

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové



katedra farmaceutické technologie

Transdermální elektroporace cyklosporinu. I.

Bohumil Pavlík

Mgr. Bohumil Pavlík

konzultant: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Hradec Králové, únor 2006

Obsah

1. Úvod.....	2
2. Cíl práce	3
3. Teoretická část	4
3.1. Vlastnosti a struktura kůže.....	4
3.2. Elektrická charakteristika kůže	5
3.2.1 Konduktivita	5
3.2.2 Rezistance	6
3.3 Vstup a přestup látek do kůže	7
3.4 Rozpustnost cyklosporinu A	8
3.5 Topická a transdermální aplikace cyklosporinu.....	8
3.6 Mechanismy transdermálního transportu látek při elektroporaci	9
3.7 Cesty transportu	10
3.7.1 Nové vodní kanálky a elektropóry.....	10
3.7.2 Lokalizace transportu.....	10
3.7.3 Mechanismy molekulárního transportu	11
3.7.3.1 Elektroforetický pohyb	12
3.7.3.2 Difúze.....	12
3.7.3.3 Elektroosmóza.....	12
3.7.4 Parametry ovlivňující přenos látek při EP	12
3.7.4.1 Elektrické parametry	12
3.7.4.2 Tvar impulzu.....	12
3.7.4.3 Napětí impulzu, jeho trvání, počet impulzů a jejich tempo	13
3.7.4.4 Impulzní protokol.....	13
3.7.4.5 Design elektrody	14
3.7.5 Fyzikálněchemické vlastnosti látky	14
3.7.6 Potenciální klinické aplikace EP kůže	15
3.7.6.3 Kombinace urychlujících metod.....	17
3.7.6.4 Elektroporace a chemické urychlovače.....	17
3.7.6.5 Elektroporace a ultrazvuk	18
3.7.6.6 Elektroporace a iontoforéza	18
3.7.6.7 Bezpečnostní záležitosti spojené s kožní elektroporací	19
3.7.6.8 Závěr	20
4. Experimentální část.....	21
4.1. Použitá zařízení:	21
4.2. Použité suroviny.....	21
4.3. Testované vzorky	22
4.4. Biologický materiál.....	25
4.5. Uspořádání permeačních pokusů	25
4.6. Stanovení CyA	26
5. Dokumentace pokusů.....	27
6. Výsledky a diskuze	33
7. Závěry	36
8. Souhrn	37
9. Použité zkratky a symboly	38
10. Literatura.....	39

1. Úvod

Cyklosporin A (CyA) představuje již po řadu let jednu z nejdůležitějších látek s imunosupresivním účinkem. V současnosti se používá ve formě perorálních a injekčních lékových forem. Podání per os naráží hlavně na problémy spojené s vysokým jaterním first pass efektem, inaktivací vlivem změn pH v GIT a přítomností enzymatického aparátu v trávicí trubici. Hlavní nevýhodou injekčního podání je především krátký biologický poločas způsobený taktéž rychlou metabolizací játry.

Transdermální podání, jako možná aplikační cesta, by znamenalo možnost snížit nevýhody spojené s perorální a injekční aplikací. Topická aplikace CyA se zdá být výhodná pro léčbu psoriázy. Překážkou ovšem zůstává překonání bariérové funkce kůže vzhledem k poměrně vysoké molekulové hmotnosti a lipofilitě CyA. Kromě možnosti použití urychlovačů transdermální penetrace se nyní také zkoumá využití fyzikálních metod (ultrazvuk, iontoforéza a elektroporace).

Elektroporaci (EP) lze charakterizovat jako přechodné strukturální narušení membránové dvojvrstvy lipidů aplikací elektrických impulzů o vysokém napětí. Použití této metody ukázalo zvýšení transdermálního přenosu látek o několik řádů. EP rovněž, ať užitá sama, nebo i v kombinaci s jinými urychlujícími metodami, dokázala zvýšit množství látek přenositelných transdermálně, od malých molekul k makromolekulám, stejně jako lipofilní či hydrofilní, nabitě i neutrální molekuly. Molekulární transport přes přechodně zvýšeně permeabilní kůži je při EP založen hlavně na zvýšené difúzi a elektroforéze. Účinnost této metody závisí rovněž na elektrických parametrech a fyzikálně-chemických vlastnostech léčivých i pomocných látek. Aplikace EP in vivo je při impulzech o vysokém napětí dobře tolerována, dochází ovšem ke svalovým kontrakcím. Na komfort při humánní léčbě má samozřejmě vliv design elektrody a náplasti.

2. Cíl práce

1. V teoretické části podat aktualizovaný přehled informací o elektroporaci pro transport látek přes kožní membránu.
2. V experimentální části orientačně ověřit
 - 2.1 vliv elektroporace na transdermální průnik cyklosporinu A z prostředí mikroemulze za podmínek „finite dose“ a z prostředí nasyceného hydrofilního roztoku za podmínek „infinite dose“
 - 2.2 vybraných parametrů elektroporačního protokolu a
 - 2.3 vliv uložení elektrod na průnik cyklosporinu A, při zachování nízkých hodnot proudu akceptovatelných pro klinické využití.

3. Teoretická část

3.1. Vlastnosti a struktura kůže

Kůže, cutis (řec. derma) tvoří ochrannou vrstvu těla. Skládá se ze 4 hlavních vrstev: stratum corneum (rohová vrstva), epidermis (pokožka), dermis (škára) a tela subcutis (podkožní vazivo).¹

Stratum corneum (SC 10 μm až 15 μm) je silně hydrofobní vrchní vrstva kůže. Tvoří ji několik dílčích vrstev zploštělých keratinocytů zredukovaných na tuhý buněčný obal vyplněný vlákny keratinu a impregnovaný lipidy. Buňky uložené nejhluběji přiléhají na sebe velmi těsně a tvoří kompaktní vrstvu (stratum corneum conjunctum), zatímco buňky na povrchu jsou uloženy volně a lehce se odlupují (stratum corneum dysjunctum). Rohová vrstva zdravé kůže je vždy částečně hydratovaná, obsahuje průměrně 10 % vody. Toto množství je vázáno na hygroscopické sloučeniny obsažené v kožním tkanivu, jako jsou např. aminokyseliny, organické kyseliny nebo močovina. Lipidy rohové vrstvy tvoří 7-9 % celkové hmotnosti tkaniva. Skládají se převážně z volných a esterifikovaných mastných kyselin, sfingolipidů (ceramidů) a cholesterolu. Díky svému uspořádání představuje SC funkci hlavní bariéry pro látky z vnějšího prostředí a předpokládá se, že je hlavním limitujícím faktorem při penetraci látek kůží. Látky, které mohou penetrovat SC jsou většinou lipofilní s malou molekulovou hmotností.² Přes SC většinou neprojdou látky nabitě nebo ionizované.³

Epidermis je dlaždicový, vícevrstevný epitel, jehož buňky se směrem k povrchu stále více oplošťují a více rohovatějí. Má tloušťku kolem 200 μm .¹ Buňky v epidermis se nazývají keratinocyty a nacházejí se v různých stádiích diference. Z bazální membrány se neustále oddělují nové buňky, které migrují směrem k povrchu. Role epidermis jako kožní bariéry je závislá hlavně na intercelulárních lipidových kanálech, ale i na dalších faktorech, jako je např. rozpustnost léčiv. Léčiva pak mohou prostupovat z vrstvy do vrstvy.

Dermis je složená z vaziva se zvlněnými kolagenními a elastickými vlákny. Tato vrstva kůže je bohatá na krevní cévy, lymfatické cévy a nervová zakončení. Najdeme zde také fibroblasty, makrofágy, žírné buňky a leukocyty. Pro případnou absorpci léčiv mohou sloužit přítomné vlasové folikuly, potní a mazové žlázy.

Pod dermis se nachází **tela subcutis** (podkožní vazivo). Tvoří ho tkáň, která je také bohatě zásobena krevními a nervovými vlákny. V ní je uložena i tuková tkáň.

3.2. Elektrická charakteristika kůže

Elektrická charakteristika kůže vykazuje topografickou specifitu, se změnou polohy kůže dochází ke změnám elektrické konduktivity (schopnosti vést elektrický proud). Epidermis je odvozena od zárodečného listu embrya ektodermu, ale dermis a podkoží vznikají z mezodermu. Epidermis je typický endotel, úplně avaskulární a bez nervových struktur. Tvoří bariéru, která může být překážkou pro měření vodivosti, díky rezistanci (ohmický odpor), zvláště v rohové vrstvě. Dermis obsahuje cévy, různé druhy sensorických receptorů (buněk), které zprostředkovávají mechanické, termální a chemické stimuly.

Kůže je mozaikou, v níž jsou relativně uniformní vrstvy perforovány strukturami, které mají výrazně odlišnou konduktivitu. Kůže na tváři a ve vlasové části vykazuje nejméně rezistance, zatímco kůže na předloktí nejvíce. Kožní rezistance se výrazně snižuje v potních kanálcích a vlasových folikulech. Když jsou potní žlázy aktivované, např. při emocích, nervová aktivita se zvýší a dochází k vyplavování vody, sodíku a chloridových iontů a kožní rezistance se výrazně sníží a konduktance (vodivost) zvýší. Pro zajímavost, toto je základní princip detektoru lži.

3.2.1 Konduktivita

Elektrická konduktivita struktur těla je přímo závislá na iontovém obsahu a permeabilitě. Vnitřní prostředí těla je složeno z více jak 60 procent vody a volných elektrolytových iontů a je dobrým vodičem. Nepropustné SC zabraňuje ztrátě vody z vnitřních tkání. Díky svým izolačním vlastnostem slouží jako první topická bariéra. Suchá kůže je špatný konduktor a konduktivita stratum dysjunctum se výrazně mění se stavem hydratace.⁴

Některé práce naznačují, že existuje i druhá bariéra průniku látek a to sice v oblasti dermo-epidermálního spojení v bazální membráně, nebo i v samotných buňkách základní vrstvy. Witten⁵ ukázal, že po dlouhé expozici radioaktivních thoriových iontů bez použití iontoforézy, dosáhla radiační dráha pouze k tomuto dermo-epidermálnímu spojení a nikoli do dermis. Dermo-epidermální spojení se proto jeví jako efektivní bariéra proti průniku tohoto iontu. Fleischmajer a Witten ukázali, že ačkoliv thoriový ion nepronikl pasivní difúzí přes stratum conjunctum, při použití iontoforézy již pronikl. To, že v experimentu použití iontoforetického vedení pomohlo penetrovat buňky bazální vrstvy (nejhlubší vrstvy epidermis) může dokazovat, že právě zde je cesta, která výrazně přispívá k celkové konduktanci pokožky.

Nejvnitřější vrstva corium (dermis) je relativně bohatá na intercelulární cesty, kterými mohou být ionty volně přeneseny. Tato připravenost k permeabilitě iontů byla pozorována Papem a Kligmanem, ⁴ kteří zjistili, že kationové barvivo metylenová modř, když je vedeno pomocí silného elektrického proudu, migruje dolů kanálky až do úrovně dermis, kde již prochází laterálně (horizontálně). Pokud iontový proud dosáhne dermis, může poté v podstatě volně proniknout do celého těla. Snadná pasáž přes tento objemný konduktor znamená, že hlavní potenciální pokles při cestě proudu nastal ve vrstvě nad dermis.

Další významnou cestou, která přispívá ke konduktanci přes bariérovou vrstvu, představují kromě vlasových folikulů také potní žlázy.

3.2.2 Rezistance

Rezistance kůže lze pro zjednodušení popsat jako lineární závislost napětí na procházejícím proudu bez závislosti na frekvenci elektrického proudu. Gildermeister ⁶ ukázal, že rezistance kůže je ovšem více závislá na tzv. protisměrné elektromotorické síle, EMF, (counter-EMF electromotive force) generované při měření proudu a která vyplývá z polarizace membrán, k níž dochází díky různé pohyblivosti opačně nabitých iontů. Tento jev popisuje kapacitance, fyzikální veličina popisující kapacitní účinky elektrického kondenzátoru v obvodu se střídavým proudem. Díky použití takto názorného popisu lze vysvětlit pokles rezistance při měření vodivosti kůže.

Kožní elektrický odbor lze popsat jako obvod v němž je kondenzátor zapojen s odporem (rezistorem) sériově. Zvýšení protisměrné EMF je úměrné zvyšujícímu se proudu. Kapacitance a rezistance polarizačního prvku se mění s frekvencí elektrického proudu.

Měřitelné potenciálové rozdíly napříč kůží jsou pravděpodobně membránové potenciály na orientovaných bipolárních vrstvách. Ke zvýraznění potenciálu dojde při difúzních procesech, ve kterých mají ionty a elektrické komponenty různou mobilitu. Mohou se vytvořit na rozhraní mezi dvěma vrstvami tkání, např. dermo-epidermální rozhraní.

Při velmi nízkých proudech je tvořeno málo protisměrné EMF, se polarizace membrán neobjeví, nebo jen velmi málo, a měření rezistance ukazuje stabilní hodnoty. Předpokládá se, že měření kožní rezistance může být asociováno s polarizační kapacitancí.

Když při měření dosáhne proud vysoké úrovně a když jsou již membránové kanály saturovány ionty, měření membránové rezistance je tvořeno protisměrnou EMF, dochází ke snižování hodnoty rezistance. Při vyšších proudech konduktance a náboj kapacitance roste, rezistance se snižuje.

Je prokázáno, že pouze část napětí tvořeného na elektrodách projde kůží.⁷ Délka pulzu závisí současně na kapacitanci a rezistanci okruhu. Kapacitance závisí na kondenzátoru v okruhu a rezistance je v podstatě závislá na tomtéž, v našem případě tedy na kůži a roztoku v difúzní buňce.

3.3 Vstup a přestup látek do kůže

Léčiva vstupují do kůže transfolikulárně (přes vlasové folikuly a potní žlázy) nebo transepidermálně. U transepidermálního transportu můžeme ještě rozlišit vstup **intercelulární** (mezibuněčnými prostory epidermis) a intracelulární (buňkami epidermis). Největší část léčiv prochází intercelulárně a tento vstup se řídí, stejně jako vstup transfolikulární, zákony difúze⁸. Pro malé molekuly léčiv je hlavní cestou permeace přes intercelulárních prostorami. Je však doloženo, že pro některé molekuly je hlavní cesta vstupu intracelulární. Intercelulární prostory obsahují organizovanou směs lipidů, která poskytuje jak lipofilní tak hydrofilní domény. Nejvhodnějšími pro vstup a následující přestup látek kůží jsou malé, nedisociované molekuly s dobrou rozpustností ve vodě i v tucích. Tyto látky mají obvykle nízký bod tání, typicky méně než 200 °C.⁹

Mezi determinanty permeace léčiv kůží patří rozpustnost léčiva v jeho vehikulu, která podmiňuje jeho koncentraci, rozdělovací koeficienty léčiva mezi vehikulem a kůží, mezi jednotlivými vrstvami kůže a difúzní koeficient léčiva v kožních vrstvách.¹⁰

Co se týče rozpustnosti léčiva je výhodné, s ohledem na koncentrační spád, vytvořit ve vehikulu co nejvyšší (nasyčenou) koncentraci. Je-li léčivo ve vehikulu velmi dobře rozpustné může se tento fakt projevit při uvolňování a absorpci negativně. Při dobré rozpustnosti a tedy velké afinitě k vehikulu totiž léčivo přestupuje neochotně do prostředí, ke kterému má menší afinitu.¹

Rozdělovací koeficient mezi oktánolem a vodou vyjádřený jako $\log P$ také výrazně ovlivňuje permeaci látek. Sloučeniny s nízkou hodnotou $\log P$ vykazují nízkou permeabilitu, neboť jsou málo rozpustné v kožních lipidech. Také sloučeniny s vysokou hodnotou $\log P$ nejsou schopny překonat SC. Obecně akceptované rozmezí hodnoty $\log P$ pro maximální permeaci je mezi 1 a 3.⁹

Difúzní koeficient vyjadřuje vztah absorpce k molekulové hmotnosti daného léčiva. Léčiva s menší molekulovou hmotností vstupují do kůže ochotněji.¹

3.4 Rozpustnost cyklosporinu A

Cyklosporin A je neutrální látka, která je velmi málo rozpustná ve vodě ($< 0,04\text{mg/ml}$ při 25°C), rozpouští se v alkoholech a lipidech, vykazuje tedy silně hydrofobní vlastnosti.¹¹ Rozpustnost CyA lze zvýšit využitím kosolventů, micelizací a tvorbou komplexů. Jako kosolventy se používají organické sloučeniny, které jsou mísitelné s vodou. Ve své struktuře mají malé nepolární uhlovodíkové oblasti, které redukují schopnost vodního systému vytlačit nepolární rozpouštěné látky. Příkladem může být etanol, propylenglykol, tetrahydrofuryl, glycerin aj. Při micelizaci je léčivo zabudováno do struktury micel. Příkladem látky využívané pro zvýšení rozpustnosti CyA v používaných lékových formách je Cremophor EL®. Cremophor EL® je neionický solubilizátor a emulgátor, jehož hydrofobní část je tvořena glycerolpolyethylenglykolricinoleátem, kde hydroxylové skupiny polyethylenglykolu jsou esterifikovány mastnými kyselinami. Menší, hydrofilní část je zastoupena polyethylenglykolem a ethoxylovaným glycerolem. Hodnota HLB (hydrofilně-lipofilní rovnováhy je mezi 12-14). V neposlední řadě se nabízí tvorba komplexů s využitím cyklodextrinů (např. α -cyklodextrin) vytvářející malé dutiny pro nepolární alifatické části CyA.¹²

3.5 Topická a transdermální aplikace cyklosporinu

Topická aplikace CyA přináší oproti ostatním aplikačním cestám mnoho výhod zejména při léčbě dermatologických onemocnění, především psoriázy, atopické dermatitidy a kontaktní alergické dermatitidy. Systémová léčba těchto onemocnění je spojena s nežádoucími účinky – zejména nefrotoxicitou a hypertenzí. Topická aplikace by toxické projevy minimalizovala. Nespornou výhodou by bylo i obejití jaterního fist-pass efektu a zlepšení biologické dostupnosti. Problémem nejen u CyA, ale i u ostatních látek typu peptidů a proteinů je překonání bariérové funkce kůže.^{13 14} Molekulová hmotnost CyA je 1202. Bylo prokázáno, že látky s molekulovou hmotností větší než 500 obtížně penetrují do kůže (Daltonovo pravidlo).¹⁵

Vysoká lipofilita a velmi malá rozpustnost CyA ve vodě jsou zřejmě hlavní důvody, proč CyA při penetračních pokusech zůstává v kůži a jen malé množství ho pronikne do akceptorové fáze.

3.6 Mechanismy transdermálního transportu látek při elektroporaci

EP a elektropermeabilizací je označováno přechodné strukturální rozrušení membránové dvojvrstvy lipidů aplikací impulzů o vysokém napětí. Tento fenomén se vyskytuje v různých druzích membránových dvojvrstev jako např. umělé membrány (lipozomy), buněčné membrány (bakteriální, kvasinkové, rostlinné, zárodečné matečné buňky), nebo i ve více komplexní struktuře (stratum corneum). Elektrická expozice zahrnuje elektrické pulzující pole, které generuje transmembránový potenciál 0,5 V až 1 V a trvá 10 μ s až 10 ms. Díky strukturálnímu přeskupení buněčných membrán je pozorováno reverzibilní elektrické prolomení a zvýšený molekulární transport.¹⁶ Existuje hypotéza, že toto uspořádání je založeno na existenci dočasných vodních kanálků. Působením elektrického pole dochází k vytvoření pórů a také k působení místní hnací síly pro molekulární transport. První použití EP bylo provedeno in vitro ke vnesení DNA do buňky (genová terapie). Další zajímavé použití tkáňové EP představuje elektrochemoterapie, které se skládá z aplikace impulzů o vysokém napětí sloužící k permeabilizaci nádorových buněk při současném použití cytotoxických látek.¹⁷ Elektrochemoterapie se při eliminaci lokálních tumorů, např. na kůži,¹⁸ ukázala být více účinná než chemoterapie samotná.

EP byla navržena jako metoda pro transdermální přenos látek asi před 10 lety.¹⁹ Bylo prokázáno, že tato metoda je použitelná pro přenos látek přes stratum corneum, jako multilamelární vrstvu obsahující lipidové dvojvrstvy s několika fosfolipidy.^{19 20 21 22} Proto EP, stejně jako ultrazvuk a iontoforéza, zaujala místo mezi transdermálními technikami přenosu látek. Koncepce EP kůže a počáteční výsledky motivovaly následné studie in vitro a méně in vivo na zvířatech i lidech. Např. kombinace EP s dalšími urychlujícími metodami přináší nové perspektivy.^{23 24 25}

Stratum corneum jako hlavní bariéra transdermálního přenosu obsahuje přibližně 100 dvojvrstevných membrán a při jeho rozrušení může dojít k dramatickému ovlivnění průniku látek skrz celou kůži. Děje se tak při napětích od 30 V do 100 V (100 V do 1500 V), což dobře koresponduje s napětím využitým při EP na jednotlivých buňkách, tj. 0,3-1,0 V na jednu dvojvrstvu.^{19 26}

Díky EP mohou být v lipidových dvojvrstvách SC tvořeny nové vodní kanálky.^{16 22 27} Molekulární transport skrz přechodně permeabilní kůži je způsoben různými mechanismy, hlavně elektroforézou a zvýšenou difúzí.^{20 27 28} Rovněž se může uplatnit termální efekt.^{21 29}

3.7 Cesty transportu

3.7.1 Nové vodní kanálky a elektropóry

EP lipidových dvojvrstev indukuje dramatické a reverzibilní zvýšení transmembránového transportu a rovněž strukturální změny membránové bariéry.¹⁹ Byly popsány modely vysvětlující výrazné změny membránových vlastností, spojené s užitím proudu o vysokém napětí, spočívající ve tvorbě pórů či vodních kanálků. Důkazy tvorby těchto pórů nejsou stále úplně přesné a definitivní. Převažuje domněnka, že tyto póry jsou malé (< 10 nm), mají řídký výskyt (0,1% zkoumané plochy), a zpravidla mají krátké trvání (μs až ms).^{22 30 31}

V souladu s vlivy EP na jednotlivých lipidických dvojvrstvách, podporují experimentální i teoretická data hypotézu, že aplikace impulzů o vysokém napětí na kůži indukuje tvorbu nových anebo zvětšení již existujících vodních kanálků v SC.²² Kožní rezistance se během impulzů sníží o několik řádů a je částečně vratná. Ve srovnání s pasivní difúzí je in vitro transport zvýšen i o 4 řády. Efektivní plocha pro transport malých iontů je během EP přibližně 0,1 procent.^{32 33 34}

3.7.2 Lokalizace transportu

Při použití jakéhokoliv elektroporačního protokolu se ukazuje, že k transdermálnímu transportu dochází jen v určitých oblastech pokrývajících mezi 0,02 % až 0,25 % kožního povrchu.^{32 35} Jsou to tzv. **highly localized transport regions (LTR)**.

Permeabilizace v SC není homogenní ani uvnitř LTR. Hustota proudu a proto také transport látek je maximální v centru LTR. Popisuje se, že LTR jsou obklopeny rozptýlenými regiony tzv. **localized dissipation regions (LDR)**. Jsou to místa s malou rezistivitou (měrným odporem), kde dochází k transportu malých iontů.³⁶ Velikost a počet LTR je závislý na pulzním protokolu. Velikost LTR se zvyšuje s délkou trvání impulzu a počtem impulzů a je asi 0,1 mm a mezi 0,2 mm 2,5 mm pro krátké a dlouhé impulzy. Počet LTR se zvyšuje s napětím impulzu. Například LTR o počtu mezi 2 až 10 na cm² při delších impulzech o středním napětí se může změnit na 20 až 100 na cm² při krátkých impulzech o vysokém napětí.^{35 36 37}

Uvnitř LTR probíhá transport přes **intercelulární** nebo **transcelulární cesty**.^{32 35 36} Příspěvek každého dílčího typu transportu závisí na napětí impulsu. Zatímco se molekulární transport látek v případě krátkých impulsů o vysokém napětí děje transcelulárně, v případě poklesu napětí a delším trvání impulsu se zdá převládat intercelulární, s možným využitím přídatných transadnexálních cest.^{36 37} Přídatné makropóry potních a mazových žláz a vlasových folikulů jsou tedy dalšími možnými cestami průchodu elektrického proudu a jsou ovlivněny jeho napětím.^{38 39} Permeabilizující efekt EP na epidermální buňky představuje potenciálně také zajímavý způsob cílového topického léčení.^{40 41}

Molekulová hmotnost je další parametrem ovlivňujícím cestu transportu. Čím menší je molekulová hmotnost, tím více je upřednostňována intracelulární penetrace. Lombry a spol. dokázali,⁴² že FITC molekuly (nízká molekulová hmotnost) penetrují do keratinocytů, zatímco FITC-dextran o molekulové hmotnosti kolem 38 kDa penetroval hlavně okolo keratinocytů a pouze jeho malá frakce pronikla do buněk.

EP kůže je spojena s růstem **teploty** uvnitř LDR. Když je na kůži aplikováno elektrické pole, dojde k rozptýlení jeho energie a zvyšuje se teplota tkáně, kterou prochází. Toto lokální zvýšení teploty může mít vliv na bariérovou funkci kůže. Zvýšení teploty indukuje změny v sfingolipidech SC a dochází ke zvýšení permeability kůže. Ke dramatickému poklesu kožní rezistance dochází, je-li dosažena teplota 65 °C až 70 °C.^{29 43} Na příkladu krystalů citlivých na teplo se ukázalo, že při impulsu teplota na kožním povrchu neroste stejnoměrně, ale začíná po malých bodech, nejdříve na čelní linii.^{21 29} Pokud jsou transdermální napětí a pulzní čas zvyšovány konstantně, růst teploty směřuje k plató. Nedosáhne však hodnoty dostatečné pro skupenskou přeměnu vody.⁴⁴ Během chlazení se multilamelární systém úplně neobnoví, ale zůstanou v něm vodní domény, které vytvářejí vodní kanálky ještě dlouho po impulsu.^{29 44}

Biologický význam zahřívání SC přenosem tepla na sfingolipidy zatím není úplně vysvětlen. Při experimentech in vivo na odchlupené kůži krys při použití krátkých a dlouhých impulsů nedocházelo k významějšímu postižení kůže.⁴⁵

3.7.3 Mechanizmy molekulárního transportu

Při EP dochází k transportu látek přes přechodně permeabilní kůži různými mechanismy. Mezi hlavní patří zvýšená difúze při impulsu a po něm, elektricky vedený pohyb během impulsu, např. iontoforetický pohyb, a velice malá elektroosmóza. Podílí přispění elektroforézy a difúze závisí na fyzikálněchemických vlastnostech molekul.

3.7.3.1 Elektroforetický pohyb

Elektroforéza je hlavní hnací silou transportu elektricky nabitých molekul.^{19 20 46 47} Důkaz pro tento výrazný vliv elektroforézy spočívá v poklesu transportu při opačné polaritě elektrod.

3.7.3.2 Difúze

Zvýšený molekulární transport je v důsledku EP vysoce permeabilizovanou kůží způsoben také zvýšenou pasivní difúzí. V in vitro studiích bylo při impulzech dosaženo mnohem větší permeability, která přetrvávala ještě několik hodin. Důkazy pro přispění efektu postpulzní difúze na zvýšený transdermální přenos spočívají ve zvýšeném transportu např. při reverzní polaritě elektrod nebo u neutrálních molekul anebo je-li po aplikaci impulzů ještě přidána látka.^{46 47 48}

3.7.3.3 Elektroosmóza

Na rozdíl od iontoforézy je příspěvek elektroosmózy během EP malý. Krátký čas působení proudu při EP limituje roli elektroosmózy. Další důkazy pro tento malý vliv na transport látek se ukázaly při podobném anodickém a katodickém transportu neutrálních molekul.⁴⁸

3.7.4 Parametry ovlivňující přenos látek při EP

Elektrické parametry impulzu, fyzikálně-chemické vlastnosti látek a složení zásobníku látky jsou parametry dovolující kontrolu transdermálního přenosu látek při EP.

3.7.4.1 Elektrické parametry

Elektrické impulzy jsou charakterizovány elektrickými parametry: tvarem napěťové a proudové křivky (exponenciální rozložení, tzv. exponentially decaying pulses nebo obdélníkové vlny, tzv. square wave pulses), napětím (50 V až 1500 V), trváním (několik μ s až ms) a intervalem mezi impulzy (několik sekund až minut). Tyto elektrické parametry mohou být optimalizovány s ohledem na experimentální požadavky a klinickou aplikaci EP.⁴⁶

3.7.4.2 Tvar impulzu

Při EP jsou používány dva druhy impulzů: **exponentially decaying pulses** s exponenciálním rozložením křivky^{19 20 49} a **square wave pulses** – obdélníkové impulzy.¹⁷

18 50

Oba dva druhy jsou využívány pro různé aplikace, např. k přenosu látek kůží, elektrochemoterapii a pro genovou terapii. Díky dlouhému, pozvolnému profilu křivek jsou potenciálně výhodné ke zvýšení permeability kůže spíše pulzy exponenciálního tvaru. Trvání těchto impulsů závisí na rezistanci kůže a na elektroporačním systému (elektrody, kondukční medium), proto použití těchto pulzních podmínek může být pro klinické využití problém. Naproti tomu napětí délka trvání obdélníkových pulzů zůstává v kůži i v rezervoáru látky konstantní. Díky tomu umožňují square wave pulses lepší kontrolu a také reprodukovatelnost výsledků transportu látek kůží.

3.7.4.3 Napětí impulsu, jeho trvání, počet impulsů a jejich tempo

Řízení a kontrola transportu látek kůží může být dosaženo ovlivněním napětí impulsu, délkou jeho trvání, počtem a tempem impulsů. Vliv těchto parametrů na transport látek kůží in vitro byl sledován v mnoha studiích.^{19 20 40 46 51 52 53}

Protože uvnitř elektroporačního systému dochází k výraznému poklesu napětí, je transdermální napětí pouze část napětí aplikovaného na elektrody (cca 10 % až 50 %). Tento pokles závisí na relativní rezistanci kůže a zásobníku látky. Transdermální transport látek je zvýšen při zvýšené frekvenci impulsů, s vyšším počtem, napětím a delším trváním impulsu. Při vysokých napětích se s dalším zvyšováním napětí transdermální flux snižuje.^{19 46} Se zvýšením počtu impulsů a trvání impulsu se zvyšuje transport látek často lineárně.²⁰ Rovněž zvýšení tempa impulsů transdermální flux zvyšuje.^{20 37 51}

Elektrické parametry ovlivňují transdermální flux, ale také dobu začátku transportu, která se snižuje se zvyšujícím se trváním impulsu a tempem, ale je nezávislá na napětí^{37 51}.

3.7.4.4 Impulzní protokol

V literatuře jsou obvykle udávány dva typy impulzních protokolů. Dělí se hlavně podle trvání impulsu: 1) velký počet (více než 100), krátké trvání (1 - 2ms), impulzy o vysokém napětí, 2) nízký počet (méně než 20), dlouhé trvání impulsu (70 - 1000 ms), impulzy o středním napětí. V případě exponentially decaying pulses bylo při stejném elektr. náboji transportováno přes kůži při několika dlouhých impulzech obecně více molekul než při velkém množství krátkých impulsů³⁷.

3.7.4.5 Design elektrody

Design elektrody je stále kritické místo, zvláště pro zajištění účinnosti transportu látek a tolerance pro člověka. První výzkumy EP kůže byly provedeny in vitro s elektrodami umístěnými na obou stranách kůže. Takové uspořádání se ovšem nedá použít v in vivo podmínkách. Pro použití in vivo byly konstruovány různé elektrody a rezervoárové systémy, např. desková elektroda s kožním ohybem,^{41 54} dále různě stočené elektrody.⁵⁴ Design elektrody ovlivňuje transport látek distribucí elektrického pole a jeho intenzitou.^{55 56} Nejjednodušší uspořádání, na tvorbu více či méně uniformního elektr. pole, představuje desková elektroda. Při jejím použití může ovšem docházet ke stimulaci vespod ležících nervů a svalů a k podráždění horní části kůže.

Jsou preferovány inertní platinové elektrody před aktivními, např. elektrodou Ag/Ag. Při jejich použití dochází k oxidoredukci a k ovlivnění pH v rezervoáru látky.

3.7.5 Fyzikálněchemické vlastnosti látky

Kromě elektrických parametrů mohou transd. přenos ovlivnit rovněž fyzikálněchemické vlastnosti látky.

3.7.5.1 Náboj

Pohyb v elektrickém poli je mechanismem transportu nabitých molekul přes vysoce permeabilní kůži při elektroforéze. Proto jsou pKa látky a pH donorového roztoku základními parametry ovlivňujícími přenos elektricky nabitých molekul. Zvýšení náboje permeantu zvyšuje jeho transport. Aktuální pH zásobníku, které způsobuje ionizaci látky ovlivňuje transport elektricky nabitých částic. Při EP je transport neutrálních látek je urychlen také, a to díky pasivní difúzi přes permeabilizovanou kůži.⁴⁸ Ve srovnání s ionty je ovšem transport neutrálních molekul při EP nižší,.

Za fyziologických podmínek je kůže nabita záporně, proto se předpokládá lepší permeace pro kationty. Vzhledem ke krátkému trvání působení proudu je transport neutrálních látek je za přispění elektroosmózy limitované,⁴⁸ částečná selektivita permeace nemá na iontoforetický transport podstatnější vliv.

3.7.5.2 Lipofilita

Vliv rozdělovacího koeficientu permeantu na transport není dosud systematicky prostudován. Při pasivní difúzi vede zvýšení lipofility látky ke snížení transportu.

Transdermální fluxy nalbufinu a jeho proléčiv byly zvýšeny pomocí EP ve srovnání s pasivní difúzí. Celkové množství nalbufinu a jeho proléčiv bylo velmi podobné, ale se vzrůstající lipofilitou se snižoval stupeň přenosu.⁵³

3.7.5.3 Molekulová hmotnost

Další fyzikálně chemickou vlastností látky ovlivňující transdermální transport je molekulová hmotnost. Lombry a kol.⁴² dokázali, že při použití FITC-dextranu o vysoké molekulové hmotnosti (40 000) byl při aplikaci impulzů o vysokém napětí zaznamenán zvýšený transport a intracelulární penetrace. Obecně platí, že čím větší je molekulová hmotnost, tím nižší je transdermální transport. EP je ovšem potenciálně vhodnou metodou i pro přenos makromolekulárních látek.

3.7.5.4 Složení zásobníku látky

Koncentrace látky ovlivňuje transport při EP, proto její výběr v rezervoáru umožní kontrolovat přenos látky. Čím vyšší jsou koncentrace látky, tím vyšší bude transport. Závislost mezi množstvím přenesené látky a koncentrací v rezervoáru však není lineární.^{40 57}

Ionty přítomné v zásobníku (ionty pufru, protionty, ionty z pokožky) mohou s přenášenou látkou při elektroforetickém pohybu kompetovat. Proto výběr a optimalizace složení rezervoáru musí brát v úvahu ionizaci látky (pH), posun pH indukovaný u inertních elektrod (přítomnost požadovaného pufru), přítomnost kompetitivních iontů (iontová síla a složení roztoku) a konduktivitu (vysoká konduktivita ve srovnání s kůží). Proto je toto složení důležité pro urychlení transportu látek. Pro optimalizaci složení rezervoáru je důležité příslušné pH (ionizace látky), složení a kapacita pufru (počet přenesených iontů) a konduktivita pufru.^{20 46 50} Se zvýšením viskozity roztoku látky je při EP popisováno snížení transportu kůží.⁵⁷

3.7.6 Potenciální klinické aplikace EP kůže

Výrazně a reverzibilně zvýšená kožní permeabilita při EP znamená, že se látky mohou přenášet kůží v signifikantně větším množství. EP představuje slibnou cestu podání zvláště pro makromolekuly, proteiny a látky pro genovou terapii. EP může být rovněž užita pro topickou léčbu.

Je prováděn rozsáhlý výzkum EP in vitro. Jeho hlavní rysy jsou:

- vysoké fluxy pro mnoho různých komponent
- výrazně citlivý molekulární transport

- modulace transportu kontrolou elektrických parametrů a fyzikálně-chemických vlastností látky v rezervoáru

3.7.6.1 Transdermální přenos látek

Aplikace impulzů o vysokém napětí ukázala zvýšení transportu přes nebo do kůže pro následující substance o různé velikosti molekul:

malé - fentanyl, timolol ^{46 50}

střední - kalcein ¹⁹

makromolekuly - LHRH, kalcitonin, heparin, FITC-dextran (do molekulové hmotnosti 40 000) ^{42 58 59 60}

Zvyšuje se také transport pro lipofilní látky, (např. timolol), ⁵⁰ hydrofilní látky (např. metoprolol), ²⁰ pro nabité (např. heparin) ⁶⁰ a neutrální molekuly (např. mannitol). ⁴⁸

Transport látek se při EP zvýšil o 4 řády, s prodlouženým účinkem v řádu sekund až minut. Koeficient navýšení a rychlost začátku transportu závisí na elektrických parametrech impulzů a fyzikálně-chemických vlastnostech látky. Ovlivněním těchto parametrů lze kontrolovat transport látek kůží.

Podmínky pro transport in vitro se ukázaly být přenositelné do in vivo studií na základě potenciálního klinického využití. V první in vivo studii byl hodnocen transport calceinu do kůže krys. Flux kalceinu byl vyšší o dva řády ve srovnání s kontrolou ¹⁹. Další in vivo studie u krys zbavených chlupů, ukázala, že u fentanylu elektrické impulzy urychlily nástup účinku, prohloubily analgezii a prodloužily dobu účinku. ⁶¹

Studie in vitro i preklinická data ukazují, že EP může být užita k zvýšení transdermálního transportu a rovněž zvyšuje paletu látek, které mohou být přeneseny transdermálně na hydrofilní, nabitě molekuly a dokonce i na makromolekuly.

3.7.6.2 Topický přenos látek

Princip užití EP pro topický přenos je založen na permeabilizujícím efektu impulzů o vysokém napětí na lipidové dvojvrstvy, kromě toho na permeabilizaci hlavní kožní bariéry - stratum corneum a také na zvýšení permeability buněk ležících pod SC. První důkazy pro permeabilizaci buněk pochází z elektrochemoterapie při léčení subkutánních tumorů injekcí nepermeabilní cytotoxické látky bleomycinu, následované lokální aplikací impulzů o vysokém napětí. ¹⁷ EP je slibnou metodou pro substance obtížně pronikající do keratinocytů,

zvláště pro makromolekuly. EP rovněž zvýšila o jeden řád přestup CyA⁶² a také vitamínu C.⁶³

Elektroporací může být zvýšen topický přenos makromolekul. Elektrické parametry impulzu a koncentrace oligonukleotidu mohou ovlivnit množství oligonukleotidu přeneseného do živé tkáně kůže.^{47 64} Oproti iontoforéze, která permeabilizaci keratinocytů nepřináší, EP indukuje výrazný přenos oligonukleotidů do keratinocytů.⁶⁴ EP také zvyšuje topický přenos DNA v epidermis, indukuje intracelulární přenos plazmidů a zvyšuje genovou expresi.⁴¹ Exprese udávaných genů v epidermis trvala 7 dní.

Protože kůže je rovněž imunokompetentní orgán, je také zkoumána možnost imunizace intradermální nebo topickou cestou. Např. u toxinu cholery je vyvolána imunitní odpověď po pasivní difúzi antigenu aplikovaného topicky.⁶⁵ EP byla testována jako neinvazivní metoda imunizace antigenem, např. u difterického toxinu, kdy byla vyvolána tvorba vysoce specifických IgG protilátek.^{66 67}

3.7.6.3 Kombinace urychlujících metod

Současně s EP mohou být pro urychlení transportu užity různé fyzikální a chemické metody. Jejich mechanismus účinku spočívá :

- ve zvýšení kožní permeability (chemické urychlovače, ultrazvuk a EP)
- v poskytnutí hnací síly (ultrazvuk, iontoforéza a EP)²⁵

Každá z těchto metod dokáže zvýšit transport látek, očekává se jejich efektivní kombinace při vyšší bezpečnosti aplikace.

3.7.6.4 Elektroporace a chemické urychlovače

Jejich synergický efekt již byl popsán.^{25 68 69 70} Takové látky jsou odlišné od enhancerů běžně uváděných v literatuře. Patří sem polysacharidy (heparin a dextran), močovina, thiosíran sodný a fosfolipidy. Oproti tradičním chemickým urychlovačům pro pasivní transdermální přenos, nemusejí tyto urychlovače rozrušit strukturu lipidů, ale pouze stabilizují jejich přechodné porušení vzniklé při EP. Předpokládá se, že při kombinaci těchto dvou metod dochází k tvorbě větších vodních kanálků, anebo se prodlouží doba trvání elektropórů. Vanbever⁶⁹ a Weaver⁷¹ dokázali, že makromolekuly (heparin nebo dextran-sulfát) při EP zvýšily transdermální transport manitolu. Během pasivní difúze nebo při iontoforéze nebylo pozorováno žádné zvýšení. Je předpoklad, že makromolekuly interagují specificky s transportními cestičkami tvořenými při vysokém napětí. Zewert⁶⁸ ukázal, že došlo

k výrazným transdermálním fluxům makromolekul, když byl přítomen thiosíran sodný. To podporuje hypotézu, že dochází k tvorbě větších vodních kanálků. Aniontové fosfolipidy byly použity při EP k zvýšení transportu FITC-dextranu o molekulové hmotnosti 40 000. Mechanismus jejich působení je pravděpodobně dán interakcí s lipidy SC⁷⁰.

3.7.6.5 Elektroporace a ultrazvuk

Vzhledem k podobným mechanismům působení je kombinace ultrazvuku a EP méně slibná. Synergie mezi ultrazvukem a EP byla ovšem již popsána Kostem.⁷² Simultánní aplikace ultrazvuku a EP zvýšila transdermální transport kalceinu. Aplikace ultrazvuku redukovala práh bolesti při aplikaci napětí při EP.

3.7.6.6 Elektroporace a iontoforéza

Princip kombinace iontoforézy a EP je založen na odlišnosti mezi mechanismy účinku těchto metod. EP může specificky rozrušit lipidové dvojvrstvy kůže a tvořit nové cestičky do kůže a tak usnadňovat průchod proudu během následující iontoforézy, což vyústí ve vyšší transdermální transport.²⁵ Aplikací EP před iontoforézou bylo docíleno zvýšení transportu látek anebo zkrácení nástupu účinku. V několika případech neměla aplikace EP před iontoforézou na iontoforetický flux žádný efekt. Bommannan a kol.⁵⁸ studoval synergický vliv iontoforézy a EP na přenos LHRH in vitro. Aplikace jediného elektroporačního impulzu před působením iontoforézy konstantní intenzity vynesla 5 až 10krát vyšší fluxy. Zvýšená účinnost EP a iontoforézy byla připisována redukci impedance kůže, což je podíl napětí a proudu v obvodu se střídavým proudem (Ω). Chang a kol.⁵⁹ studoval vliv EP a iontoforézy na transdermální transport lososího kalcitoninu a parathyroidálního hormonu přes lidskou kůži. Pulzace o nízké voltáži (méně než 120 V) následovaná iontoforézou nevedla ke zvýšení transportu oproti iontoforéze samotné. Transdermální transport lososího kalcitoninu při pulzaci 15ti exponentially decaying pulses (1ppm) o napětí 500 V a trvání 200 ms následována iontoforézou vedla k rychlému nástupu transportu a vysokým fluxům. Fang a kol.⁷³ ukázal, že impulzy o vysokém napětí následované iontoforézou nevedly ke zvýšenému transportu nonivamidacetátu sodného oproti iontoforéze samotné, ale byl zaznamenán zkrácený nástup účinku. Efekt fyzikálněchemických vlastností látky u kombinace metod EP a iontoforézy byl nedávno popsán v dalších studiích.^{74 75} V případě buprenorfinu, jako vysoce lipofilní látky neukázala EP spolu s iontoforézou zvýšený transport skrz lidskou epidermis.⁷⁵ Denet a kol. srovnával efekt EP na iontoforetický přenos lipofilních a hydrofilních kationů

beta-blokátorů, např. timololu a atenololu. Byl pozorován nižší transport timololu oproti atenololu, při kombinaci EP a iontoforézy, než při iontoforéze samotné. Tento negativní efekt EP na iontoforetický transport timololu byl vysvětlen akumulací pozitivně nabitého timololu v kůži, což indukovalo snížení elektroosmotického fluxu během iontoforézy.

3.7.6.7 Bezpečnostní záležitosti spojené s kožní elektroporací

Velkou roli v terapeutické přijatelnosti transdermálního přenosu látek pomocí EP hraje její vliv na kůži a pod ní ležící tkáň. Na určení kožní tolerance elektrických impulzů jsou používány různé metody, např. vizuální zkoušení, měření elektrických vlastností kůže, histologické a ultrastrukturální studie a také klinické studie. Celkové změny na kůži po aplikaci impulzů o vysokém napětí jsou mírné a reverzibilní, ale dochází k svalovým kontrakcím.^{34 76} Když jsou impulzy o vysokém napětí aplikovány do kůže, dochází k výraznému poklesu kožní rezistance.^{19 26} Pro dlouhé impulzy a nebo středně dlouhé impulzy je pokles kožní rezistance částečně reverzibilní. Dochází k přetrvávajícím strukturálním změnám uvnitř LTR, díky kombinaci elektrického a termálního efektu.⁴⁴ Protože má SC o hodně vyšší rezistanci než pod ní ležící kůže a hlubší tkáň, elektrické pole aplikované na kůži se koncentruje v SC a v níže uložených živých tkáních má nižší intenzitu, což má pro ně ochranný efekt.

Nepříjemný pocit nebo i bolest byly popsány během EP při aplikaci proudu na kůži v těch případech, kdy došlo k přímé excitaci vespod ležících nervů a svalů. Zvýšení tempa pulzace, trvání impulzu nebo zvýšení napětí vedlo k zvýraznění pocitů jako svědění, brnění, píchání, svalovým kontrakcím nebo i zjevné bolesti³².

Kromě snížení kožní rezistance, bylo při použití exponenciálně tvarovaných pulsů pozorováno:

- zvýšení kožní hydratace
- dezorganizace lipidových dvojvrstev SC
- přechodné zhoršení bariérové funkce (zvýšená transepidermální ztráta vody)
- přechodné zvýšení průtoku krve.

Tyto změny jsou částečně reverzibilní.^{76 77} Nedávno byl rovněž zkoumán vliv obdélníkových (square wave) pulzů na kožní integritu in vivo⁷⁸. Efekt těchto impulzů byl shledán měkčí a reverzibilní. Tyto vlny indukovaly pouze mírné zhoršení bariérové funkce kůže.

Klinicky je již vyzkoušena aplikace impulzů např. při transkutánní elektrické stimulaci nervů, nebo elektrochemoterapii (8 x 1000 V/cm, 100 μs s deskovými elektrodami) a tyto

impulzy byly dobře tolerovány. Okamžitý efekt byl popsán u elektrod na kůži, který zmizel po několika minutách, nepříjemné byly hlavně svalové kontrakce. Pacienti nevyžadovali speciální kontrolu bolesti, protože snesitelná bolest zmizela hned po aplikaci impulzů.⁷⁹ Z toho vyplývá, že aplikace impulzů o vysokém napětí patrně indukuje nepříjemné pocity malé až střední intenzity, které spočívají hlavně ve svalových kontrakcích během impulzu a dochází také k přechodnému erytému.

Nechtěné vedlejší efekty mohou být redukovány designem elektrod a pulzním protokolem. Snížením intenzity elektrického pole působícího na SC mohou být redukovány svalové kontrakce a potenciální bolest. Zhang a kol.⁸⁰ dokázal, že při užití spirálových elektrod, může být dosaženo efektivního přenosu látek na citlivé oblasti penisu i bez anestezie. Design elektrody a podmínky elektrického přenosu by měly být optimalizovány s ohledem na cílovou oblast a medicínský požadavek, bez dyskomfortu léčby.

3.7.6.8 Závěr

Elektroporace je účinná metoda používaná k zvýšení transdermálního přenosu látek in vitro i in vivo a dovoluje zvětšit množství komponent, které mohou být přenesené transdermálně. Může být slibnou alternativou k neinvazivnímu podání makromolekul. V kombinaci s dalšími urychlujícími metodami může EP poskytnout vhodně řízený transport v souladu s požadavky léčby. Optimalizace pulzního protokolu a design elektrody mohou vést k redukci nežádoucích efektů, hlavně svalových kontrakcí.

4. Experimentální část

4.1. Použitá zařízení:

Lednička s mrazničkou Ardo	Ardo, Itálie
Analytické váhy	Sartorius, Göttingen
Digitální váhy	Kern, Albstadt
Digitální pH-metr BT 120	Elektronické přístroje, Havlíčkův Brod
Magnetická míchačka MM 2A	Laboratorní přístroje Praha
Liberační zařízení	FaF UK, Hradec Králové
Ultrazvuková lázeň	Tesla, Vráble
Vysokotlaké čerpadlo	Ecom, Praha
Dávkovací ventil D	Ecom, Praha
Kolonový termostat LCO 101	Ecom, Praha
UV-VIS detektor V4	ISCO, Lincoln
Osciloskop	Veleman, London
Generátor impulsů	RMI, Pardubice

4.2. Použité suroviny

Azid sodný p.a.	Fluka, Buchs
TRIS-pufr	Sigma-Aldrich, Praha
Acetonitril	Sigma-Aldrich, Praha
Propylenglykol	Kulich, Hradec Králové
Kyselina chlorovodíková 36%	Lachema, Neratovice
Voda čištěná	FaF UK, Hradec Králové
Tekutý parafin	Fluka, Buchs
Bílá vazelina	Kulich, Hradec Králové
Cyklosporin A č.š.14011CC0042019491	Ivax, Opava
Ethanol 96 %	
Cremophor El	Sigma-Aldrich, Praha

4.3. Testované vzorky

V in vitro permeační studii byly testovány následující roztoky cyklosporinu A (CyA) :

Permeace č.1 (kód 1P)

Složení donorového vzorku:

Cyklosporin A	10 %
Cremophor EL	35 %
Ethanol 96%	35 %
Voda pro inj.	30 %

Postup přípravy:

Nejprve jsem v kádince smísil Cremophor EL a ethanol. Potom jsem v této směsi rozpustil za použití magnetické míchačky CyA a po kapkách za stálého míchání přidal vodu.

Složení akceptorové fáze:

Azid sodný	0,002 %
Ethanol 96%	30 %
Voda pro injekce	70 %

Postup přípravy:

Ve vodě jsem rozpustil azid sodný. Potom jsem přidal ethanol 96 %.

Permeace byla prováděna v 6 buňkách. První dvě byly srovnávací vzorky (pasivní difúze) s označením permeace 1P1 a 1P2.

Do dalších buněk byly s odstupem 30 sekund aplikovány jednotlivé impulzy o napětí maximálně do 450V. Do buněk č. 3 a č. 4, označených jako 1P3 a 1P4 dva impulzy v čase 0 a 6 hod. Do buněk 5 a 6, označených 1P5 a 1P6, deset impulzů v čase 0 a 6 hod.

Permeace č. 2 (kód 2P)

Složení donorového vzorku:

Cyklosporin A	5 %
Cremophor EL	35 %
Ethanol 96 %	35 %
Voda pro inj.	30 %

Postup přípravy:

Nejprve jsem v kádince smísil cremophor EL a ethanol. Potom jsem v této směsi rozpustil za použití magnetické míchačky CyA a po kapkách a za stálého míchání přidal vodu.

Složení akceptorové fáze:

Azid sodný	0,002 %
Ethanol 96 %	30 %
Voda pro injekce	70 %

Postup přípravy:

Ve vodě jsem rozpustil azid sodný. Potom jsem přidal ethanol 96 %.

Permeace byla prováděna v 6 buňkách. První dvě byly srovnávací vzorky (pasivní difúze) s označením permeace 2P1 a 2P2, do dalších buněk byly aplikovány jednotlivé impulzy s odstupem 30 sekund o napětí maximálně 450V, do buněk č. 3 a č. 4, označených jako 2P3 a 2P4, dva impulzy v čase 0 a 6 hod. Do buněk 5 a 6, označených 2P5 a 2P6, deset impulzů v čase 0 a 6 hodin.

Permeace č. 3 (kód 3P): Provedení pokusu je stejné jako u permeace č. 2. Došlo ke změně v umístění elektrody.

Permeace č.4 (kód 4P)

Složení donorového vzorku:

Cyklosporin A	5 %
TRIS-pufr o pH7,1	50 %
Propylenglykol	50 %

Složení akceptorové fáze:

TRIS-pufr	50 %
Propylenglykol	50 %

Postup přípravy TRIS-pufru (pH 7,1) pro permeační pokusy:

Složení:

TRIS-pufr (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	24g/l
Azid sodný	0,02g/l
Kyselina chlorovodíková 36 %	q.s.
Ultračistá voda	1 l

Postup přípravy:

1. Po navážení potřebného množství TRIS-pufru a azidu sodného (konzervační přísada) se látky rozpustily v 1 litru ultračisté vody za použití magnetické míchačky.
2. Na kalibrovaném pH-metru bylo změřeno pH roztoku a za stálého míchání na magnetické míchačce upraveno pH roztoku pomocí 36 % kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 7,1.
3. Takto připravený pufr se uchovával v lednici při teplotě 5 °C a vždy před jeho použitím bylo znovu změřeno a případně upraveno pH.

Postup přípravy donorového vzorku:

Připravil jsem nasycený roztok CyA ve směsi TRIS-pufr a propylenglykol 1:1 přidáním 0,028 g CyA do 20g této směsi, za neustálého míchání na magnetické míchačce.

Permeace byla prováděna v 6 buňkách. První dvě byly srovnávací vzorky (pasivní difúze) s označením permeace 4P1 a 4P2, do dalších buněk byly aplikovány jednotlivé impulzy s odstupem 30 sekund o napětí maximálně 450 V , do buněk č.3 a 4, označených jako 4P3 a 4P4, dva impulzy v čase 0 a 6 hod. Do buněk 5 a 6, označených 4P5 a 4P6, deset impulzů v čase 0 a 6 hod.

Permeace č.5 (kód 5P)

Složení donorového vzorku:

Cyklosporin A	5 %
TRIS-pufr o pH7,1	50 %
Propylenglykol	50 %

Složení akceptorové fáze:

TRIS-pufr	50 %
-----------	------

Propylenglykol 50 %

Postup přípravy donorového vzorku:

Připravil jsem nasycený roztok CyA ve směsi TRIS-pufir a propylenglykol 1:1 přidáním 0,028g CyA do 20g této směsi, za neustálého míchání na magnetické míchače.

Permeace byla prováděna v 6 buňkách. První dvě byly srovnávací vzorky (pasivní difúze) s označením permeace 5P1 a 5P2, do dalších buněk byly aplikovány jednotlivé impulzy s odstupem 30 sekund o napětí 450V, do buněk č.3 a 4, označených jako 5P3 a 5P4, dva impulzy v čase 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 hod. Do buněk 5 a 6, označených 5P5 a 5P6, deset impulzů v čase 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 hod.

4.4. Biologický materiál

Vzorky lidské kůže byly získány z tkáňové banky Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Byly odebrány za aseptických podmínek pomocí dermatomu a uchovávány v tzv. vlhké komůrce při teplotě 4 °C po dobu nejdéle dvou týdnů. Potom byly kožní štěpy adjustovány do sáčků z polyethylenové folie, které byly po evakuaci zataveny a uchovávány při teplotě -20 °C.

4.5. Uspořádání permeačních pokusů

Jednotlivé vzorky kůže byly pro permeační pokusy fixovány mezi dvěma destičkami z plexiskla a umístěny do sestavy liberační buňky. Ta byla po naplnění akceptorovou fází umístěna do termostatové vodní lázně temperované na 37 °C a promíchávané magnetickým míchadlem. Objem akceptorové fáze byl odečítán s přesností 0,1 ml a činil 18 ml. Testované vzorky byly nanášeny v množství 1ml na vnější povrch kůže. Spoje mezi akceptorovými a donorovými částmi buňky byly utěsněny silikonovým adhezivním filmem. Vzorky akceptorové fáze byly odebírány v množství 0,6 ml ke stanovení CyA v časových intervalech 2,4,6,8,10,12 a 24 hod. nebo u poslední permeace po 1,2,3,4,5,6,7,12 a 24 hod. Úbytek tekutiny v buňce byl vždy nahrazen akceptorovou fází o stejném objemu (0,6 ml). Při konečných výpočtech bylo doplnění akceptorové fáze zohledněno při výpočtech korigovaných koncentrací.

4.6. Stanovení CyA

Jako analytická metodika pro stanovení CyA byla zvolena vysokoúčinná kapalinová chromatografie, kterou lze popsat takto:

Detekce: spektrofotometrická při 220 nm

Předkolona: LiChroCART® (Merck) o průměru 4mm

Kolona: LiChroCART®, s náplní LiChrosper® 100RP-18 o velikosti částic 5 µm

Mobilní fáze: acetonitril – 0,004M KH₂PO₄ v poměru 3:1, průtok 1,5 ml/min, tlak 11,5 MPa, teplota 70 °C

Objem nanášeného vzorku: 100 µl (dávkovací smyčka)

Před naplněním každé nově připravené mobilní fáze do chromatografické soustavy bylo provedeno odplynění na ultrazvukové lázni po dobu 10 až 15 minut.

Objem vzorku dávkovaného na kolonu smyčkou činil vždy 100 µl, přičemž každé stanovení bylo provedeno dvakrát. Kolona byla uložena v termostatu při 70 °C.

5. Dokumentace pokusů

Tab. 1: Výsledky permeací cyklosporinu A

Měření: 1P1

$V_o =$ 18

Kůže: I/03

Donor: CyA 10% + cremofor

PAS

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
2	0,015	0,6	0,015	2,6	1,3
4	0,060	0,6	0,061	10,9	5,4
6	0,077	0,6	0,079	14,3	7,1
8	0,094	0,6	0,097	17,4	8,7
10	0,457	0,6	0,460	18,5	9,2
12	0,093	0,6	0,109	19,5	9,8
24	0,105	0,6	0,108	19,5	9,8

Měření: 1P2

$V_o =$ 18

Kůže: I/03

Donor: CyA 10% + cremofor

PAS

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
2	0,1	0,6	0,013	2,6	1,3
4	0,1	0,6	0,087	15,7	7,9
6	0,1	0,6	0,096	17,2	8,6
8	0,1	0,6	0,089	16,0	8,0
10	0,1	0,6	0,092	16,5	8,3
12	0,1	0,6	0,097	17,5	8,8
24	0,1	0,6	0,105	18,9	9,5

Tab. 1: Výsledky permeací cyklosporinu A (pokračování)**Měření: 1P3** $V_0 = 18$

Kůže: I/03

Donor: CyA10% cremofor

EP

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
2	0,040	0,6	0,040	7,2	3,6
4	0,084	0,6	0,086	15,4	7,7
6	0,072	0,6	0,075	13,5	6,7
8	0,078	0,6	0,081	14,5	7,2
10	0,095	0,6	0,098	17,6	8,8
12	0,098	0,6	0,101	18,3	9,1
24	0,108	0,6	0,112	20,1	10,1

Měření: 1P4 $V_0 = 18$

Kůže: I/03

Donor: CyA10%
cremofor**EP**

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
2	0,057	0,6	0,057	10,3	5,2
4	0,050	0,6	0,052	9,3	4,7
6	0,061	0,6	0,063	11,3	5,6
8	0,130	0,6	0,132	23,8	11,9
10	0,066	0,6	0,070	12,6	6,3
12	0,076	0,6	0,078	14,1	7,0
24	0,113	0,6	0,115	20,8	10,4

Tab. 1: Výsledky permeací cyklosporinu A (pokračování)**Měření: 1P5** $V_o = 18$

Kůže: I/03

Donor: CyA10%
cremofofor**EP**

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
2	0,075	0,6	0,075	13,4	6,7
4	0,074	0,6	0,077	13,8	6,9
6	0,080	0,6	0,083	14,9	7,5
8	0,079	0,6	0,081	14,7	7,3
10	0,087	0,6	0,089	16,1	8,0
12	0,091	0,6	0,094	17,0	8,5
24	0,125	0,6	0,128	23,1	11,5

Měření: 1P6 $V_o = 18$

Kůže: I/03

Donor: CyA10%
cremofofor**EP**

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
2	0,108	0,6	0,108	19,5	9,8
4	0,070	0,6	0,074	13,2	6,6
6	0,077	0,6	0,080	14,3	7,2
8	0,086	0,6	0,089	15,9	8,0
10	0,082	0,6	0,085	15,4	7,7
12	0,083	0,6	0,086	15,5	7,8

Tab. 1: Výsledky permeací cyklosporinu A (pokračování)**Měření: 2P4** $V_0 = 18$

Kůže: 2/03

Donor: CyA 5%
cremofor**EPJJ**

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
2hod	0,096	0,6	0,096	17,2	8,6
4hod	0,133	0,6	0,136	24,5	12,2
6hod	0,162	0,6	0,166	29,9	15,0
8hod	0,153	0,6	0,158	28,5	14,2
10hod	0,161	0,6	0,166	30,0	15,0
12hod	0,182	0,6	0,187	33,7	16,8

Měření: 2P5 $V_0 = 18$

Kůže: 2/03

Donor: CyA 5%
cremofor**EPJJ**

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
2hod	0,067	0,6	0,067	12,1	6,0
4hod	0,115	0,6	0,117	21,0	6,5
6hod	0,072	0,6	0,076	13,7	6,9
8hod	0,083	0,6	0,086	15,4	7,7
10hod	0,082	0,6	0,085	15,2	7,6
12hod	0,078	0,6	0,081	14,5	7,3

Tab. 1: Výsledky permeací cyklosporinu A (pokračování)**Měření: 2P6** $V_o = 18$

Kůže: 2/03

Donor: CyA 5%
cremofor**EPJJ**

T	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
2hod	0,051	0,6	0,051	9,2	4,6
4hod	0,058	0,6	0,059	10,7	5,3
6hod	0,054	0,6	0,056	10,1	5,0
8hod	0,272	0,6	0,273	49,2	24,6
10hod	0,000	0,6	0,009	1,6	0,8
12hod	0,006	0,6	0,006	1,1	0,6

Měření: 3P4 $V_o = 18$

Kůže: 3/03

Donor: CyA 5%
cremofor**EP**

T	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
2hod	0,017	0,6	0,017	3,1	1,5
4hod	0,017	0,6	0,018	3,2	1,6
6hod	0,026	0,6	0,026	4,7	2,4
8hod	0,044	0,6	0,045	8,1	4,0
10hod	0,053	0,6	0,055	9,9	4,9
12hod	0,120	0,6	0,122	22,0	11,0

**Tab. 1: Výsledky permeací cyklosporinu A
(pokračování)**

Měření: 3P5

$V_o = 18$

Kůže: 3/03

Donor: CyA 5%
cremofofor

EPJJ

T	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
2hod	0,023	0,6	0,023	4,2	2,1
4hod	0,099	0,6	0,100	18,0	9,0
6hod	0,141	0,6	0,144	25,9	13,0
8hod	0,189	0,6	0,194	34,9	17,4
10hod	0,161	0,6	0,167	30,1	15,1
12hod	0,257	0,6	0,262	47,2	23,6

Měření: 3P6

$V_o = 18$

Kůže: 3/03

Donor: CyA 5%
cremofofor

EPJJ

T	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
2hod	0,004	0,6	0,004	0,7	0,4
4hod	0,019	0,6	0,019	3,4	1,7
6hod	0,027	0,6	0,027	4,9	2,5
8hod	0,040	0,6	0,041	7,4	3,7
10hod	0,044	0,6	0,045	8,2	4,1
12hod	0,111	0,6	0,113	20,3	10,1

6. Výsledky a diskuze

CyA je lipofilní neutrální undekapaptid s velmi nízkým transdermálně permeačním potenciálem. Třicetiprocentní podíl ethanolu ve prostředí akceptorové fáze zvyšuje rozpustnost této látky na více než 300 mg/l, což představuje potřebnou úroveň pro dosažení a udržení sink podmínek in vitro pokusů.

Konkrétní naměřené průběhy permeací 2P1, 3P1, 3P, 4P1 poskytly fluxy CyA zcela nezdůvodnitelně vysoké. Tyto permeace ukazovaly ve zpětné interpretaci typově jednoznačně na mechanické porušení celistvosti použité kůže (při odběru, při fixaci do permeační cely apod), proto byly z dalšího hodnocení zcela vypuštěny.

Naopak, v případě celého pátého permeačního bloku 5P1 až 5P5 byly fluxy CyA výrazně nízké a velmi nehomogenní. Zde zřejmě došlo při aplikaci více impulzů k tzv. zapečení pórů a množství CyA, které potom proniklo přes kůži, bylo na hranici detekovatelnosti. Také tyto permeační průběhy nejsou v dokumentační části předkládané práce uvedeny a jsou k dispozici v elektronické podobě u konsultanta této práce.

Vcelku přijatelné experimentální výsledky přinesla první sada permeací, ve které se podařilo ze šech šesti cel odebrat a naměřit konsistentní údaje. Jejich souhrn přináší tabulka 1.

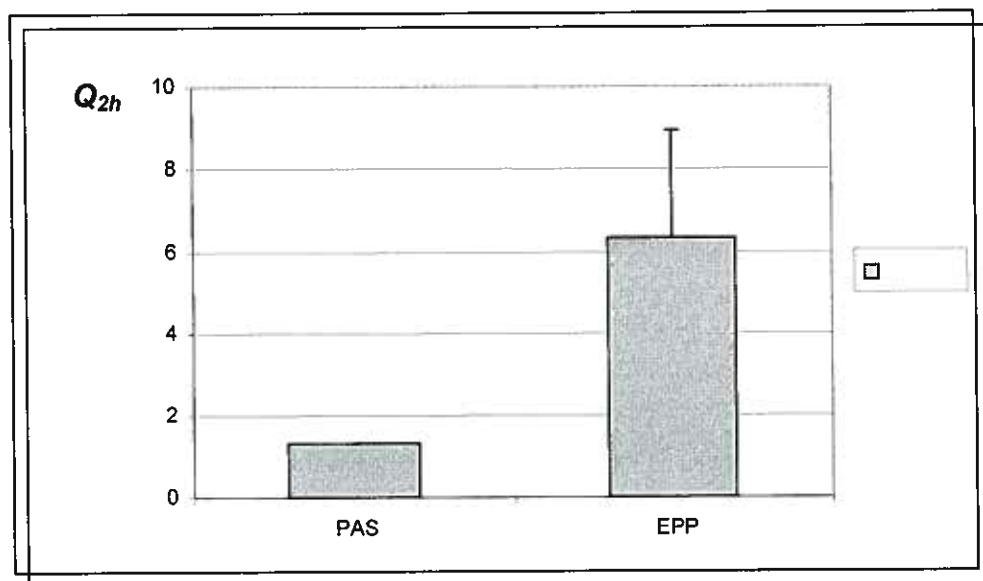
Tab. 1: Souhrnné výsledky pasivních a elektroporetických permeací cyklosporinu A (1P1 až 1P6)

	PASIVNÍ		EPP	
H	průměr Q_t	SEM	průměr Q_t	SEM
2	1,31	0,01	6,32	2,62
4	6,65	1,71	6,47	1,29
6	7,88	1,05	6,76	0,80
8	8,35	0,51	7,11	0,88
10	8,73	0,67	7,71	1,05
12	9,27	0,71	8,11	0,90
24	9,61	0,21	10,36	0,88

Z výsledků je zřejmé, že celkově pronikuvší množství CyA po dobu šesti a více hodin je v případě pasivní permeace srovnatelné s elektroporační při použití pulzačního protokolu.

Vliv úvodních impulzů na permeaci je měřitelný pouze po prvních dvou hodinách, jak názorně ukazuje obrázek 1. I přes malý počet hodnot a jejich variabilitu lze v tomto časovém intervalu považovat nalezenou rozdílnost hodnot koncentrací CyA za nápadnou. Interpretovat by ji bylo možné tak, že v prvních fázích permeace byl vliv elektroporace relativně silný a dočasně zvýšil permeované množství látky. V dalších fázích však došlo k vyrovnání, což může znamenat pouze opětovné uzavření pórů a následnou již pouze pasivní, tedy velmi nízkou permeaci.

Obr. 1: Srovnání nástupu pasivních a elektroporetických permeací po 2 hodinách od první pulzace podle Q_{2h}



Vliv dvou rozdílných pulzačních protokolů, uplatněných ve třetí permeační sadě, nebyl prokázán. To lze považovat za poučné především pro pravděpodobné uzavření permeačních cest jejich „zatavením“ v důsledku příliš velkého prošlého proudu.

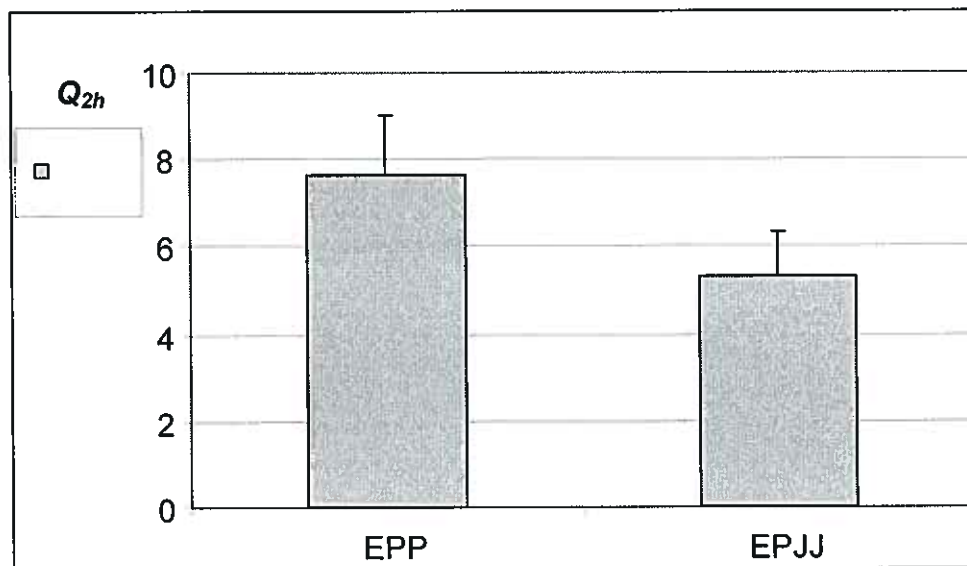
Oproti pasivní difúzi tedy použití EP nezvýšilo průnik CyA ani z prostředí mikroemulze tvořené cremophorem EL a etanolem 96% (v tomto prostředí je CyA výborně rozpustný). Dochází zde zřejmě ke kumulaci CyA ve vnitřních částech kůže. Také dobrá rozpustnost CyA v tomto roztoku je pravděpodobně překážkou jeho průniku do hlubších vrstev kůže. Rovněž z donorového prostředí TRISpufru a propylenglykolu, (CyA byl ve

formě nasyceného roztoku), použití EP nevedlo ve srovnání s pasivní difuzí k výraznějšímu průniku.

Nebyl prokázán rozdíl mezi aplikací dvou nebo deseti impulzů v čase 0 a 6 hod. V daném případě byly použity square wave pulses o délce trvání 10ms, v odstupu 30 sekund a napětí na generátoru impulzů 450 V, ale o nízké hodnotě proudu, řádově mA. Tato hodnota by měla být snesitelná pro aplikaci na kůži. Do budoucna se rýsuje jako vhodné použít pulzaci o delším trvání a v kratších rozestupech.

Pozitivním pokusným nálezem je naopak neprokázání rozdílu mezi hodnotami z elektroporace provedené v uspořádání analogickém tradiční kombinaci dvou jehlových elektrod (EPJJ) proti hodnotám nalezeným pro uspořádání s plochou elektrodou. Znamená to především potvrzení funkčnosti elektrody ploché. Orientační znázornění tohoto užitečného zjištění přináší obrázek 2. I v tomto případě byly pro znázornění vybrány hodnota naměřené po dvou hodinách od úvodní aplikace elektrických impulzů.

Obr. 2: Srovnání účinku ploché elektrody **EPP** a jehlové elektrody **EPJJ** na hodnoty Q_{2h} po 2 hodinách od první pulzace



Pomocí osciloskopu se podařilo rovněž ověřit, že proud, který se dostane do kůže, je výrazně nižší než proud tvořený v generátoru impulzů. Při prvních impulzech byla rezistance kůže vyšší než při aplikaci posledních impulzů.

7. Závěry

1. Transdermální průnik CyA nebyl použitím daného pulzačního protokolu EP dlouhodobě zvýšen. Rozdíly byly patrné pouze v odstupu 2 hodin od počátku permeace. Platí to pro donorové vzorky tvořené cremophorem EL a etanolem 96%, v nichž je CyA výborně rozpustný. Dochází zde zřejmě ke kumulaci CyA ve vnitřních vrstvách kůže. Rovněž z donorového prostředí směsi TRISpufru a propylenglykolu, v níž byl CyA ve formě nasyceného roztoku, nevedlo použití EP ve srovnání s pasivní difuzí ke zvýraznění průniku.

2. CyA je lépe rozpustný při použití akceptorového roztoku ethanolu a vody. Etanol může současně působit jako akcelerant permeace. V případě použití směsi TRISpufru a propylenglykolu 1:1 jako akceptorového roztoku je rozpustnost CyA minimální.

3. Nebyl prokázán rozdíl mezi aplikací dvou nebo deseti obdélníkových impulzů o délce trvání 10ms v čase 0 a 6 hodin, při odstupu 30 sekund a napětí na generátoru impulzů 450 V .

4. Nebyl prokázán rozdíl v průniku CyA při rozdílném uložení elektrod. Mezi elektrodou uloženou na kůži (povrchová elektroda) a mezi uložení elektrody na obou stranách kůže (jehlová elektroda).

4. Osciloskopicky byla ověřena fyziologicky přijatelná hodnota proudu při elektroporaci.

8. Souhrn

Efektivní topické podání cyklosporinu je považováno za terapeuticky atraktivní při léčbě psoriázy, naráží však na bariérové vlastnosti rohové vrstvy kůže. Potenciálně slibný přístup k řešení tohoto problému spočívá ve využití elektroporace. Práce přináší základní přehled současného stavu poznatků v oblasti transdermální elektroporace. V experimentu se věnuje testování průniku cyklosporinu při dvou pulzačních protokolech. Rozdíl mezi aplikací dvou nebo deseti obdélníkových impulzů o délce trvání 10ms v čase 0 a 6 hodin, při odstupu 30 sekund a napětí na generátoru impulzů 450 V se projevil pouze v období do 2 hodin od počátku permeace, dlouhodobější vliv nebyl prokázán. Při ověření významu uspořádání elektrod nebyl nalezen rozdíl mezi typem jehla-jehla a uspořádáním s plochou povrchovou elektrodou.

9. Použité zkratky a symboly

CyA		cyklosporin A
J, J	$[\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}]$	flux permeantu, průměrný flux permeantu
c_{nk}	$[\text{mg}/100\text{ml}]$	nekorigovaná koncentrace permeantu v akceptorové fázi
c_k	$[\text{mg}/100\text{ml}]$	korigovaná koncentrace permeantu v akceptorové fázi
t	$[\text{hod}]$	čas
Q_t	$[\mu\text{g}]$	množství permeantu prošlého kožní membránou
Q_t	$[\mu\text{g}/\text{cm}^2]$	množství permeantu prošlého přes 2 cm^2 kožní membrány
s_d		směrodatná odchylka
r		korelační koeficient
n		počet naměřených bodů
q	$[\text{mg}/\text{cm}^2]$	absolutní člen
V_0	$[\text{ml}]$	celkové množství akceptorové fáze
ΔV_{dop}	$[\text{ml}]$	množství doplňované akceptorové fáze

10. Literatura

- ¹ Chalabala, M. a kol.: Technologie léků, 2. vydání, Galén, Praha, 2001, s. 184 – 186 a 315 – 318
- ² R. H. Guy, J. Hadgraft, Transdermal drug delivery: the ground rules are emerging, *Pharm. Int.* 6 (1985) 112
- ³ P. M. Elias, Epidermal lipids, barrier function, and desquamation, *J. Invest. Dermatol.* 80 (1983) 40 – 49
- ⁴ C. M. Papa and A. M. Klingman, *J. Invest. Dermatol.*, P9, 139 (1962)
- ⁵ V. H. Witten, M. S. Ross, E. Oshry, and A. B. Hyman, *J. Invest. Dermatol.*, 17, 311 (1951)
- ⁶ M. Gildemeister, *Pfl. Arch. Physiol.*, 162, 489 (1915)
- ⁷ U. Pliquett, R. Langer, J. C. Weaver, Changes in the passive electrical properties of human stratum corneum due to electroporation, *Biochem. Biophys. Acta* 1239 (1995) 111 – 121
- ⁸ Foldvari, M.: Non-invasive administration of drug through the skin: challenges in delivery system design. *Pharm. Sci. Technol. Today*, 3 (12), 2000, s. 417 – 425
- ⁹ Thomas, J.B., Finnin, B.C.: The transdermal revolution. *Drug Disc. Today*, 9 (16), 2004, s. 697 – 703
- ¹⁰ Berka, P.: Studium bioekvivalence topických přípravků s ibuprofenem (Diplomová práce), Hradec Králové 2001, Univerzita Karlova, Fakulta farmaceutická, 80 s.
- ¹¹ Da-Peng, W. Cheby-Yi, L. Dah-Lu, Ch.: Effect of various physical/chemical properties on the transdermal delivery of cyclosporin through topical application. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 23 (1), 1997, s. 99 – 106
- ¹² Ran, Y., Lhao, L., Qing, X., Yalkowsky, S. H.: Solubilization of cyclosporin A. *Pharm. Sci. Technol. Today* 2 (1). 2001 2
- ¹³ Wang, S., Kara, M., Krishnan, T. R.: Transdermal delivery of cyclosporin A using electroporation, *J. Control. Rel.*, 50, 1998, s. 61 – 70
- ¹⁴ Billich, A., Vypel, H., Grassberger, M., Schmook, F. P., Steck, A., Stuetz, A.: Novel cyclosporin derivatives featuring enhanced skin penetration despite increased molecular weight. *Bioorg. Med. Chem.*, 13 (9), 2005, s. 3157 – 3167
- ¹⁵ Gupta, A. K., Ellis, Ch. N., Goldfarb, M. T., Cooper, K. D., Rocher, I., Brown, M. D., Baadsgaard, O., Voorhees, J. J.: Cyclosporine A. *Clin. Dermatol.*, 7 (3), 1989, s. 98 – 110
- ¹⁶ J.C. Weaver, Y. A. Chizmadzhev, Theory of electroporation: a review, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 41 (1996) 135 – 160
- ¹⁷ L. Mir, S. Orlowski, Mechanisms of electrochemotherapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35 (1999) 119 – 129
- ¹⁸ R. Keller, R. Gilbert, M.J. Jaroszeski, Clinical applications of electrochemotherapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35 (1999) 119 – 129
- ¹⁹ M. R. Prausnitz, V.G. Bose, R. Langer, J.C. Weaver, Electroporation of mammalian skin: a mechanism to enhance transdermal drug delivery, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 10504 – 10508
- ²⁰ R. Vanbever, N. Lecouturier, V. Pr at, Transdermal delivery of metoprolol by electroporation, *Pharm. Res.* 11 (1994) 1657 – 1662
- ²¹ U. Pliquett, Mechanistic studies of molecular transport due to skin electroporation, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35 (1999) 41 – 60

- ²² J. C. Weaver, T. E. Vaughan, Y. A. Chizmadzhev, Theory of electrical creation of aqueous pathways across skin transport barriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35 (1999) 21 – 39
- ²³ B. W. Barry, Novel mechanisms and device to enable successful transdermal drug delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* 14 (2001) 101 – 114
- ²⁴ A. Banga, S. Bose, T. Ghosh, Iontophoresis and electroporation: comparisons and contrasts, *Int. J. Pharm.* 179 (1999) 1 – 19
- ²⁵ S. Mitragotri, Synergistic effect of enhancers for transdermal drug delivery, *Pharm. Res.* 17 (2000) 1354 – 1359
- ²⁶ U. Pliquet, R. Langer, J.C. Weaver, Changes in the passive electrical properties of human stratum corneum due to electroporation, *Biochim. Biophys. Acta* 1239 (1995) 111 – 121
- ²⁷ Y. A. Chizmadzhev, V. G. Zarnytsin, J.C. Weaver, R. O. Potts, Mechanism of electroinduced ionic species transport through a multilamellar lipid bilayer system, *Biophys. J.* 68 (1995) 749 – 765
- ²⁸ R. Vanbever, N. De Morre, V. Pr at, Transdermal delivery of fentanyl by electroporation: II. Mechanisms involved in drug transport, *Pharm. Res.* 13 (1996) 1359 – 1365
- ²⁹ U. Pliquet, C. Gusbeth, Perturbation of human skin due to application of high voltage, *Bioelectrochemistry* 51 (2000) 41 – 51
- ³⁰ J. C. Weaver, Electroporation: a general phenomenon for manipulating cells and tissues, *J. Cell. Biochem.* 51 (1993) 426 – 435
- ³¹ J. C. Weaver, Electroporation theory: concepts and mechanisms, in: J. A. Nickoloff (Ed.), *Molecular Biology: Methods*, vol. 55, Humana Press, Totowa, 1995, pp. 3 – 28
- ³² M. R. Prausnitz, The effects of electric current applied to the skin: a review for transdermal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 18 (1996) 395 – 425
- ³³ U. Pliquet, J. C. Weaver, Electroporation of human skin: simultaneous measurement of changes in the transport of two fluorescent molecules and in the passive electrical properties, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 39 (1996) 1 – 12
- ³⁴ R. Vanbever, V. Pr at, In vivo efficacy and safety of skin electroporation, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35 (1999) 77 – 78
- ³⁵ U. Pliquet, T. E. Zewert, T. Chen, R. Langer, J.C. Weaver, Imaging of fluorescent molecule and small ion transport through human stratum corneum during high voltage pulsing: localized transport regions are involved, *Biophys. Chem.* 58 (1996) 185 – 204
- ³⁶ U. Pliquet, R. Vanbever, V. Pr at, J.C. Weaver, Local transport regions in human stratum corneum due to short and long high-voltage pulses, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 47 (1998) 151 – 161
- ³⁷ R. Vanbever, U. F. Pliquet, V. Pr at, J. C. Weaver, Comparison of the effects of short, high-voltage and long medium voltage pulses on skin electrical and transport properties, *J. Control. Rel.* 69 (1999) 35 – 47
- ³⁸ Y. A. Chizmadzhev, A. V. Indenbom, P.I. Kuzmin, S. V. Galichenko, J. C. Weaver, R.O. Potts, Electrical properties of skin at moderate voltages: contribution of appendageal macrophores, *Biophys. J.* 74 (1998) 843 – 856
- ³⁹ Y. A. Chizmadzhev, P. I. Kuzmin, J. C. Weaver, R. O. Potts. Skin appendageal macropores as a possible pathway for electrical current, *J. Invest. Dermatol. Symp.* 3 (1998) 148 – 152
- ⁴⁰ V. Regnier, T. De Doan, V. Preat, Parameters controlling topical delivery of oligonucleotides by electroporation, *J. Drug Targ.* 5 (1998) 275 – 289

-
- ⁴¹ N. Dujardin, P. Van der Smissen, V. Preat, Topical gene transfer into rat skin using electroporation, *Pharm. Res.* 18 (2001) 61 – 66
- ⁴² C. Lombry, N. Dujardin, V. Preat, Transdermal delivery of macromolecules using skin electroporation, *Pharm. Res.* 17 (2000) 32 – 37
- ⁴³ G. T. Martin, U. F. Pliquett, J. C. Weaver, Theoretical analysis of localized heating in human skin subjected to high voltage pulses, *Bioelectrochemistry* 57 (2002) 55 – 64
- ⁴⁴ U. F. Pliquett, G.T. Martin, J. C. Weaver, Kinetics of the temperature rise within human stratum corneum during electroporation and pulsed high-voltage iontophoresis, *Bioelectrochemistry* 57 (2002) 65 – 72
- ⁴⁵ R. Vanbever, D. Fouchard, A. Jadoul, N. De Morre, V. Pr at, J.-P. Marty, In vivo noninvasive evaluation of hairless rat skin after high-voltage pulse exposure, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 11 (1998) 23 – 34
- ⁴⁶ R. Vanbever, E. LeBoulenge, V. Preat, Transdermal delivery of fentanyl by electroporation: I. Influence of electrical factors, *Pharm. Res.* 13 (1996) 559 – 565
- ⁴⁷ V. Regnier, V. Pr at, Mechanisms of a phosphorothioate oligonucleotide delivery by skin electroporation, *Int. J. Pharm.* 184 (1999) 147 – 156
- ⁴⁸ R. Vanbever, M.-A. Leroy, V. Pr at, Transdermal permeation of neutral molecules by electroporation, *J. Control. Rel.* 54 (1998) 243 – 250
- ⁴⁹ U. Pliquett, J. C. Weaver, Transport of a charged molecule across the human epidermis due to electroporation, *J. Control. Rel.* 38 (1996) 1 – 10
- ⁵⁰ A. R. Denet, V Pr at, Transdermal delivery of timolol by electroporation through human skin, *J. Control. Rel.* 88 (2003) 253 – 262
- ⁵¹ M. R. Prausnitz, U. Pliquett, R. Langer, J. C. Weaver, Rapid temporal control of transdermal drug delivery by electroporation, *Pharm. Res.* 11 (1994) 1834 – 1837
- ⁵² A. Jadoul, N. Lecouturier, J. Mesens, W. Caers, V. Pr at, Electrically enhanced transdermal delivery of alnitidan, *J. Control. Rel.* 54 (1998) 265 – 272
- ⁵³ K. C. Sung, J.-Y. Fang, J.-J. Wang, O. Y. Hu, Transdermal delivery of nalbuphine and its prodrugs by electroporation, *Eur. J. Pharm. Sci.* 18 (2003) 63 – 70
- ⁵⁴ L. Zhang, D. P. Rabussay, Clinical evaluation of safety and human tolerance of electrical sensation induced by electric fields with non-invasive electrodes, *Bioelectrochemistry* 56 (2002) 233 – 236
- ⁵⁵ K. Mori, T. Hasegawa, S. Sato, K. Sugibayashi, Effect of electric field on the enhanced skin permeation of drugs by electroporation, *J. Control. Rel.* 90 (2003) 171 – 179
- ⁵⁶ S. Fukushima, S. Kishimoto, S. Horai, K. Miyawaki, S. Kamiyabu, Y. Kamata, Y. Yamaoka, Y. Takeuchi, Transdermal drug delivery by electroporation applied on the stratum corneum of rat using stamp-type electrode and frog-type electrode in vivo, *Biol. Pharm. Bull.* 24 (2001) 1027 – 1031
- ⁵⁷ R. Vanbever, V. Preat, Factors affecting transdermal delivery of metoprolol by electroporation, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 38 (1995) 223 – 228
- ⁵⁸ D.B. Bommaman, J. Tamada, L. Lejny, R. O. Potts, Effect of electroporation on transdermal iontophoretic delivery of luteinizing-hormone-releasing hormone (LHRH) in vitro, *Pharm. Res.* 11 (1994) 1809 – 1814
- ⁵⁹ S. L. Chang, G.A. Hofmann, L. Zhang, L. J. Deftos, A. K. Banga, The effect of electroporation on iontophoretic transdermal delivery of calcium regulating hormones, *J. Control. Rel.* 66 (2000) 127 – 133

- ⁶⁰ M. R. Prausnitz, E. R. Edelman, J. A. Gimm, R. Langer, J. C. Weaver, Transdermal delivery of heparin by skin electroporation, *Biol. Technol.* 13 (1995) 1205 – 1209
- ⁶¹ R. Vanbever, G. Langers, S. Montmayeur, V. Preat, Transdermal delivery of fentanyl: rapid onset of analgesia using skin electroporation, *J. Control. Rel.* 50 (1998) 225 – 235
- ⁶² S. Wang, M. Kara, R.R. Krishnan, Topical delivery of cyclosporin-A coevaporate using electroporation, *Tech. Drug Deliv. Ind. Pharm.* 23 (1998) 657 – 998
- ⁶³ L. Zhang, S. Lerner, W. V. Lustrum, G. A. Hofmann, Electroporation mediated topical delivery of vitamin C for cosmetic applications, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 48 (1999) 453 – 461
- ⁶⁴ V. Regnier, V. Pr at, Localisation of an FITC-labeled phosphorothiolate oligodeoxynucleotide in the skin after topical delivery by iontophoresis and electroporation, *Pharm. Res.* 15 (1998) 1596 – 1602
- ⁶⁵ G. M. Glenn, G. R. Matyas, C. R. Alving, Skin immunization made possible by cholera toxin, *Nature* 391 (1998) 351
- ⁶⁶ A. Misra, S. Ganga, P. Upadhyay, Needle-free non-adjuvanted skin immunization by electroporation-enhanced transdermal delivery of diphtheria toxoid and candidate peptide vaccine against hepatitis B virus, *Vaccine* 18 (1999) 517 – 523
- ⁶⁷ N. Dujardin, E. Staes, V. Pr at, Needle free immunization using skin electroporation, *Proc. Control. Rel. Bioactive Mater.* 27 (2000) 7409
- ⁶⁸ T. E. Zewert, U. F. Pliquett, R. Vanbever, R. Langer, J. C. Weaver, Creation of transdermal pathways for macromolecule transport by skin electroporation and a low toxicity, pathway-enlarging molecule, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 49 (1999) 11 – 20
- ⁶⁹ R. Vanbever, M. R. Prausnitz, V. Pr at, Macromolecules as novel transdermal transport enhancers for skin electroporation, *Pharm. Res.* 14 (1997) 638 – 644
- ⁷⁰ A. Sen, Y. L. Zhao, L. Zhang, S. W. Hui, Saturated anionic phospholipids enhance transdermal transport by electroporation, *Biophys. J.* 83 (2002) 2064 – 2073
- ⁷¹ J. C. Weaver, R. Vanbever, T. E. Vaughan, M. R. Prausnitz, Heparin alter transdermal transport associated with electroporation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234 (1997) 637 – 640
- ⁷² J. Kost, U. Pliquett, S. Mitragotri, A. Yamamoto, R. Langer, J. Weaver, Synergistic effect of electric field and ultrasound on transdermal transport, *Pharm. Res.* 13 (1996) 633 – 638
- ⁷³ J. Y. Fang, T. L. Hwang, Y. B. Huang, Y. H. Tsai, Transdermal iontophoresis of sodium nonivamide acetate-V. Combined effect of physical enhancement methods, *Int. J. Pharm.* 235 (2002) 95 – 105
- ⁷⁴ A.-R. Denet, B. Ucakar, V. Pr at, Transdermal delivery of timolol and atenolol using electroporation and iontophoresis in combination: a mechanistic approach, *Pharm. Res.* 20 (2003) 1946 – 1951
- ⁷⁵ S. Bose, W. R. Ravis, Y. J. Lin, L. Zhang, G. A. Hofmann, A. K. Banga, Electrically-assisted transdermal delivery of buprenorphine, *J. Control. Rel.* 73 (2001) 197 – 203
- ⁷⁶ A. Jadoul, J. Bouwstra, V. Preat, Effects of iontophoresis and electroporation on the stratum corneum-review of biophysical studies, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35 (1999) 89 – 105
- ⁷⁷ A. Jadoul, H. Tanajo, V. Pr at, F. Spies, H. Bodd e, Electroperturbation of human stratum corneum fine structure by high voltage pulses: a freeze fracture electron microscopy and differential thermal analysis study, *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 3 (1998) 153 -158
- ⁷⁸ N. Dujardin, E. Staes, Y. Kalia, P. Clarys, R. Guy, V. Pr at, In vivo assessment of skin electroporation using square wave pulses, *J. Control. Rel.* 79 (2002) 219 – 227

⁷⁹ G. Sersa, M. Cemazar, Z. Rudolf, Electrochemotherapy: advantages and drawbacks in treatment of cancer patients, *Cancer Ther.* 1 (2003) 133 – 142

⁸⁰ L. Zhang, L. Li, Z. L. An, R. M. Hoffman, G. A. Hofmann, In vivo transdermal delivery of large molecules by pressure-mediated electroincorporation and electroporation: A novel method for drug and gene therapy, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 42 (1997) 283 – 292