

N. Hasler-Nguyen¹, D. Shelton¹, G. Ponard¹,
M. Bader¹, M. Schaffrik², P. Mallefet¹

¹Novartis Consumer Health, Ньон, Швейцарія

²Novartis Consumer Health, Мюнхен, Німеччина

Оценка *in vitro* кожного проникновения противовирусных препаратов 1 % крема пенцикловира и 5 % крема ацикловира, которые используются для лечения инфекции, вызванной вирусом простого герпеса*

Инфекция, вызванная вирусом простого герпеса (ВПГ), является распространенной и убиквитарной инфекцией кожи, которая приводит к повреждениям кожи и слизистых оболочек, называемым «лихорадкой» на губах (лабиальный герпес), или «пузырьковым лишаем». Подавляющее большинство случаев «лихорадки» обусловлено вирусом простого герпеса первого типа (ВПГ-1). По оценкам, примерно 80 % населения во всем мире являются носителями ВПГ и приблизительно 40 % страдают от рецидивирующей инфекции, вызванной этим возбудителем [6, 8]. У около 1 % лиц, страдающих этим заболеванием, отмечаются частые (например, ежемесячные) вспышки латентной герпесвирусной инфекции. Эти проявления инфекции продолжаются в течение 4–10 дней, а у пациентов с ослабленным иммунитетом их длительность может увеличиваться до 30 дней, при этом в очагах поражения может развиваться выраженный некроз [6]. Местное лечение противовирусными препаратами, такими как ацикловир и пенцикловир, эффективно сокращает длительность поражения и облегчает боль, как было показано в крупных рандомизированных двойных слепых многоцентровых клинических исследованиях, в которых в качестве контроля ис-

пользовался носитель препарата без действующего вещества [6, 8, 15, 21].

Для максимального эффекта противовирусные препараты должны обладать способностью достигать терапевтических концентраций в базальных клетках эпидермиса, которые являются первичными воротами входа вируса в организм [10, 23]. Соответственно, при лабиальном герпесе кожное всасывание является одним из наиболее критических факторов для успешности терапии препаратами, предназначенными для местного применения. Путь проникновения препарата через роговой слой, который является основным барьером, ограничивающим скорость всасывания препарата через кожу [12], зависит от свойств соответствующих препаратов. В сравнении с ацикловиром пенцикловир имеет дополнительную гидроксильную группу (рис. 1). Ацикловир в виде генерических препаратов стал доступен на рынке с середины 1990-х, когда на рынок вышел его аналог пенцикловир [11].

Поскольку свойства проницаемости рогового слоя кожи после ее взятия из организма остаются неизменными, была отмечена значительная корреляция между результатами *in vivo* и *in vitro* экспериментов при использовании одного и того же препарата [7, 24, 25]. Таким образом, оценка диффузии препарата через нежизнеспособную кожу человека *in vitro* является удобным экспериментальным инструментом для изучения характеристик проникновения препарата в кожу

* BMC Dermatology.— 2009.— Vol. 9, iss. 1.— 3.
doi: 10.1186/1471-5945-9-3.

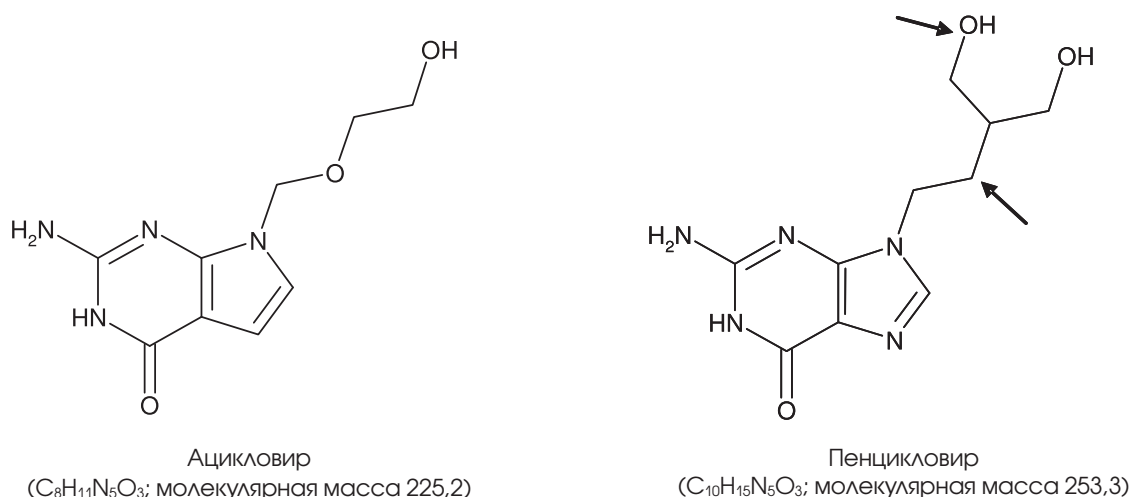


Рис. 1. Химическая структура ацикловира и пенцикловира (Различия указаны стрелками на изображении структуры пенцикловира)

из его лекарственных форм, предназначенных для местного применения.

В данном исследовании было выполнено сравнение *in vitro* распределения и проникновения в кожу двух «коммерческих» кремов с 1 % пенцикловира или 5 % ацикловира; оба крема содержат приблизительно 40 % пропиленгликоля. Кожное проникновение *in vitro* оценивали с помощью человеческой кожи, закрепленной в диффузорах типа диффузоров Франца [5]. После местного нанесения крема 5 мг/см² на образцы иссеченной человеческой кожи проникновение препарата в рецепторную жидкость диффузионной камеры измеряли через 24 часа. В конце эксперимента определяли уровни препарата в оставшейся коже после удаления ее рогового слоя с помощью соскобов липкой лентой. Кроме того, с помощью молекулярного моделирования изучали физико-химические различия между препаратами, поскольку они являются фактором, влияющим на всасывание препарата через кожу [14].

Методы

Продукты

1 % крем пенцикловира (10 мг/г пенцикловира, препарат «Фенистил Пенцивир» производства Novartis Consumer Health, Швейцария) был предоставлен компанией для внутреннего пользования, а 5 % крем ацикловира (50 мг/г ацикловира, препарат «Зовиракс» производства GlaxoSmith-Kline, Великобритания) был закуплен через аптечную сеть Швейцарии.

Пенцикловир компания предоставила для внутреннего пользования, а ацикловир был закуплен у компании Sigma Chemicals (Швейцария).

Донор кожи

После получения надлежащего согласия комитета по вопросам этики Международного института передовых технологий в медицине (International Institute for the Advancement of Medicine, ИАМ, США) рассмотрел и одобрил нашу заявку на использование в этом исследовании человеческой ткани.

Полнослойные образцы кожи живота, взятые у 6 доноров при аутопсии, были предоставлены в криоконсервированном виде ИАМ. Эти образцы кожи сохранялись замороженными при температуре -80°C . Перед использованием кожу размораживали и из нее осторожно удаляли подкожную клетчатку. Кожу дерматомировали до толщины 500 мкм с помощью дерматома Вагнера (модель GB-231 Aescular, Германия), что позволило получить расщепленные кожные лоскуты, состоящие из рогового слоя (10–20 мкм), эпидермиса (100 мкм) и части дермы (1200 мкм) [17, 19].

Тест на целостность кожи

Для определения целостности кожи оценивали проникновение воды, меченой тритием, как описано у R.L. Bronaugh и соавт. [2]. Вкратце этот тест можно описать следующим образом. Меченую тритием воду (2,7 мКи/мл) наносили на поверхность кожи. Через 30 мин меченую радиоактивным изотопом воду удаляли ватными палочками. Отбиралась рецепторная фаза (2 мл) для измерения в ней количества меченой тритием воды (в процентах), которая проникала через кожу, с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика. Лекарственные формы тестировали на образцах кожи, которые имели схожие величины проникновения меченой тритием воды. Менее 1 % нанесенной дозы меченой тритием воды проникало через кожу.

Кожное проникновение

Кожное проникновение — это диффузия препарата через кожный слой в рецепторную фазу, которая представляет кровеносные сосуды. Измеряли с помощью статического диффузора Франца, в котором на каждый образец кожи площадью по 1,75 см² наносился тестируемый продукт в количестве 5 мг/см² с моделированием условий клинического применения и в соответствии с рекомендациями к проведению такого теста OECD 428 [20].

Размороженные и дерматомированные образцы кожи человека были горизонтально размещены в камерах диффузора Франца дермой вниз. Камеры диффузора Франца соединились с ванночкой с циркулирующей водой температуры 37° С, которая обеспечивала поддержание температуры ткани на уровне 32° С, что сравнимо с физиологической температурой поверхности кожи. Рецепторная фаза, в качестве которой выступал ФБСР с рН 7,4 (фосфатно-буферный солевой раствор; 7,58 г/л Na₂HPO₄, 1,62 г/л NaH₂PO₄ и 4,4 г/л NaCl), содержащийся внутри каждой камеры диффузора (примерно по 8 мл), перемешивалась с помощью магнитной мешалки, чтобы обеспечить надлежащую гомогенизацию высвобождаемого в рецепторную фазу лекарственного средства в ходе эксперимента. Образцы рецепторной фазы отбирались через 24 ч.

Пенетрация в кожу

Пенетрацию в кожу определяли путем измерения количества лекарственного средства, находящегося в различных слоях кожи.

В конце 24-часового периода после нанесения препарата образцы кожи промывали мыльной водой с использованием ватных палочек. Верхний слой рогового слоя удаляли с помощью липкой ленты (3 М «Скотч» № 550) и анализировали отдельно. Дополнительные слои рогового слоя удаляли последовательным наложением до 12 липких лент.

После сбора всех ленточных соскобов первая и вторая ленты помещались в отдельные флаконы, содержащие по 10 мл воды. Ленты с 3-й по 7-ю объединялись в одном флаконе, содержащем 20 мл воды. Остальные ленточные соскобы кожи измельчались и помещались в флакон, содержащий 15 мл воды. Смеси перемешивались в течение ночи, чтобы обеспечить надлежащую экстракцию лекарственного средства с ленты и с кожи.

Анализ образцов

Содержание пенцикловира и ацикловира в различных образцах определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии

(Agilent HP 1100) на фазовой колонке Waters Spherisorb 5 мкм ODS2 (4,6 Ч 250 мм, аналитический картридж PSS839540) при температуре 35° С и скорости потока мобильной фазы (смесь метанола и 0,1 М ацетатно-аммонийного буфера с рН 6,0 в соотношении 1 : 10 (об./об.)) 1 мл с УФ-детектированием при длине волны 254 нм. Образец непосредственно инжектировался в колонку в объеме 50 мкл. Концентрации лекарственных средств определяли по стандартным кривым содержания пенцикловира или ацикловира в диапазоне от 10 до 50 нг/мл, полученным для химически чистых соединений, растворенных в ФБСР с рН 7,4, который был растворителем, используемым в рецепторной фазе. Максимальная концентрация растворенного вещества составляла 0,9 мг/мл для пенцикловира и 0,7 мг/мл для ацикловира. Время удерживания составило 6,7 мин для пенцикловира и 5,1 мин для ацикловира. Предел количественного определения (LOQ) для обоих препаратов составлял 7 нг/мл.

Молекулярное моделирование

Характеристики химической структуры пенцикловира и ацикловира оценивали с помощью внутренней веб-системы компании CHEMINFORMATICS в программе CORINA. Генерирование и отображение свойств молекулярной поверхности позволили обнаружить те части молекул, которые вовлечены в гидрофобные или гидрофильные взаимодействия [4].

Вестерн-блоттинг

Образец кожи от одного донора промывали мыльной водой с использованием ватных палочек через 24 ч после аппликации крема. Верхний слой рогового слоя удаляли с помощью липкой ленты (3 М «Скотч» № 550) и анализировали отдельно. Дополнительные слои рогового слоя удаляли последовательным наложением до 12 липких лент. После сбора всех ленточных соскобов первую и вторую ленты помещали в отдельные флаконы. После этого третью и четвертую ленты объединяли в одном флаконе, а последнюю помещали отдельно в еще один флакон. В флакон добавляли ледяной лизирующий буфер (20 мМ Трис-НСl; 2 мМ ЭГТА; 2 мМ ЭДТА; 30 мМ NaF; 30 мМ Na₄O₇P₂; 2 мМ Na₃VO₄; 1 мМ [4-(2-аминоэтил)бензенсульфонилфторид] (АЭБСФ); 10 мкг/мл леупептина; 4 мкг/мл апротинина; 1 % Тритон X-100; рН 7,4) в объеме 250 мкл/ленту, затем флакон оставляли на 10 мин на льду, а после этого перемешивали на вортексе. Отбирали надосадочную жидкость, которая сохранялась в течение ночи при температуре -20° С. Концент-

рации белков измеряли с помощью метода количественного определения белков с использованием бицинониновой кислоты (БХК) (компания Pierce).

10 мкм образца белка, соответствующие 3 мкм белка из лизата ленточных соскобов, были выделены с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с 10 % натрия додецилсульфатом и помещены на мембраны из поливинилидена дифторида («Иммобилон-П» [Immobilon-P], производства компании Millipore, США). Мембраны были блокированы инкубацией вместе с Трис-буферным солевым раствором (50 мМ Трис, 150 мМ NaCl), содержащим 0,2 % (об./об.) «Нонидет Р-40» и 5 % (м./об.) обезжиренного сухого молока, в течение 30 мин при комнатной температуре. В течение ночи мембраны выдерживались при температуре 4 °С с моноклональными антителами к кератину 5 человека, полученными от мышей (Millipore) (1 : 20 000), а затем — с вторичным антителом к человеческому IgG, полученным от коз и конъюгированным с пероксидазой хрена (1 : 20 000) (Transduction Laboratories, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Мембраны трижды промывались Трис-буферным солевым раствором, содержащим 0,2 % (об./об.) «Нонидет Р-40», и комплексы «антиген — антитело» выявляли с помощью метода «Super Signal Substrate» (компания Pierce). Идентифицированные белковые связи определяли с помощью видеоденситометра и программного обеспечения «ImageQuant» (Molecular Dynamics, США)

Статистический анализ

Для определения Р-значения для различий между кремом пенцикловира и кремом ацикловира был выполнен непарный t-тест Стьюдента. За статистически значимое было принято Р-значение менее 0,05.

Результаты

Через 24 ч воздействия препаратов на кожу кремы были смыты с кожи, при этом количество крема ацикловира, оставшегося в смывной воде, было в 6 раз больше, чем количество крема пенцикловира, — 245 мкг/см² по сравнению с 40 мкг/см² соответственно (данные не показаны). Эти значения отображают количество препарата, не всосавшегося в кожу.

Совокупное количество каждого препарата, проникшее в кожу, представлено на рис. 2А. При нанесении на кожу ацикловира в виде 5 % крема наивысшие концентрации ацикловира обнаружены в ленте 1 (0,88 мкг/см²), в то время как в следующем по глубине слое кожи (лента 2) пре-

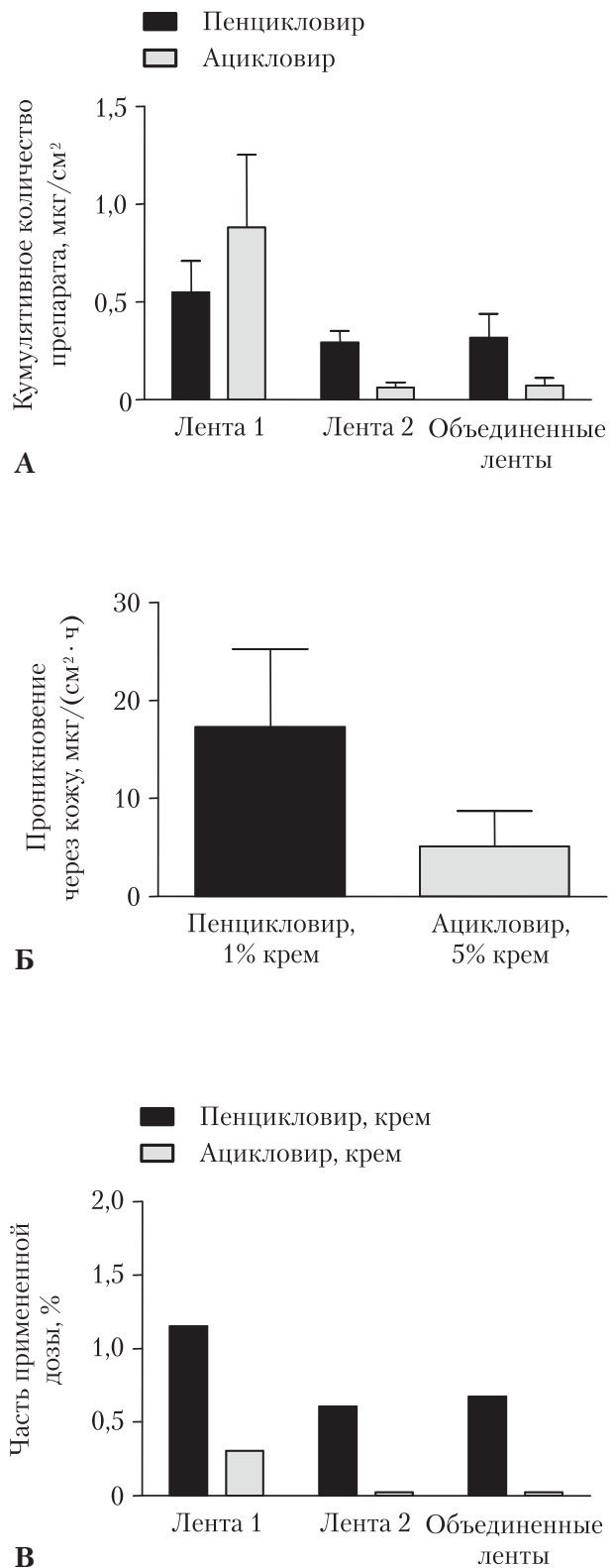


Рис. 2. Сравнение концентраций препаратов, выявленных в ленточных соскобах (А) и выраженных в виде проникновения через кожу (Б) либо с поправкой на примененную дозу (В) через 24 ч после нанесения 1 % крема пенцикловира и 5 % крема ацикловира на иссеченную кожу человека (Представленные значения соответствуют средним величинам от 11 реплик со стандартной погрешностью среднего)

парат обнаруживался в статистически значимо меньшей концентрации, чем пенцикловир при применении 1 % крема (таблица; $p = 0,002$). В материале объединенных лент ацикловира было найдено в 4,5 раза меньше, чем пенцикловира. Это различие приближалось к статистической значимости ($p = 0,07$). Концентрация пенцикловира в виде 1 % крема в соскобе первой ленты составила 0,55 мкг/см², в то время как анализ соскобов следующих по глубине слоев кожи показал содержание пенцикловира на уровне 0,29 мкг/см² в ленте 2 и 0,32 мкг/см² в материале объединенных лент (с ленты 3 до ленты 7; см. рис. 2А). Общая концентрация препарата в материале объединенных лент могла включить все его содержание в эпидермисе, учитывая данные относительно того, что через 3 ч продолжительности эксперимента эпидермис отслаивался вместе с роговым слоем [22].

Через 24 ч количество пенцикловира, проникшего через кожу из 1 % крема, было в 3,4 раза выше, чем количество ацикловира из 5 % крема (0,41 по сравнению с 0,12 мкг/см²; см. таблицу), что обусловило проникновение препаратов через кожу на уровне соответственно 17 и 5 нг/(см² · ч), как отображено на рис. 2Б.

Когда эти результаты сравнивали для эквивалентных доз, обнаруживалось, что пенцикловира из 1 % крема проникает через кожу в 16,7 раз

больше, чем ацикловира (проникновение ограничивалось преимущественно поверхностным слоем кожи). Это различие характеризовалось тенденцией в сторону статистической значимости ($p = 0,06$; рис. 2В, таблица). Статистически значимо большее количество пенцикловира выявлялось в ленточных соскобах более глубоких слоев кожи, таких как лента 2 ($p = 0,002$) и материал объединенных лент ($p = 0,04$). Различия между содержанием пенцикловира и ацикловира в дерме были близки к статистической значимости ($p = 0,06$; см. рис. 2В, таблицу). Проникновение через иссеченную кожу человека достигало 3,3 % использованной дозы для пенцикловира и 0,2 % для ацикловира.

Молекулярное моделирование позволило сгенерировать и отобразить такие свойства молекулярной поверхности, как электростатический потенциал, липофильный потенциал или площадь полярной поверхности, обнаружив те части молекулы, которые вовлечены в гидрофобные или электростатические взаимодействия или которые могут обусловить различия в биодоступности препаратов. Таким образом, это программное обеспечение химического моделирования было использовано для сравнения ацикловира и пенцикловира, известных как гидрофильные вещества. Распределение поверхностного потенциала в этих молекулах очень схоже, однако рас-

Таблица. Сравнение количества противовирусных препаратов, содержание которых обнаружено в разных участках кожи

Показатель	Пенцикловир, крем (П)	Ацикловир, крем (А)	Отношение П/А	Статистическая значимость (p)
Количество препарата, мкг/см²				
Лента 1	0,55 ± 0,16	0,88 ± 0,3	0,6	0,42
Лента 2	0,29 ± 0,06	0,06 ± 0,03	4,9	0,002
Материал объединенных лент	0,32 ± 0,12	0,07 ± 0,04	4,5	0,07
Эпидермис	1,15 ± 0,35	1,01 ± 0,04	1,1	0,32
Дерма (остаточный ленточный кожный соскоб)	0,10 ± 0,04	0,07 ± 0,04	1,4	0,63
Проникновение через кожу (рецепторная фаза)	0,41 ± 0,19	0,12 ± 0,10	3,4	0,18
Часть примененной дозы, %				
Лента 1	1,15 ± 0,41	0,30 ± 0,11	3,8	0,06
Лента 2	0,61 ± 0,16	0,02 ± 0,01	29,1	0,002
Материал объединенных лент	0,67 ± 0,31	0,02 ± 0,01	32,3	0,04
Эпидермис	2,4 ± 0,9	0,3 ± 0,1	7,0	0,3
Дерма (остаточный ленточный кожный соскоб)	0,17 ± 0,07	0,02 ± 0,01	9,1	0,06
Проникновение через кожу (рецепторная фаза)	0,68 ± 0,33	0,04 ± 0,03	16,7	0,06

Примечание. Представленные значения соответствуют средним величинам от 11 реплик со стандартной погрешностью среднего. Чрескожное всасывание пенцикловира и ацикловира из лекарственных форм в виде кремов в кожу человека *in vitro* выражено в виде совокупного проникновения и с поправкой на примененную дозу.

пределение гидрофобности демонстрирует два участка молекулы ацикловира с более выраженной гидрофобностью (рис. 3).

Обсуждение

Измерение *in vitro* проникновения препаратов через расщепленные лоскуты кожи человека позволяет оценить пассивную диффузию молекулы в кожу и через кожу в резервуар с жидкой фазой, симулирующий капилляры дермы. На проникновение препарата через кожу влияют несколько факторов, среди которых характер высвобождения действующего вещества из лекарственной формы, его проникновение в слой рогового слоя (10–20 мкм) и его диффузия через роговой слой в различные слои эпидермиса (100 мкм) и дермы (1200 мкм) для достижения циркуляторного русла, симулированного резервуаром с жидкостью.

При сравнении эквивалентных доз крема пенцикловира и крема ацикловира отмечалась тенденция в пользу более выраженного чрескожного проникновения пенцикловира по сравнению с ацикловиrom. Эти результаты указывают на бо-

лее эффективное высвобождение пенцикловира из крема и его проникновение через роговой слой. Обе лекарственные формы содержат примерно 40 % пропиленгликоля (в 5 % креме ацикловира — препарате «Зовиракс» — содержится 40 % пропиленгликоля, а в 1 % креме пенцикловира — препарате «Фенистил Пенцивир» — содержится 43 % пропиленгликоля), который широко используется в качестве соразтворителя и вещества, улучшающего проникновение препарата через кожу [28]. Этот жирный спирт, который хорошо диффундирует через роговой слой [28], может изменять свойства этой мембраны, обуславливая улучшение распределения препарата в тканях, особенно пенцикловира, в то время как дальнейшее проникновение ацикловира в рецепторную жидкость могло нарушаться. Это различие между структурно родственными полярными молекулами может объясняться самой лекарственной формой, а также наличием гидрофобных участков в структуре молекулы ацикловира, как было определено при молекулярном моделировании. Эти фрагменты могут взаимодействовать с гидрофобными структурами в ро-

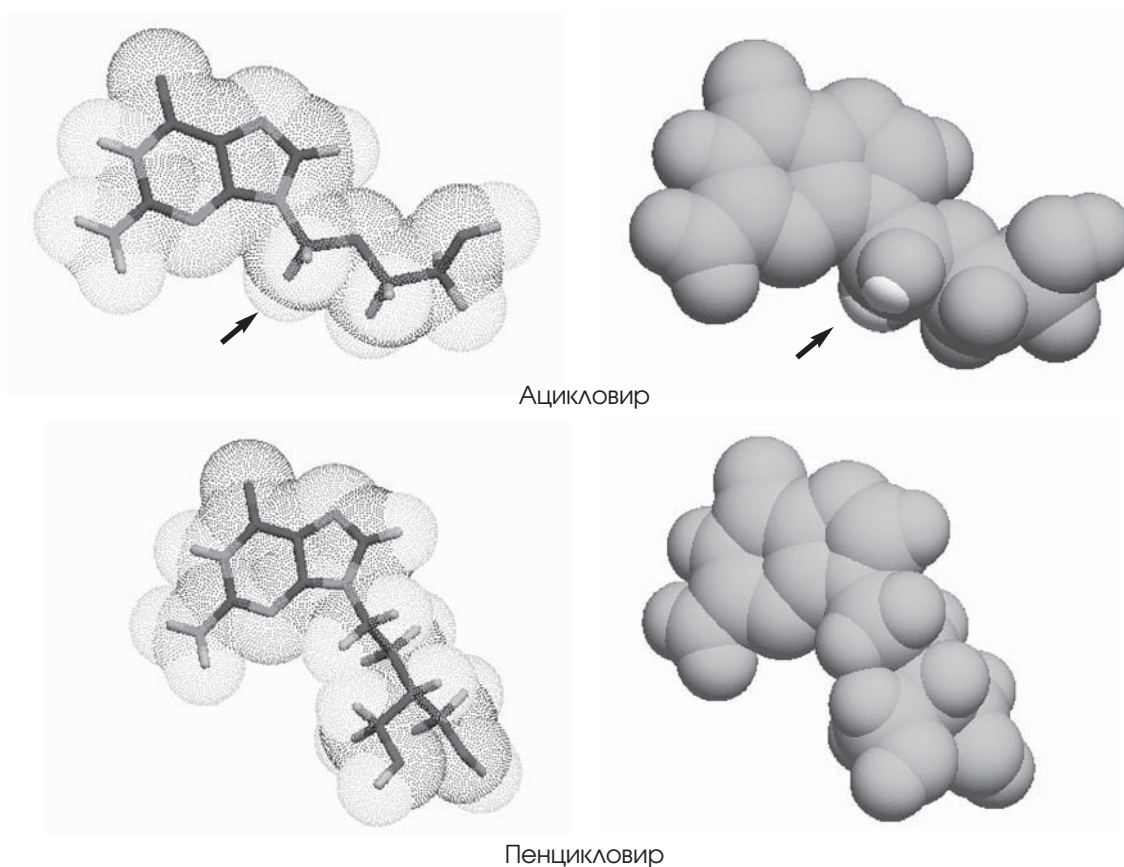


Рис. 3. Отображение свойств молекулярной поверхности ацикловира и пенцикловира, определенных с помощью молекулярного моделирования (Этот метод обнаруживает части молекулы, которые вовлечены в гидрофобные или электростатические взаимодействия, которые могут обусловить различия в биодоступности препаратов. Темным цветом указаны гидрофильные участки, светлым — гидрофобные фрагменты молекулы, обозначенные стрелками)

говом слое кожи, что препятствует дальнейшему проникновению препарата в кожу. Сообщалось о том, что увеличение липофильности используется для уменьшения системной абсорбции, что было показано для кортикостероидов [21]. Гидрофильные участки пенцикловира могут не взаимодействовать с этими гидрофобными структурами, тем самым давая возможность растворителю свободно «влечь» за собой пенцикловир между корнеоцитами рогового слоя в пределах гидрофильного участка, который является парацеллюлярным путем проникновения препарата (см. рис. 3) [13, 14].

Методика анализов соскобов, полученных с помощью липкой ленты, позволяет измерять концентрацию препарата в роговом слое путем повторного наложения липкой ленты на образец кожи — обычно от 10 до 15 раз [17]. Сообщалось, что при этой экспериментальной методике после трехчасового периода роговой слой кожи легко отслаивается от дермы, в том числе со всеми остаточными слоями эпидермиса [19, 22]. Оставался открытым вопрос о том, можно ли обнаружить на ленточных соскобах базальные клетки при использовании наших экспериментальных условий, при которых соскоб с помощью липкой ленты выполнялся через 24 ч после применения продукта. Учитывая что кератин 5 специфически экспрессируется в базальных клетках эпидермиса [18], был выполнен вестерн-блоттинговый анализ с использованием моноклонального антитела против этого белка. Как показано на рис. 4, эта методика обеспечивала появление уникальной узкой полоски 60 кДа при тестировании материала образцов объединенных лент (на дорожках 3 и 4) и лишь очень слабых полосок такого же размера при тестировании образцов лент 1, 2 и последней ленты (на дорожке 5). Эта полоска соответствует известной молекулярной массе кератина 5, составляющей 58 кДа.

Эти результаты подтверждают, что базальные клетки были удалены при соскобах с помощью липкой ленты и обнаруживались преимущественно в более глубоком слое эпидермиса. Таким образом, концентрации из расчета на площадь пенцикловира в материале образцов объединенных лент были преобразованы в концентрации из расчета на объем с использованием расчетной глубины эпидермиса 100 мкм [17], что позволило получить концентрацию в 60 раз выше той, которая *in vitro* обеспечивала ингибирующий эффект на ВПГ-1 с IC50 0,5–0,8 мкг/мл, как сообщалось А. Weinberg [26]. Это указывает на то, что пенцикловир может быть высокоэффективным в уменьшении вирусной нагрузки в инфицирован-

ных клетках базальных слоев эпидермиса по сравнению с поверхностными слоями эпидермиса, представленными роговым слоем.

Остается открытым вопрос о том, могут ли наблюдавшиеся различия в концентрациях этих двух препаратов в различных слоях кожи объясняться разными периодами полужизни ацикловира (0,7–1 ч) и пенцикловира (10–20 ч) в межклеточной жидкости [3, 9, 16]. Поскольку иссеченные фрагменты кожи замораживались перед использованием, эта ткань может не быть жизнеспособной из-за недостаточного метаболизма и активности ферментов [27]. Соответственно, в экспериментальных условиях настоящего исследования это исключает, что вирусная тимидинкиназа может быть активной и фосфорилировать оба препарата, которые удерживались бы в таком случае в клетках [3]. В дальнейшем может представлять интерес выполнение исследования со свежей и жизнеспособной иссеченной кожей, инфицированной ВПГ-1 или неинфицированной, для оценки вклада активности вирусных ферментов в биодоступность препаратов в более глубоких слоях эпидермиса, в которых находятся целевые клетки.

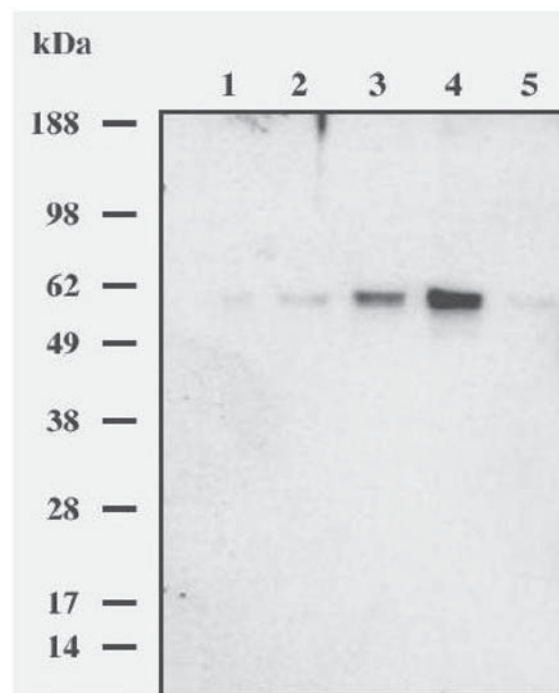


Рис. 4. Кератин 5 в ленточных соскобах иссеченной кожи человека, обработанной 1 % кремом пенцикловира, был обнаружен с помощью вестерн-блоттинга (В образце ленты 1 на дорожке 1, в образце ленты 2 на дорожке 2 и в образце последней ленты на дорожке 5 сигнал полоски 60 кДа был слабым по сравнению с сигналом этой полоски в материале образцов объединенных лент на дорожках 3 и 4)

Выводы

В этой *in vitro* модели, где изучалась пассивная диффузия двух гидрофильных препаратов, используемых в сравнимых лекарственных формах, было показано, что оба крема обеспечивают поступление лекарственного препарата в более глубокие слои эпидермиса кожи, где находятся целевые базальные клетки, как было определено с помощью экспрессирования специфического белка — кератина 5. Молекулярное моделирование позволило впервые выявить различия между молекулами ацикловира и пенцикловира по свойствам их поверхностей. Эти данные могут свидетельствовать в поддержку того, что пенцикловир проявляет тенденцию к

более выраженному парацеллюлярному проникновению через роговой слой, что обуславливает тенденцию к достижению более высоких концентраций препарата в более глубоких слоях эпидермиса.

Поскольку свойства проницаемости рогового слоя в нежизнеспособной коже человека остаются неизменными, результаты данного исследования могут быть экстраполированы на реальные условия применения этих препаратов. Применение крема в продромальной стадии заболевания, когда кожа выглядит непораженной, может обеспечить доставку препарата на уровень базальных клеток, где можно обнаружить ВПГ-1 при лабиальном герпесе.

Статья предоставлена представительством компании «Новартис Консьюмер Хелс Сервисез С.А.» в Украине

Список литературы

- Brazzini B., Pimpinelli N. New and established topical corticosteroids in dermatology: clinical pharmacology and therapeutic use // *Am. J. Clin. Dermatol.*— 2002.— Vol. 3.— P. 47–58.
- Bronaugh R.L., Stewart R.F., Simon M. Methods for in vitro percutaneous absorption studies. vii: use of excised human skin // *J. Pharm. Sci.*— 1986.— Vol. 75.— P. 1094–1097.
- Earnshaw D.L., Bacon T.H., Darlison S.J. et al. A mode of antiviral action of penciclovir in mrc-5 cells infected with Herpes simplex virus type 1 (HSV-1), HSV-2, and Varicella-zoster virus // *Antimicrob. Agents Chemother.*— 1992.— Vol. 36.— P. 2747–2757.
- Ertl P., Muhlbacher J., Rohde B., Selzer P. Web-based cheminformatics and molecular property prediction tools supporting drug design and development at Novartis // *SAR QSAR Environ. Res.*— 2003.— Vol. 4.— P. 321–328.
- Franz T.J. Kinetics of cutaneous drug penetration // *Int. J. Dermatol.*— 1983.— Vol. 22.— P. 499–505.
- Gold D., Corey L. Acyclovir prophylaxis for Herpes simplex virus infection // *Antimicrob. Agents Chemother.*— 1987.— Vol. 31.— P. 361–367.
- Guy R.H., Carlstrom E.M., Bucks D.A. et al. Percutaneous penetration of nicotines: in vivo and in vitro measurements // *J. Pharm. Sci.*— 1986.— Vol. 75.— P. 968–972.
- Hamuy R., Berman B. Treatment of Herpes simplex virus infections with topical antiviral agents // *Eur. J. Dermatol.*— 1998.— Vol. 8.— P. 310–319.
- Hayden F.G. Antimicrobial agents-antiviral agents (non-retroviral) Tenth edition. Mc Graw Hill Medical Publishing Division New-York, Chicago, San Francisco, Lisbon, London, Madrid, Mexico City, New Delhi, San Juan, Seoul, Singapore, Sidney, Toronto; 2001.
- Jarvis C.A., McGuigan C., Heard C.M. In vitro delivery of novel, highly potent anti-Varicella zoster virus nucleoside analogues to their target site in the // *Pharm. Res.*— 2004.— Vol. 21 (6).— P. 914–919.
- Kleymann G. Novel Agents and Strategies to Treat Herpes Simplex Virus Infections // *Expert Opin Investig. Drugs.*— 2003.— Vol. 12.— P. 165–183.
- Marzulli F.N. Barriers to skin penetration // *J. Invest. Dermatol.*— 1962.— Vol. 39.— P. 387–393.
- Menon G.K., Elias P.M. Morphologic basis for a pore-pathway in mammalian stratum corneum // *Skin. Pharmacol.*— 1997.— Vol. 10.— P. 235–246.
- Moser K., Kriwet K., Naik A. et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro // *Eur. J. Pharm. Biopharm.*— 2001.— Vol. 52.— P. 103–112.
- Raborn G.W., Martel A.Y., Lassonde M. et al. Effective treatment of Herpes simplex labialis with penciclovir cream: combined results of two trials // *J. Am. Den. Assoc.*— 2002.— Vol. 133.— P. 303–309.
- Reusser P. Herpesvirus resistance to antiviral drugs: a review of the mechanisms, clinical importance and therapeutic options // *J. Hosp. Infect.*— 1996.— Vol. 33.— P. 235–248.
- Rolland A. Localization of drugs in the skin. in in vitro percutaneous absorption: principles, fundamentals and applications / Ed. by R.L. Bronaugh, H.I. Maibach.— CRC Press Boca Raton, 1991.— P. 137–156.
- Van de Sandt J., Roguet R., Cohen C. et al. The use of human keratinocytes and human skin models for predicting skin irritation // *Atla.*— 1999.— Vol. 27.— P. 723–743.
- Schaefer H., Redelmeier T.E. Structure and dynamics of the skin barrier. Skin barrier: principles of percutaneous absorption.— Karger Basel, 1996.— P. 1–42.
- Skin absorption — in vitro method. Organisation for Economic Cooperation and Development.— Guideline 428.— 2004.
- Spruance S.L., Rea T.L., Thoming C. et al. Penciclovir cream for the treatment of herpes simplex labialis. A randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. Topical Penciclovir Collaborative Study Group // *JAMA.*— 1997.— Vol. 277.— P. 1374–1379.
- Surber C., Schwarb F.P., Smith E.W. Tape-stripping technique // *J. Toxicol. Cut. Ocul. Toxicol.*— 2001.— Vol. 20.— P. 461–474.
- Visalli R.J., Courtney R.J., Meyers C. Infection and replication of Herpes simplex virus type 1 in an organotypic epithelial culture system // *Virology.*— 1997.— Vol. 230.— P. 236–243.
- Wagner H., Kostka K.H., Lehr C.M., Schaefer U.F. Drug distribution in human skin using two different in vitro test systems: comparison with in vivo data // *Pharm. Res.*— 2000.— Vol. 17.— P. 1475–1481.
- Wagner H., Kostka K.H., Lehr C.M., Schaefer U.F. Human skin penetration of flufenamic acid: in vivo/in vitro correlation (deeper skin layers) for skin samples from the same subject // *J. Invest. Dermatol.*— 2002.— Vol. 118.— P. 540–544.
- Weinberg A., Bate B.J., Masters H.B. et al. In vitro activities of penciclovir and acyclovir against Herpes simplex virus types 1 and 2 // *Antimicrob. Agents Chemother.*— 1992.— Vol. 36.— P. 2037–2038.
- Wester R.C., Christoffel J., Hartway T. et al. Human cadaver skin viability for in vitro percutaneous absorption: storage and detrimental effects of heat-separation and freezing // *Pharm. Res.*— 1998.— Vol. 15.— P. 82–84.
- Williams A.C., Barry B.W. Penetration enhancers // *Adv. Drug. Deliv. Rev.*— 2004.— Vol. 56.— P. 603–618.

N. Hasler-Nguyen, D. Shelton, G. Ponard, M. Bader, M. Schaffrik, P. Mallefet

Оцінка *in vitro* шкірного проникнення протівірусних препаратів 1 % крему пенцикловіру та 5 % крему ацикловіру, які використовуються для лікування інфекції, спричиненої вірусом простого герпесу

Інфекція, спричинена вірусом простого герпесу, є поширеною та убіквітарною інфекцією шкіри, що зумовлює пошкодження шкіри і слизових оболонок, яке називають «лихоманкою» на губах (лабіальний герпес), або «пухирцевим лишаєм». У цьому дослідженні оцінено *in vitro* шкірне проникнення і пенетрацію в шкіру пенцикловіру та ацикловіру з «комерційних» препаратів у вигляді кремів для лікування лабіального герпесу («лихоманки» на губах) з використанням зразків нежиттєздатної шкіри людини (взятої в ділянці живота), на які впливали 5 % кремом ацикловіру або 1 % кремом пенцикловіру в кількості 5 мг/см². Після 24-годинної аплікації крему зі зразків було змито надлишок крему і пошарово знято роговий шар шкіри за допомогою послідовних зскрібків липкою стрічкою. Визначено кількість діючої речовини препаратів, що проникла у шкіру, а також змитого крему, крему в стрічкових шкірних зскрібках і крему, що залишився у шкірі. Для оцінки фізико-хімічних відмінностей між препаратами використано молекулярне моделювання. Вестерн-блотинг дав можливість визначити, чи можна виявити в різних стрічкових шкірних зскрібках маркер базальних клітин — кератин 5. Аплікація 1 % крему пенцикловіру зумовила вищі концентрації лікарського препарату в глибших шарах епідермісу, а також більш значне проникнення препарату через шкіру. Молекулярне моделювання продемонструвало два фрагменти молекули ацикловіру з більше вираженою гідрофобністю. Маркер базальних клітин кератину 5 визначався у стрічкових зскрібках глибших шарів шкіри, що підтверджувало досягнення своїх цільових клітин обома препаратами. 1 % крем пенцикловіру відрізняється тенденцією до більш вираженої дифузії препарату через роговий шар шкіри в глибші шари епідермісу, де він може досягти цільових базальних клітин в ефективній терапевтичній концентрації. Незначні розбіжності у властивостях поверхонь цих двох молекул також можуть певним чином впливати на краще проникнення пенцикловіру через епідерміс до глибших базальних клітин.

N. Hasler-Nguyen, D. Shelton, G. Ponard, M. Bader, M. Schaffrik, P. Mallefet

Evaluation of the *in vitro* skin permeation of antiviral drugs from penciclovir 1 % cream and acyclovir 5 % cream used to treat herpes simplex virus infection

Herpes simplex virus infection (HSV) is a common and ubiquitous infection of the skin which causes mucocutaneous lesions called cold sores (herpes labialis) or fever blisters. It is estimated that approximately 80 % of the population worldwide are carriers of the Herpes simplex virus, approximately 40 % suffer from recurrent recurrent infections. This study evaluates the *in vitro* skin permeation and penetration of penciclovir and acyclovir from commercialized creams for the treatment of herpes labialis (cold sores), using non viable excised human abdominal skin samples, which were exposed to 5 mg/cm² of acyclovir 5 % cream or penciclovir 1 % cream. After 24 h of cream application, excess cream was washed off and layers of stratum corneum were removed by successive tape stripping. Amounts of active ingredients having penetrated through the skin were measured, as well as the amounts in the washed-off cream, in skin strips and creams remaining in the skin. Molecular modelling was used to evaluate physicochemical differences between the drugs. Western blot analysis enabled to determine whether the marker of basal cells keratin 5 could be detected in the various tape strips. Application of penciclovir 1 % cream yielded higher concentration of drug in the deeper layers of the epidermis as well as a higher drug flux through the skin. Molecular modelling showed two higher hydrophobic moieties for acyclovir. Presence of the basal cell marker keratin 5 was underscored in the deeper tape strips from the skin, giving evidence that both drugs can reach their target cells. Penciclovir 1 % cream has the tendency to facilitate the diffusion of the drug through the stratum corneum into the deeper epidermis layers, in which it could reach the target basal cells at effective therapeutical concentration. The small difference in the surface properties between both molecules might also contribute to favour the passage of penciclovir through the epidermis into the deeper basal cells. □