosti i bioekvivalentnosti dermatoloških lekova, a time i lokalno primenjenih KS. Cilj je koncipiranje praktičnog regulatorno prihvaćenog testa, što je izazov za budućnost.

**Ključne reči:** kortikosteroid, penetracija, permeacija, *in vitro*, *in vivo*, humani SC, rekonstruisani humani epiderm, metoda izbeljivanja kože, metoda sa trakama

---

\* Autor za korespondenciju: Snežana Savić, snexs@pharmacy.bg.ac.yu

## Uvod

Kod lekova za sistemsku terapiju, najčešće primenjenih oralno, biološka raspoloživost se definiše kao brzina i obim pri kojima lek dospeva u cirkulaciju iz određenog farmaceutskog oblika. Dermatološki lekovi, među kojima su kortikosteroidi (KS) veoma brojni, uključuju širok opseg preparata koji su formulisani za primenu na obolelu kožu, sa ciljem da ispolje lokalni efekat na mestu primene. U idealnom slučaju, cilj ovakve terapije je da se dostigne maksimalna koncentracija lekovite supstance u koži, uz njenu minimalnu perkutanu apsorpciju (1). Iz ovog razloga procena sistemske raspoloživosti (koncentracija leka u plazmi ili urinu) ne može da reflektuje lokalnu (kutanu) bioraspoloživost. Zapravo, koncentracije lokalno primenjenih lekova su često veoma niske (obično se nanosi 2-5 mg preparata/cm<sup>2</sup>), tako da koncentracije u serumu ili urinu nije moguće detektovati konvencionalnim analitičkim tehnikama. Dodatnu komplikaciju predstavlja nedostatak znanja o stvarnim koncentracijama leka (KS) potrebnim na/u koži, da bi se ostvario željeni terapijski efekat. Striktna definicija topikalne bioraspoloživosti podrazumeva trenutnu koncentraciju slobodnog leka na mestu delovanja (eng. *target site*), ali je vrednost ovog pristupa uglavnom teorijska, usled teškoće da se kvantifikuje lek unutar kože (1-3). Pitanje koje se nadovezuje je koje opcije su na raspolaganju za procenu biološke raspoloživosti i bioekvivalencije dermatoloških lekova, posebno KS?

Primena odgovarajućih tehnika koje su u stanju da relevantno procene obim penetracije/permeacije KS u/kroz kožu, od značaja je za anticipiranje potencijalne, neželjene sistemske apsorpcije iz određenog nosača/podloge, a usled mogućih interakcija podloge sa strukturama kože i promene njene propustljivosti za lek (4, 5). Dakle, procena penetracije i permeacije KS u/kroz kožu svoje mesto nalazi tokom različitih faza razvoja novog ili generičkog leka (6). Sem toga, *in vitro* i *in vivo* penetraciono-permeacioni profili KS su od značaja i za predlaganje optimalnog režima doziranja, tj. frekventnosti terapijske primene leka (7).

## Klasifikacija lokalno primenjenih kortikosteroida prema potentnosti

Lokalno primenjeni kortikosteroidi (topikalni) su najčešće korišćeni lekovi za tretman pacijenata sa inflamatornim oboljenjima kože. Poseduju antiinflamatornu aktivnost, imunosupresivne karakteristike i antiproliferativno delovanje, što je veoma korisno u tretmanu atopijskog ekcema dermatitisa, pruritusa, uboda insekata i psorijaze (8, 9). Najčešći neželjeni efekti topikalnih kortikosteroida su: atrofija, poremećaj u zarastanju rana, akneiformne erupcije,

hipopigmentacija, fotoosetljivost, kožne superinfekcije, kontaktni dermatitis, dok sistemska apsorpcija uzrokuje sistemske neželjene efekte (Kušingov sindrom, adrenalnu supresiju, usporavanje rasta i mnoge druge) (8).

Hidrokortizon (HC) je uveden u terapiju 1952. godine, kao prvi lokalno primenjen KS, sa velikim prednostima u odnosu na prethodno raspoloživu terapiju. KS halogenovani u poziciji C-6 i C-9, među njima prvouvedeni triamcinolonacetomid (TCA), predstavljali su revoluciju koja danas kumulira u pojavi potentnih kortikosteroida nove generacije, kao što su: mometazon furoat, budesonid, prednikarbat (PC), di-estri 17,21-HC aceponat i HC-17-butirat-21-propionat, metilprednizolon aceponat, alklometazon dipropionat i flutikazon propionat (8).

U Tabeli I dat je pregled najčešće korišćenih topikalnih kortikosteroida, prema njihovoj potentnosti.

**Tabela I** Relativna potentnost (koncentracija kao % (m/m)) formulacija sa kortikosteroidima (8)

**Table I** Relative potency (% concentration (m/m)) of formulations with corticosteroids (8)

Kortikosteroid	Koncentracija (%)
<b>Klasa 1 (veoma potentni)</b>	
Klobetazol propionat	0.05
Diflukortolon valerat	0.3
Fluocinolon acetomid	0.2
Halcinomid	0.1
<b>Klasa 2 (potentni)</b>	
Amcinomid	0.1
Betametazon valerat	0.1
Budesonid	0.025
Desonid	0.05
Dezoksimetazon	0.25
Diflorason diacetat	0.05
Diflukortolon valerat	0.1
Fluklorolon acetomid	0.025
Fluocinolon acetomid	0.025
Fluocinomid	0.05

Flupredniden acetat	0.1
Fluandrenolon	0.05
Flutikazon propionat	0.05
Halcinonid	0.01
Hidrokortizon butirat	0.1
Metilprednizolon aceponat	0.1
Mometazon furoat	0.1
Prednikarbat	0.25
Triamcinolon acetonid	0.1
<b>Klasa 3 (umereno potentni)</b>	
Alklometazon dipropionat	0.05
Beklometazon dipropionat	0.025
Beklometazon salicilat	0.025
Beklometazon benzoat	0.025
Betametazon dipropionat	0.05
Betametazon valerat	0.025 i 0.05
Klobetazon butirat	0.05
Dezoksimetazon	0.05
Flumetazon pivalat	0.02
Flupamerazon	0.3
Fluandrenolon	0.0125
Halometazon	0.05
Hidrokortizon butirat	0.1
Hidrokortizon aceponat	0.1
Hidrokortizon valerat	0.2
Triamcinolon acetonid	0.04
<b>Klasa 4 (blagi)</b>	
Deksametazon	0.01-0.1
Fluocinolon acetonid	0.0025
Fluokortin butil estar	0.75
Hidrokortizon (alkohol ili acetat)	0.1-1
Metilprednizolon	0.25
Prednizolon	0.5

Međutim, prema najnovijoj klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije kortikosteroidi namenjeni lokalnoj terapiji su prema potentnosti razvrstani na sledeći način (10):

- **Slabi (grupa I):** metilprednizolon, HC, prednizolon.
- **Umereno potentni (grupa II):** klobetazon, HC-butirat, flumetazon, fluokortin, fluperolon, fluorometolon, flupredniden, desonid, triamcinolon, alklometazon, HC- butirat, deksametazon, klokortolon.
- **Potentni (grupa III):** betametazon, fluklorolon, dezoksimetazon, fluocinolon acetonid, fluokortolon, diflukortolon, fludroksikortid, fluocinonid, budesonid, diflorazon, amcinonid, halometazon, mometazon, metilprednizolon aceponat, beklometazon, HC-aceponat, flutikazon, prednikarbat, difluprednat, ulobetazol.
- **Vrlo potentni (grupa IV):** klobetazol, halcinonid.

## **Penetracija i apsorpcija kortikosteroida iz lokalnih dermatoloških preparata**

Poznato je da što je veća potentnost steroidne molekule, veća je terapijska efikasnost, ali se mogu očekivati i veći neželjeni efekti. Rizik povezan sa primenom kortikosteroida, paralelno sa koristima od njihove terapijske efikasnosti i odnos rizik/korist u vezi su sa **potentnošću steroida i kapacitetom za perkutanu penetraciju, odnosno permeaciju kroz kožu i eventualnu perkutanu apsorpciju** (8).

Perkutana apsorpcija je preuzimanje aktivne supstance leka u sistemsku cirkulaciju posle dermalne primene. Odvija se u tri koraka (5):

- **penetracija**, koja podrazumeva ulazak supstance u određeni organ ili tkivo,
- **permeacija**, koja predstavlja penetraciju kroz jedan sloj u naredni, koji se i funkcionalno i strukturno razlikuje od prethodnog sloja
- **apsorpcija**, koja je preuzimanje supstance u vaskularni sistem (limfotok i ili krvotok), koji predstavlja centralni odeljak (eng. *compartment*).

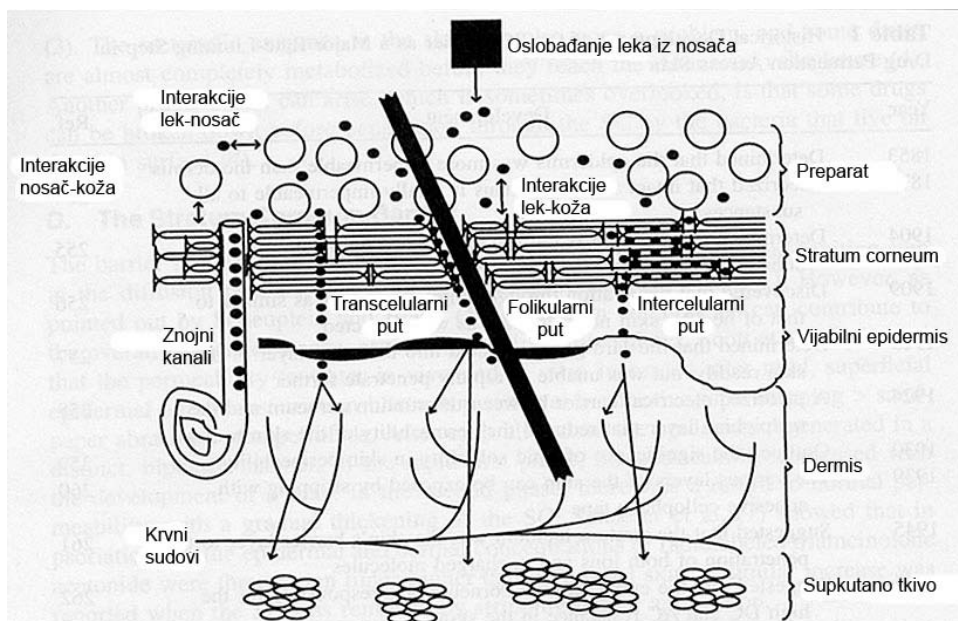
Faktori koji utiču na perkutanu apsorpciju supstanci kroz kožu su:

- struktura i stanje kože (bolesna vs. zdrava; intaktna vs. oštećena)
- fizičko-hemijske karakteristike penetranta

- fizičko-hemijske karakteristike nosača u koji je penetrant inkorporiran
- režim doziranja.

Superficialni sloj epiderma *stratum corneum* (SC) predstavlja glavni limitirajući korak (kutanu barijeru) na putu supstance u/kroz kožu. Transport kroz SC je uglavnom pasivan proces i fizičko-hemijska svojstva penetranta (lekovite supstance) će u mnogome odrediti njegovu sposobnost da penetrira i difunduje kroz membranu.

Smatra se da postoje tri glavna puta kojima supstanca može difundovati kroz SC: intercelularni (paracelularni), transcelularni put i put prolaska kroz priveske kože (eng. *transappendageal route*, put prolaska kroz pore) (Slika 1) (5).



Slika 1 Putevi prolaska leka kroz kožu (5)  
Figure 1 Drug pathways through the skin (5)

Proces perkutane apsorpcije obuhvata nekoliko transportnih "epizoda", od kojih se neke odigravaju u serijama, a druge teku simultano. Dve ključne determinante za prolazak supstance kroz membranu su njena **rastvorljivost i difuzivnost**. Relativna rastvorljivost neke supstance u dvema fazama različite polarosti (npr. oktanol/voda) određuje njen **particioni koeficijent**, od čega

zavisi verovatnoća i nivo preuzimanja lekovite supstance iz nosača nakon primene na kožu (SC). Takođe, rastvorljivost će odrediti da li će supstanca biti desorbovana iz SC-a u dublje slojeve kože. Difuzivnost je mera brzine kojom supstanca prolazi datu barijeru i na nju utiču vezivanje supstance za datu strukturu (substantivnost), viskoznost okruženja i vijugavost (dužina putanje) (5).

U prvom koraku transporta molekule moraju biti rastvorene u nosaču (podlozi), da bi se raspodelile iz podloge u lipidni matriks superficijelnih slojeva SC-a; zatim difunduju kroz SC i ponovo raspodeljuju (particija) između SC-a i vijabilnog epiderma. Potom, molekule difunduju kroz vijabilni epidermis i papilarni dermis i dospevaju do kapilarnog pleksusa. U većem procentu, deo supstance koja je dospela u derm, biva preuzeta u sistemsku cirkulaciju, dok manji procenat difunduje u dublja tkiva (Slika 1) (5). Međutim, **kada se KS primenjuju lokalno cilj je da lek ne dospe u sistemsku cirkulaciju.**

**Količina leka koji je permeirao kroz kožu u jedinici vremena, po jedinici površine, definiše se kao fluks – J (g/cm<sup>2</sup>s).** U slučaju perfektnih sink uslova fluks se računa prema jednačini koja je bazirana na *Fikovom I zakonu difuzije* (10):

$$dm/dt = q \cdot D \cdot dc/dx \quad \text{j-na 1.1.}$$

$$J = dm/(dt \cdot A) = (D_s \cdot C_0 \cdot K) / h \quad \text{j-na 1.2.}$$

$dm/dt$  = protok mase

$J$  = fluks leka (g cm<sup>2</sup>s).

$A$  = površina permeacije (cm<sup>2</sup>)

$D_s$  = prividni difuzioni koeficijent u koži (cm<sup>2</sup> s)

$C_0$  = početna koncentracija leka u donoru (g cm<sup>3</sup>)

$K$  = particioni koeficijent koža donor

$h$  = efektivna debljina kože (cm)

Iz jednačine se vidi da količina leka koja permeira kožu, dakle u stanju je da dospe i u sistemsku cirkulaciju, zavisi od koncentracije leka u podlozi. U Tabeli 1 date su terapijske koncentracije različitih KS, zavisno od njihove potentnosti. Jasno je da rastvorljivost KS, tj. odnos lipofilno-hidrofilnih

karakteristika (particioni koeficijent) diktira, s jedne strane, stepen disperziteta leka u podlozi (rastvor ili suspenzija), a s druge strane, rastvorljivost leka u SC-u, od čega zavisi fluks KS kroz kožu. Generalno, KS su lipofilni – u vodi slabo rastvorni lekovi, ali među njima postoje značajne razlike u polarnosti, pa npr. HC - jedan od polarnijih KS, po svom delovanju svrstan u blage (slabo potentne) KS, ima relativno visoke terapijske koncentracije (0.1-1%). Fluks KS kroz SC linerano je povezan sa koncentracijom supstance u podlozi, do granice njene rastvorljivosti u nosaču (saturaciona koncentracija). Nakon toga, pri višim koncentracijama supstance, kada je ona suspendovana, postiže se maksimalni fluks leka. Ovo znači da je perkutana apsorpcija kontrolisana **termodinamičkom aktivnošću leka**, kada podloga (nosač) nema uticaja na barijerna svojstva SC-a, tj. kada podloga ne stupa u interakciju sa kožom, što se u praksi ne dešava. Dakle, pored intrinzičnih svojstava određenog KS (molekulska masa, veličina i oblik molekula, lipofilno-hidrofilne karakteristike, tj. particioni koeficijent, jonsko stanje...) još niz faktora utiče na penetraciono-permeacione profile dermatoloških lekova, a time i KS (5):

- lek-vehikulum (podloga, nosač) interakcije
- vehikulum-koža interakcije
- lek-koža interakcije
- lek-vehikulum-koža interakcije.

**Lek – vehikulum interakcije** uključuju sve fizičke i hemijske reakcije koje mogu da se odigraju između molekula leka i konstituenasa formulacije, pri čemu je od primarnog značaja rastvorljivost leka u nosaču, odnosno stepen disperziteta leka u podlozi (rastvor, suspenzija, jonizovana ili nejonizovana supstanca). Od ovoga zavisi veličina koncentracionog gradijenta, koji se uspostavlja na granici vehikulum SC na mestu primene leka, što je neophodno za proces pasivne difuzije (11).

Vehikulum svojim sastavom može da deluje na oslobađanje leka, odnosno njegov difuzioni koeficijent u podlozi. Drugi efekti, kao što su isparavanje podloge, kinetika rastvaranja i fizičke promene nosača na mestu primene u funkciji vremena, takođe treba da budu razmotreni u tumačenju prolaska (fluksa) leka kroz SC kožu (5).

Veoma je teško razdvojiti interakcije leka i vehikuluma od interakcija komponenata podloge sa kožom (**vehikulum-koža interakcije**), odnosno SC-om, kada se razmatra sveukupni uticaj formulacije na penetraciono-permeacioni profil neke aktivne supstance. Poslednjih godina velika pažnja posvećena je ispitivanju uticaja koji na poboljšanje pogoršanje apsorpcije leka u koži imaju



konstituensi podloge. Generalno je prihvaćeno da oslobađanje leka može biti olakšano izborom onog vehikuluma koji ima mali afinitet za dato jedinjenje, ili onim u kome je supstanca najmanje rastvorna, mada treba istaći da su neke kontrolisane studije pokazale i sasvim obrnute rezultate od očekivanih (12). Neke studije su pokazale kako se značajno različiti potencijali za raspodelu leka postižu, i kada se isti lek u istoj koncentraciji inkorporira u topikalne formulacije različitih fizičko-hemijskih karakteristika, ili u slučaju kada se lek inkorporira u identične nosače, koji se razlikuju u mikrostrukturi matriksa, nakon različitih procedura homogenizacije (12).

**Idealna podloga/vehikulum** bi trebalo da ispuni više različitih funkcija: kozmetičku prihvatljivost, biokompatibilnost, hemijsku, mikrobiološku i fizičku stabilnost i sposobnost da lako oslobodi lek u SC (11). Efekat vehikuluma na raspoloživost leka verovatno je u najvećoj meri izražen kod topikalne primene, više nego i kod ijednog drugog puta primene leka. Svi konstituensi formulacije imaju manje ili više izražen potencijal da se raspodeljuju iz primenjene podloge i ulaze u SC. Moderne teorije raspodele lekovitih supstanci opisuju uticaj vehikuluma/podloge na kožu kroz primenu i ulogu **penetracionih inhensera (ubrzivača penetracije)**, koji su specifično dizajnirani da penetriraju u SC i olakšaju transport leka kroz barijerne slojeve (12). Međutim, treba naglasiti da i neki uobičajeni farmaceutski ekscipijensi, veoma česti u formulacijama podloga za KS, mogu uticati na povećanje permeabilnosti SC-a, bilo preko direktne i indirektno hidratacije (okluzija) kože, povećanja rastvorljivosti leka u SC-u, ili narušavajući intaktnost kožne barijere (propilen glikol, urea, mlečna kiselina, izopropil miristat, vazelin i tečni parafin, natrijum lauril sulfat (NaLS)...).

Poznato je da potentne molekule mogu biti klinički neefikasne, ukoliko se inkorporiraju u neodgovarajuću podlogu nosač, i obrnuto, poboljšanje terapijske efikasnosti se može postići pravilnim izborom podloge, kod inače slabo potentnih lekova. Uprkos željama formulatora ne postoji univerzalni vehikulum; svaki lek, u datoj koncentraciji, zahteva primenu jedinstvenog nosača za optimalnu terapiju (11, 12).

Topikalni KS je neefikasan sve dok ne penetrira u kožu. Oblasti sa povećanom permeabilnošću (skrotum, očni kapci, uši, skalp i lice) mogu bolje da odgovore na topikalnu primenu leka, nego one sa debljim SC-om (dlanovi i tabani). Faktori koji mogu da olakšaju apsorpciju steroida su hidratacija kože, okludiranje i oštećenje kože (13, 14). Sve ove promene mogu biti uslovljene karakteristikama podloge, odnosno nosača za kortikosteroidni lek.

## Metode za praćenje perkutane penetracije/permeacije i apsorpcije KS

Već je naglašeno da sposobnost lokalno primenjenog leka da ispolji svoj terapijski efekat zavisi od dva simultana fizička događaja. Lek najpre mora da difunduje iz nosača na površinu kože (da se oslobodi iz podloge), a zatim mora da permeira kožnu membranu do mesta delovanja (5). Brojne su studije koje su proučavale oslobađanje **HC-a** ili njegovih estara iz različitih topikalnih nosača, gde su kao relevantni razmotreni određeni formulacioni i procesni parametri (14, 16-18). Procenjeno je da su karakteristike nosača u direktnoj vezi sa liberacionim profilima, tako da se *in vitro* studija oslobađanja leka iz nekog nosača može koristiti kao rutinski test u kontroli kvaliteta različitih serija jednog istog proizvoda ili u proceni stabilnosti nekog sistema u funkciji vremena i uslova čuvanja (19).

Jasno je, međutim, da se ne može uspostaviti korelacija između *in vitro* studija oslobađanja i *in vitro* penetraciono/permeacionih studija (11, 14).

Postoji nekoliko mogućnosti da se dobiju informacije o penetraciji/permeaciji KS u/kroz kožu. Široko korišćena ***in vivo* metoda** u slučaju KS je **analiza izbeljivanja kože** (eng. *skin blanching assay*), gde se meri površina kože koja usled penetracije KS menja boju, zbog njihovog vazokonstriktornog efekta. Alternativa su **in vitro testovi penetracije/permeacije** korišćenjem "statičnih" ili "protočnih" vertikalnih difuzionih ćelija (Franz-ova difuzionna ćelija), uz primenu isečaka humane kože, humanog SC-a ili veštačke kože (eng. *skin construct; artificial skin*). U poslednje vreme sve više se kao potencijalno standardna *in vivo* metoda pimenjuje tzv. **metoda sa trakama** (eng. *tape stripping*), tehnika kojom se određuje koncentracija primenjenog leka u pojedinačnim slojevima SC-a, posle kratkotrajne aplikacije leka (oko 30 min). SC se uklanja sloj po sloj, sukcesivnom primenom traka, i u odlepljenim trakama određuje sadržaj (koncentracija) permeanta (1-5).

U narednim redovima biće dat kratak opis tehnika koje se primenjuju za praćenje penetracije/permeacije lokalno primenjenih lekova, kao i studija koje se odnose na neke često korišćene KS lekove.

### ***In vitro* metode**

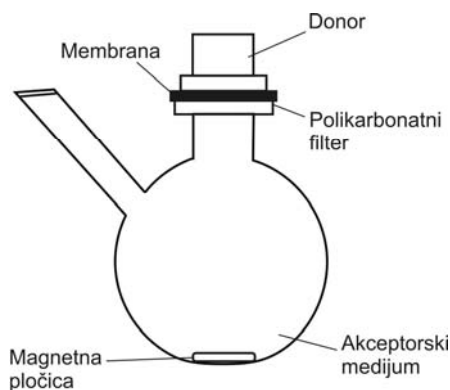
#### Difuzionna ćelija

Već je rečeno da je najčešći metod za procenu *in vitro* penetracije/permeacije upotreba difuzionih ćelija. Prednost ovog metoda je da su uslovi kontrolisani i jedine promenjive su upotrebljena membrana/koža i

ispitivani uzorak. Da bi *in vitro* test bio validan potrebno je da budu ispunjeni sledeći zahtevi (5):

- da su u receptroskoj fazi perfektni "sink" uslovi
- da je odvajanje donorske faze neznatno
- da je membrana homogena.

Najčešće je u upotrebi vertikalna Franz-ova statična difuziona ćelija sa volumenom receptorske faze od 2-10 ml i površinom membrane od 0.2-2 cm<sup>2</sup> (1-6, 11, 14, 16, 20-27) Dimenzije ćelije treba tačno izmeriti, zbog potrebnih preračuna, posebno treba obratiti pažnju na razblaživanje uzoraka i zamenu receptorskog medijuma svežim. Vertikalna Franz-ova statična difuziona ćelija (slika 2) je posebno korisna za ispitivanje apsorpcije iz polučvrstih formulacija koje se mogu homogeno raširiti na površini membrane (20).



**Slika 2 Modifikovana Franz-ova statična difuziona ćelija**  
**Figure 2 Modified Franz static diffusion cell**

#### Receptorski medijum

Idealna receptorska faza treba da obezbedi približnu simulaciju *in vivo* uslova. Generalno pravilo je da koncentracija permeanta u receptorskoj fazi ne bi trebalo da bude veća od približno 10% rastvorljivosti supstance. Prevelika koncentracija permeanta u receptorskoj fazi može da dovede do pada brzine apsorpcije, što može rezultovati u nepravilnoj proceni bioraspoloživosti leka. Najčešće korišćeni receptorski medijumi su fosfatni puferi pH vrednosti 6.80 ili 7.40, mada se zavisno od rastvorljivosti supstance mogu koristiti i drugi medijumi. Ako je rastvorljivost u vodi niža od 10 µg/ml, tada je vodeni medijum nepogodan i potrebno je, recimo, dodavati solubilizator ili koristiti tzv. "vodeni etanol". Ovo su posebne situacije kada treba uzeti u obzir da PAM ili

etanol iz receptorske faze mogu menjati barijernu funkciju kožne membrane (20).

#### Izbor membrane

1. **Isečak humanog SC-a:** SC je principijelno glavna barijera za penetraciju lekova i kozmetički aktivnih supstanci i zbog toga pogodan za testiranje perkutane penetracije. Budući "mrtvo" tkivo, moguće ga je čuvati i nakon izolacije u toku nekoliko meseci, bez dodatne obrade. Ovo pruža mogućnost komparativnog ispitivanja penetracije više različitih supstanci u toku dužeg vremenskog perioda sa isečcima SC-a istog donora (5).
2. **Isečak kože:** Upotreba cele kože je od koristi u testiranju veoma lipofilnih lekova za koje su epidermalni i dermalni slojevi značajna barijera za difuziju (28). Takođe, koristi se u ispitivanju perkutane penetracije jedinjenja, koja se uglavnom metabolišu u koži. Međutim, isečak kože se mora koristiti odmah nakon pripreme da bi se održala vijabilnost i enzimaska aktivnost tkiva, što predstavlja limitirajući faktor za širu upotrebu (5).
3. **Modeli lipida SC-a:** Kako je nepermeabilnost SC-a za većinu lekova uslovljena jedinstvenim sastavom lipidnog intercelularnog matriksa, rekonstruisanje sastava ove lipidne mešavine u istim proporcijama kao kod humanog SC-a moglo bi biti od koristi za testiranje perkutane penetracije. Prednost ovog metoda je prevazilaženje teškoća u pripremi isečaka humane kože ili SC-a; šta više prevazilaze se i interindividualne varijacije koje postoje između različitih donora (starost, pol, region tela...) (29).
4. **Koža dobijena kulturom ćelija** – veštačka koža (eng. *reconstructed, artificial skin, skin construct*): Druga alternativa za standardizovanje perkutane penetracije i prevazilaženje interindividualnih varijacija su rekonstruisani modeli humane kože, dobijeni kulturom ćelija. Upotrebom humanih keratinocita i fibroblasta moguća je kultivacija veštačke humane kože, koja ima permeabilne karakteristike komparativne sa humanim SC-om (30). Takođe, upotreba veštačke kože pogodna je za ispitivanje permeabilnosti lekova koji se metabolišu u vijabilnom epidermu (npr. KS prednikarbat) (11).

Pored napred opisanog, za dobijanje validnih rezultata *in vitro* studija penetracije/permeacije dermatoloških lekova od značaja su: tehnika primene permeanta (tehnika "finite" ili "infinite" doze), vreme trajanja eksperimenta (uobičajeno 24-48h), učestanost uzorkovanja (zavisi od rastvorljivosti leka, obično svaka 2h), broj ponavljanja (6-12 ćelija), temperatura (32°C) i analitička metoda za procenu koncentracije leka koji je penetrirao/permeirao membranu.

## ***In vivo* metode**

**Biološki odgovor:** Još jedan pristup da se odredi *in vivo* perkutano ponašanje leka je primena biološkog/farmakološkog odgovora. Ova metoda se primenjuje kod lekova koji izazivaju lako merivi biološki odgovor. Dobar primer je analiza vazokonstriktornog odgovora na terapiju KS. **Ova analiza se koristi efektom izbeljivanja zdrave kože (eng. *skin blanching*) nakon lokalne primene KS,** tj. procenjuje brzinu i obim difuzije leka u dermalnu vaskulaturu, a intezitet ovog efekta direktno koreliše sa topikalnom raspoloživošću KS. Merenje farmakodinamskog odgovora nakon nanošenja KS leka na kožu je široko prihvaćen pristup, odobren od strane Američke agencije za hranu i lekove (FDA) (31). Preporuka je da se koristi za procenu biekvivalentnosti različitih formulacija, ali i tokom razvoja novih KS lekova iz iste terapijske klase (1). Ukoliko se poredе dve formulacije koje sadrže isti KS u istoj koncentraciji, tada se formulacija koja proizvodi veći stepen izbeljenja kože smatra klinički efikasnijom. Novine u merenju efekta izbeljenja kože su da se pored tradicionalno korišćenog vizuelnog skora (subjektivna procena od strane treniranih dermatologa), danas široko i, uz preporuku FDA, koriste objektivne biofizičke metode, tj. neinvazivne tehnike bioinženjeringa kože, kao što je hromometrija (32). Takođe, predlaže se unapređenje FDA protokola dodatnom standardizacijom uslova merenja hromometrom i korišćenje tehnike digitalne "image" analize, primenom odgovarajućih softvera (32).

**Metoda sa trakama** (eng. *tape stripping*): Već je rečeno da se radi o *in vivo* tehnici kojom se adhezivnim trakama uklanjaju slojevi SC-a mikrometerske debljine (0.5-1  $\mu\text{m}$ ). Nakon kratkotrajnog kontakta dermatološkog leka sa kožom (oko 30 min) adhezivna traka se nanosi na površinu tretiranog mesta, blagim pritiskom da bi se osigurao dobar kontakt sa SC-om, i potom odlepljuje sloj po sloj SC-a naglim pokretom naviše. Procedura je relativno bezbolna i neinvazivna, uklanja samo izumrle korneocite uronjene u lipidni intercelularni matriks. Nakon ekstrakcije ispitivanog leka podesnim rastvaračem određuje se koncentracija leka koji je penetrirao u SC, sloj po sloj, tj. prati se tzv. dermatofarmakokinetika leka (DPK) (1)

Pored primene u proceni barijerne funkcije kože, ispitivanju patologije inflamatornih stanja ili neoplazmi kože, ispitivanju pH vrednosti različitih slojeva kože, praćenju ekspresije gena itd., metoda se predlaže za primenu u dermofarmakologiji za procenu nivoa lekova ili ekscipijensa koji penetriraju kožu iz dermofarmaceutskih preparata i zadržavaju se dominantno u SC-u. Kod KS lekova preporučena je kombinovana primena tehnike "tape stripping-a" sa merenjem farmakodinamskog odgovora (1). Za sada je ovo opisano u manjem broju studija za **HC** (33) i **betametazon dipropionat** (34).

Trenutno se ulažu veliki naponi da se metoda "tape stripping-a" standardizuje u meri dovoljnoj za oficijelno prihvatanje kao metod izbora za procenu biološke raspoloživosti i bioekvivalencije dermatoloških lekova (1).

## **Pimeri studija penetracije/permeacije KS različite potentnosti**

### **Hidrokortizon**

HC je jedna od najčešće korišćenih lipofilnih model supstanci, posebno u fundamentalnim ispitivanjima, koja se tiču objašnjenja mehanizama i puteva penetracije lipofilnih lekova u/kroz kožu, mada se u poređenju sa drugim KS, HC smatra "hidrosolubilnom" molekulom (4, 5, 17, 35). Takođe, često je korišćen model lek u ispitivanju uticaja tipa i strukture topikalnih nosača na profil oslobađanja slabo rastvornih supstanci (18), ili u cilju uspostavljanja validne *in vitro* metodologije za praćenje brzine oslobađanja leka iz dermatoloških preparata, odnosno FDA standardizovanog "dissolution" testa, koji bi bio korišćen u rutinskoj kontroli kvaliteta (19).

Pored toga, HC je verovatno najviše ispitivan KS lek kada su pitanju studije *in vitro* i *in vivo* penetracije/permeacije ili perkutane apsorpcije, bilo kao model lek u proceni novih ekscipijenasa – potencijalnih **penetracionih inhensera** ili nosača za primenu na kožu, bilo u studijama bioekvivalencije (4, 11, 14, 16-18, 21-27, 32, 33).

Intersantan je primer studije u kojoj je ispitivan uticaj mikrostrukture krema modifikovane hidrofилne masti sa vodom (eng. *water containing hydrophilic ointment* – WHS, DAB 1997) na oslobađanje i perkutanu penetraciju HC-21-acetata. Krem je modifikovan inkorporiranjem 10, 20 i 30% etanola u osnovnu formulaciju, zamenom odgovarajuće količine vode. Studijom je pokazano da se etanol inkorporira u interlamelarne prostore lamelarne gel faze, koja je u osnovi koloidne strukture krema, i da specifična mikrostruktura nosača i prisustvo etanola, kao penetracionog inhensera, u većoj meri utiču na penetraciju leka od ukupne koncentracije leka u podlozi (termodinamička aktivnost leka). Na ovaj način je pokazano da se modifikacijom farmakopejske formulacije podloge široko korišćene u magistralnoj praksi, može značajno uticati na penetracioni profil, takođe, često korišćenog dermatološkog leka (16).

Ista istraživačka grupa je dalje ispitivala uticaj razblaživanja 1% HC krema (mast sa vodom, WHS), drugim podlogama, takođe farmakopejskog kvaliteta (DAB 1998), na penetraciju HC-a kroz isečak humanog SC-a. Ova situacija je takođe veoma česta u magistralnoj praksi, kada se od farmaceuta zahteva da gotov lek razblažuje određenom podlogom. Rezultati ispitivanja su pokazali da razblaživanje osnovne formulacije drugim podlogama u različitim

odnosima nije od značaja za penetracioni profil HC-a, već dominantnu ulogu u penetraciji leka igra interakcija ekscipijenasa iz sastava podloga sa SC-om. Ovo može dovesti do promene integriteta SC-a, odnosno izmene saturacione koncentracije HC-a u samom SC-u (11, 14).

Isti osnovni nosač (WHS, DAB 1998) iskorišćen je nadalje za studiju uticaja pojedinih ekscipijenasa na penetraciju HC-a (1% (m/m)). Korišćeni su izopropil miristat (IPM) i izopropil alkohol (IPA) i njihove kombinacije. Neočekivano, pokazalo se da IPM usporava, tj. umanjuje penetraciju HC-a u SC, dok se IPA pokazao kao dobar penetracioni inhenser, a njihova kombinacija takođe kao efikasna (21, 22).

U novijim studijama, HC je korišćen kao model lek u proceni *in vitro* penetracije/permeacije kroz veštačke kože i u *in vivo* studiji farmakodinamskog efekta iz koloidnih nosača na bazi nove generacije prirodnih mešanih emulgatora, potencijalnih farmaceutskih ekscipijenasa (23-27).

Sve ove, kao i mnoge druge studije, imaju značaj u odabiru pogodnih ekscipijenasa i nosača za HC, kao slabo potentan ali često korišćen KS (Tabela 1), sa ciljem da se doprinese terapijskom efektu leka, a da se pri tom ne poveća rizik od pojave lokalnih ili sistemskih neželjenih efekata.

#### **Triamcinolon acetonid (TCA)**

Dobar primer studije u kojoj se koristi **in vivo "tape stripping" tehnika** jeste utvrđivanje efekta doze i preporučljivog režima doziranja za umereno do potentan KS –TCA. Eksperimenti su izvedeni na volarnoj strani podlaktice 15 zdravih ispitanika. U proceni efekta doze primenjene su dve koncentracije TCA 0.3 mg/cm<sup>2</sup> i 0.1 mg/cm<sup>2</sup> (rastvor TCA u acetonu), na po tri mesta po jednoj ruci. U eksperimentu procene učestanosti doziranja nanošena je jedna doza od 0.3 mg/cm<sup>2</sup>, ili tri doze po 0.1 mg/cm<sup>2</sup>. Uzorci SC-a su bili prikupljeni 30 min, 4 i 24h nakon nanošenja uzoraka, u prvom eksperimentu, a u drugom 4, 8 i 24h nakon aplikacije. Ispostavilo se da je zbog izražene sposobnosti TCA da se zadržava u SC (formiranje depoa), lek dovoljno primenjivati u nižoj od dve ispitivane koncentracije i to samo jednom u toku 24h (7).

#### **Prednikarbat (PC)**

U nedavno publikovanoj studiji (6), ispitivan je liberacioni i *in vitro* penetraciono/permeacioni profil potentnog KS – prednikarbata (0.25%) iz šest komercijalnih farmaceutskih preparata za lokalnu terapiju. Prednikarbat je lek koji se metaboliše u koži do prednizolon 17-etilkarbonata (P17EC), prednizolon 21-etilkarbonata (P21EC) i prednizolona (PD), tri produkta koji se razlikuju u potencijalu za vezivanje za receptorska mesta u koži i uticaju na keratinocite i fibroblaste. Poređeni su preparati inovatora (originalni lek) i generički preparati u obliku krema, masti sa vodom i bezvodne masti.

Ispitivanje brzine i obima oslobađanja leka iz različitih uzoraka sprovedeno je primenom sintetske membrane od celuloznog nitrata. Studija penetracije/permeacije sprovedena je primenom komercijalnih uzoraka rekonstruisanog humanog epiderma (EpiDerm<sup>®</sup>, MatTek Corp. SAD), sa dobro razvijenim SC-om. U oba slučaja korišćene su Franz-ove statične difuzione ćelije prečnika 15 mm, volumena akceptorske faze 12 ml, uz primenu "infinite dose" tehnike i fosfatnog pufera kao receptorskog medijuma (6).

Rezultati su pokazali da je redosled brzina oslobađanja PC u oba slučaja (originalni vs. generički lek) iz različitih farmaceutskih oblika: krem > bezvodna mast > mast sa vodom. Međutim, penetracija i permeacija PC kroz model rekonstruisanog epiderma nisu se odvijale na isti način kod obe grupe uzoraka. Manje preuzimanje PC zapaženo je kod generičkih proizvoda u obliku bezvodne i masti sa vodom, što je povezano sa narušenom enzimskom degradacijom PC do aktivnih metabolita. U zaključku autori ističu da je u slučaju lekova koji se u koži metabolišu nemoguće proceniti nivo preuzimanja leka od strane kože na osnovu ispitivanja brzine oslobađanja leka iz nosača, već jedino sprovođenjem kontrolisanih *in vitro* studija penetracije/permeacije uz primenu humane kože ili rekonstruisanog humanog epiderma (6).

## Literatura

1. Herkenne C, Alberti I, Naik A, Kalia ZN, Mathy F-X, Pr at V, Guy RH. In vivo methods for the assessment of topical drug bioavailability. *Pharm Research* 2008; 25: 87-103.
2. OECD, Skin absorption: in vitro method. Guideline 428, 2004.
3. OECD, Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. Series on Testing Assessment 28, 2003.
4. Bronaugh RL, Maibach HI. Topical absorption of dermatological products. New York, Marcel Dekker, 2002.
5. Roberts MS, Cross SE, Pellett MA. Skin transport. U: Walters KA (Ed.) Dermatological and transdermal formulations. New York, Marcel Dekker, 2002. pp. 89-195.
6. Lombardi Borgia S, Schlupp P, Mehnert W, Sch afer-Korting M. In vitro skin absorption and drug release – A comparison of six commercial prednicarbate preparations for topical use. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 68: 380-389.
7. Pellanda C, Ottiker E, Strub C, Figueiredo V, Rufli T, Imanidis G, Surber C. Topical bioavailability of triamcinolon acetone: effect of dose and application frequency. *Arch Dermatol Res* 2006; 298: 221-230.
8. Brazzini B, Pimpinelli N. New and established topical corticosteroids in dermatology. *Clinical pharmacology and therapeutic use. Am J Clin Dermatol* 2002; 3 (1): 47-58.



9. Leung DYM, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet* 2003; 361: 151-160.
10. World Health Organization Pharmaceuticals Newsletters, 2007.
11. Refai H. Dilution of semisolid preparations. Studies on the parameters affecting hydrocortisone release and permeation through excised human stratum corneum with emphasis on the influence of dilution. Dissertation, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, 2001.
12. Smith EW, Surber C, Tassopoulos T, Maibach H. Topical dermatological vehicles: a holistic approach. U: Bronaugh RL, Maibach HI. *Topical absorption of dermatological products*. New York, Marcel Dekker, 2002, pp. 457-463.
13. Rougier A, Lotte C, Maibach HI. In vivo relationship between percutaneous absorption and transepidermal water loss. U: Bronaugh RL, Maibach HI. (Eds.) *Topical absorption of dermatological products*. New York, Marcel Dekker, 2002, pp. 114-127.
14. Refai H, Müller-Goymann CC. The influence of dilution of topical semisolid preparations on hydrocortisone permeation through excised human stratum corneum. *Eur J Pharm Biopharm* 2002; 54: 143-150.
15. Lodén M, Maibach HI. (Eds.). *Dry skin and Moisturizers*. Boca Raton, CRC Press LLC, 2000.
16. Müller-Goymann CC, Alberg U. Modified water content containing hydrophilic ointment with suspended hydrocortisone-21-acetate – the influence of the microstructure of the cream on the in vitro drug release and in vivo percutaneous penetration. *Eur J Pharm Biopharm* 1999; 47: 139-143.
17. Raghavan SL, Trividic A, Davis AF, Hadgraft J. Effect of cellulose polymers on supersaturation and in vitro membrane transport of hydrocortisone acetate. *Int J Pharm* 2000; 193: 231-237.
18. Pillai R, Shah V, Abriola L, Caetano P, Flynn GL. Release of hydrocortisone from a cream matrix: dependency of release on suspension concentration and measurement of solubility and diffusivity. *Pharm Dev Technol* 2001; 6: 373-384.
19. Siewert M, Dressman L, Brown C, Shah V. FIP/AAPS guidelines for dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms. *Dissolution Technologies* 2003: 8-16.
20. Brain KR, Walters KA, Watkinson AC. Methods for studying percutaneous absorption. U: Walters KA (Ed.) *Dermatological and transdermal formulations*. New York, Marcel Dekker, 2002, pp. 197-269.
21. Brinkmann I, Müller-Goymann CC. Role of isopropyl myristate, isopropyl alcohol and a combination of both in hydrocortisone permeation across the human stratum corneum. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2003; 16: 393-404.
22. Brinkmann I, Müller-Goymann CC. An attempt to clarify the influence of glycerol, propylene glycol, isopropyl myristate and a combination of propylene glycol and isopropyl myristate on human stratum corneum. *Pharmazie* 2005; 60(3): 215-220.

23. Savić S. Fizičko-hemijski aspekti i in vitro/in vivo karakterizacija emulzionih nosača sa nejonskim emulgatorom tipa šećernog etra. Disertacija. Farmaceutski fakultet Beograd, 2004.
24. Savić S, Tamburić S, Vuleta G, Vesic S, Müller-Goymann CC. Effect of vehicle composition on in vitro/in vivo hydrocortisone penetration. *JEADV* 2005; 19 S2:P04.36.
25. Savić S, Vuleta G, Vesić S, Müller-Goymann CC. Effect of colloid microstructure of two multiphase emulsion systems on in vitro/in vivo hydrocortisone penetration. *Eur J Pharm Sci* 2005; 2551: 5225-5226.
26. Savić S, Savić M, Vesić S, Vuleta G, Müller-Goymann C. Vehicles based on a sugar surfactant: colloidal structure and its impact on in vitro/in vivo hydrocortisone permeation. *Int J Pharm* 2006, 320: 86-95.
27. Savić S, Savić M, Tamburić S, Vuleta G, Vesić S, Müller-Goymann CC. An alkylpolyglucoside surfactant as a prospective pharmaceutical excipient for topical formulations: The influence of oil polarity on the colloidal structure and hydrocortisone in vitro/in vivo permeation. *Eur J Pharm Sci* 2007; 30: 441-450.
28. Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. *Adv Drug Delivery Rev* 2004; 56: 603-618.
29. Glombitza B, Müller-Goymann CC. Influence of different ceramides on the structure of in vitro model lipid systems of the stratum corneum lipid matrix. *Chem Phys Lipids* 2002; 117: 29-44.
30. Ponc M, Boelsma E, Gibbs S, Mommaas M. Characterization of reconstructed skin models. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002; 15(Suppl 1): 4-17.
31. Guidance: topical dermatological corticosteroids: in vivo bioequivalence. Division of Bioequivalence, Office of Generic Drugs, Food and Drug Administration, Rockville, MD, 1995.
32. Haigh JM, Smith EW, Maibach HI. New developments in methodology available for the skin assessment of topical corticosteroid-induced skin blanching. U: Bronaugh RL, Maibach HI. (Eds.), *Percutaneous absorption drugs – cosmetics – mechanisms – methodology*, New York, Marcel Dekker, 1999, pp.487-498.
33. Caron D, Queille-Roussel C, Shah VP, Schaefer H. Correlation between the drug penetration and the blanching effect of topically applied hydrocortisone creams in human beings. *J Am Acad Dermatol* 1990; 23: 458-462.
34. Pershing LK, Lambert LD, Shah VP, Lam SY. Variability and correlation of chromameter and tape-stripping methods with the visual skin blanching assay in the quantitative assessment of topical 0.05% betamethasone dipropionate bioavailability in humans. *Int J Pharm* 1992; 86: 201-210.
35. Schmook FP, Meingassner JG, Billich A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in vitro percutaneous absorption. *Int J Pharm* 2001; 215: 51-56.

# Penetration and permeation of corticosteroids from pharmaceutical preparations for the skin application

Snežana Savić, Gordana Vuleta

Institute of Pharmaceutical technology and Cosmetology  
Faculty of Pharmacy, Belgrade

---

## Summary

As corticosteroids (CS) represent large and significant group of dermatological drugs with a number of indications, performing of *in vitro* and/or *in vivo* penetration/permeation studies is of a paramount importance in evaluation of new and generic drugs. Choice of an effective therapeutic dose with acceptable risk/benefit ratio as well as suitable regime of drug use or an adequate vehicle formulation are just some of numerous reasons for employing these studies. One of the current intentions is to improve and standardize *in vitro* studies with human stratum corneum (SC) or reconstructed human epiderm to reach the comparative level with *in vivo* evaluation of pharmacodynamic CS response (skin blanching assay) as well as with tape stripping technique. Skin blanching assay is FDA accepted and approved method for evaluation of bioavailability and bioequivalence of dermatological CS, with emphasized need for an additional standardization of studies using objective chromametric measurements. Also, actual research activities are directed to further optimization and validation of tape stripping method, as surrogate test for studying the bioavailability and bioequivalence of dermatological drugs and thus locally applied CS. The aim is creating of practical regulatory test, that is a challenge for the future.

**Key words:** corticosteroid; penetration; permeation; *in vitro*; *in vivo*; human SC; reconstructed human epiderm; skin blanching assay; tape stripping method

---