

Novosti o dostavljanju učinkovin v nohte

Novel methods in drug delivery to the nail

Ana Torkar, Julijana Kristl, Sudaxhina Murdan

Povzetek Za zdravljenje bolezni nohtov je še vedno najučinkovitejše sistemsko dajanje zdravil, čeprav je dolgotrajno in pogosto povezano z neželenimi učinki in interakcijami z drugimi zdravili. Pregled anatomije nohta in narave najpogostejših bolezni nohtov, onihomikoze in luskavice nam osvetli problem lokalne dostave učinkovin v noht. Najpomembnejši fizikalno kemijski parametri, ki vplivajo na permeacijo učinkovine skozi noht, so velikost, nabitost in hidrofilnost/lipofilnost molekule učinkovine. Šele s porušenjem kompaktne keratinske zgradbe nohta, pri čemer so najučinkovitejši reducenti disulfidnih vezi, je možno doseči zadostno količino učinkovine na mestu delovanja. Razvoj gre v smeri iskanja in opredeljevanja novih kemičnih pospeševalcev in fizikalnih metod, ki vplivajo na keratinsko strukturo, med katerimi so tudi keratinolitični encimi in ultrazvok.

Ključne besede: noht, bolezni nohtov, lokalno zdravljenje, permeabilnost

Abstract Frequent side effects and interactions with other drugs are very common in long-term systemic therapy of nail diseases. Ideally, nail diseases would be treated topically. Unfortunately, the poor permeability of the nail plate limits the efficacy of topical therapy. The nail unit and the two most common diseases affecting nail - onychomycosis and nail psoriasis - are briefly described to give an overview of the nature and scope of the problem of local drug delivery into the nail plate. The most important physico-chemical factor that affects drug permeation into the nail plate is the drug's molecular size, while charge and hydrophilicity/lipophilicity may also be important. To achieve sufficient drug concentration at the site of infection there is a need to reduce the integrity of the compact keratin nail plate. This can be done using chemical enhancers, the most effective of which are agents which split the disulfide linkages of keratin. Trends in the research in that field are the identification and characterisation of new chemical enhancers and physical methods to disrupt the keratin structure, such as keratinolytic enzymes and ultrasound.

Key words: nail, nail diseases, local treatment, permeability

1 Uvod

Nohti ščitijo distalni del prstov pred poškodbami, služijo kot orodje za prijemanje in upravljanje s predmeti, v današnjem času pa tudi estetskemu namenu (1). Bolezni nohtov pogosto spremljajo otrditev, zadebelitev, sprememba barve, distrofija, lomljivost ipd. Ker večinoma ne gre le za estetski problem in je prizadeta kakovost bolnikovega življenja, je potrebno zdravljenje. Zaradi slabe prepustnosti nohtne plošče, ki jo sestavljajo tesno zbite, kompaktne rožene celice in prisotnosti okužbe ali drugih bolezenskih sprememb v globljih plasteh nohta, lokalno zdravljenje ni dovolj učinkovito. Sistemsko zdravljenje je še vedno najuspešnejše pri huje izraženih kroničnih boleznih nohtov, čeprav je dolgotrajno, s pogostnimi neželenimi učinki ter možnimi interakcijami z drugimi zdravili. Tudi možnosti za ponoven pojav bolezni so velike. Vse to daje prednost lokalnemu zdravljenju obolelih nohtov, ki ima še druge dobre lastnosti: ne-invazivnost, ciljano dostavo učinkovin in večje bolnikovo sodelovanje (2). Omejili se bomo predvsem na raziskave za povečanje dostave učinkovin v noht, še prej pa moramo spoznati zgradbo nohta, naravo njegovih najpogostnejših bolezni in dejavnike, ki vplivajo na permeacijo učinkovine skozi nohtno ploščo.

2 Zgradba nohta

Nohtno enoto sestavljajo lateralna in proksimalna nohtna guba s tanko roženo plastjo (eponychium), nohtna matica (matrix unguis), nohtna posteljica in podnohtje (hyponychium), ki skupaj tvorijo nohtno ploščo (sliki 1 in 2).

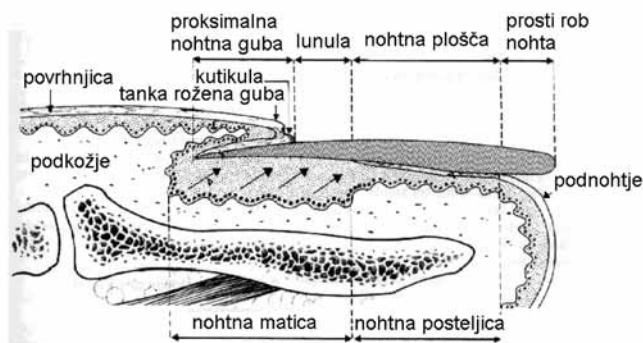
Nohtna matica je zarodni epitelij nohtne plošče, ki jo sestavljajo keratinociti, melanociti, Merkllove in Langerhansove celice (5). Del matice je tudi lunula, svetlejši, polmesečni del proksimalnega dela nohta, viden predvsem na palcih (1, 3). Najobsežnejše območje med distalnim koncem lunule in podnohtjem, pod nohtno ploščo, je nohtna posteljica. Ima tanek epitelij, ki nohtni plošči prispeva nekaj celic, kar omogoča neprekinjeno rast nohta, medtem ko se trdno drži nohtne posteljice (6). Podnohtje (hyponychium) je del vrhnjega epidermisa pod prostim robom nohtne plošče, ki preprečuje vdor snovi in mikroorganizmov pod noht (5). Noht obdajata proksimalna in lateralna nohtna guba, ki ga ščitita in mu dajeta oporo. Tanka rožena guba (eponychium) je epitelij proksimalne gube, ki ne vsebuje dlačnih foliklov niti lojnih žlez. Stratum corneum rožene gube, ki pokriva majhno površino nohtne plošče, se imenuje kutikula (5).



Slika 1: Konec prsta, kjer so prikazani glavni sestavni deli nohta (3)

Figure 1: Tip of the digit showing the component parts of the nail apparatus (3)

Nohtna plošča (slika 2) se razvija iz nohtne matice s postopnim zaroženevanjem in sploščenjem celic matriksa v distalni smeri, pri čemer celice izgubijo jedro in druge organele. Zveča se vsebnost tonofilamentov s kopičenjem, rastejo in tvorbo keratina, celice pa se močno povežejo med seboj z desmosomi in kompaktno medceličnino, ki deluje kot cement (5). Trdnost ter fizikalno in kemično stabilnost daje nohtu fibrilarni protein α -keratin. Kar 80 % keratina v nohtu je t.i. trdi ali lasni keratin, ki se od mehkega ali kožnega keratina razlikuje po visoki vsebnosti disulfidnih vezi, ki potekajo med globularnimi proteini z veliko vsebnostjo cisteina in keratinskimi vlakni. V keratinu so prisotne še druge vezi, kot so peptidne, polarne in vodikove (6). K trdnosti prispeva tudi majhna vsebnost vode (7 do 12 %), ki sicer določa elastičnost in prožnost nohta. Nohti so prepustnejši za vodo kot epidermis (7). Človeški noht se obnaša kot hidrofilna membrana, po čemer se razlikuje od drugih membran v telesu, kot so koža, vaginalna sluznica in sluznica v prebavilih (8). Nohtna plošča vsebuje le od 0,1 do 1 % lipidov (7) ter sledove mineralnih elementov, predvsem kalcija (njegov pomen je večkrat narobe razumljen ali uporabljen v oglaševanju izdelkov za nego nohtov), kar ne prispeva k trdnosti nohtne plošče (1, 3).



Slika 2: Shematski prikaz anatomske zgradbe nohta, prečni prerez prsta roke (4)

Figure 2: Schematic structure of the nail apparatus, longitudinal section of the digit (4)

Noht je pravzaprav specializiran roženi odrastek, ki se razlikuje od kože, ker se ne lušči, in od las, ker ne raste ciklično (3). Nohti na rokah rastejo s približno hitrostjo 3 mm/mesec, na nogah pa približno za polovico ali tretjino počasneje. Tako se nohti na rokah obnovijo v 4 do 6 mesecih, na nogah v 8 do 12 mesecih. Na hitrost rasti nohta vplivajo številni fiziološki in patološki dejavniki, a tudi okoljski dejavniki (2, 5, 6, 9).

3 Nohtne bolezni

Nohte lahko prizadenejo bakterijske, glivične (onihomikoza) ali virusne okužbe, starostne spremembe, nohtni tumorji, kot tudi nekatere kožne (luskavica, lichen planus, itd.) in sistemske bolezni. Nespecifične distrofije in barvne spremembe nastanejo zaradi nepravilne uporabe izdelkov za nego, okužb, nepravilnosti v proliferaciji nohtnih melanocitov ali proizvodnji melanina ter zunanjih vplivov (9). Največ raziskav na področju lokalnega zdravljenja nohtov vključuje onihomikozo in luskavico, ki sta najbolj pogostni bolezni nohtov.

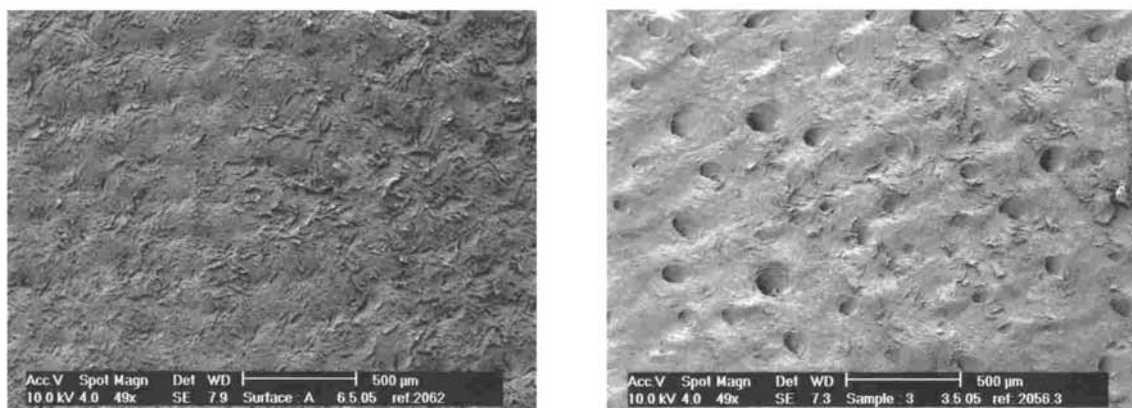
Onihomikoza je kronična glivična okužba nohtov, ki se pojavlja petkrat pogosteje na nogah kot na rokah. Ocenjujejo, da onihomikoza prizadene od 2 do 5 % evropske populacije, njena pojavnost narašča s starostjo (10). Poleg izpostavljenosti glivam pospešujejo okužbe še poškodbe nohtov, imunska neopornost, sladkorna bolezen, bolezni perifernega ožilja, podedovana individualna dovzetnost in čezmerno potenje (9, 10). Klinično se onihomikoze (slika 3) kažejo kot različne bolezenske spremembe: deformacija, zadebelitev in lomljivost nohtne plošče, belkaste drobljive lise na površini, rumenkasto obarvanje ter oniholiza (ločitev nohta od posteljice). Mikroorganizmi največkrat vstopajo skozi podnohtje ali lateralno nohtno gubo. Posledično je najprej okužena nohtna posteljica, za njo še spodnji del nohtne plošče (9).

Luskavica je vnetna kožna bolezen, pri kateri je povečana proliferacija celic bazalne plasti, celice rožene plasti pa se čezmerno luščijo. V severni Evropi in Ameriki prizadene od 1 do 3 % populacije. Več kot 50 % nohtne luskavice se pojavi pri bolnikih s klinično evidentno kožno luskavico (2, 9, 11). Patogeneza luskavice še vedno ni popolnoma znana in je verjetno posledica različnih genskih in imunskih dejavnikov ter okoljskih dejavnikov. Ločimo različne klinične slike. Pikčaste vdolbinice (parakeratotične celice na nohtni plošči, ki se kasneje nevidno oluščijo) so najpogostnejši znak luskavice, večje prečne brazde pa dlje trajajoče luskavice matriksa. Pojav madežev



Slika 3: Onihomikoza (9)

Figure 3: Onychomycosis (9)



Slika 4: Posnetek (SEM) površine membrane parkljev pred (a) in po (b) delovanju ultrazvoka (50 % jakost, 1 min) (26)

Figure 4: Scanning electron microphotographs of bovine hoof membrane surface before (a) and after (b) sonification (50 % intensity level, 1 min) (26)

lososove barve na nohtni plošči, drobne krvavitve in oniholiza so tudi lahko povezane z luskavico nohtne posteljice (9).

4 Zdravila za zdravljenje onihomikoze in nohtne luskavice

Zdravljenje je dolgotrajno in težavno zaradi prizadetosti globljih plasti nohta, trde, rožene, neprehodne nohtne plošče in počasne rasti nohta. Poleg vsega obstaja velika možnost, da bo prišlo do ponovnega pojava bolezni. Bolezni nohtov je mogoče zdraviti na več načinov, npr. sistemsko ali lokalno, z odstranitvijo nohtne plošče ter kombinacijami prvih treh.

4.1 Odstranitev nohta

Kirurška odstranitev nohtne plošče pride v poštev le izjemoma. Sprejemljivejša alternativa je odstranitev nohtne plošče s kemomehnično maceracijo nohta s keratinolitiki; ureo (20 do 40 %) v kombinaciji s salicilno kislino (10 %) (2) in glutaraldehidom (10) v mazilni podlagi pod okluzijo. Po odstranitvi bolnega nohta lahko stanje izboljšamo z lokalnim zdravljenjem (7, 9, 10, 11).

4.2 Zdravila za sistemsko zdravljenje

Za sistemsko zdravljenje onihomikoz so v preteklosti uporabljali griseofulvin in ketokonazol, ki so ju danes nadomestili novodobni antimikotiki: itrakonazol, terbinafin in flukonazol (9, 10, 12). Vsi so pri nas tudi registrirani. Itrakonazol in flukonazol spadata med t.i. azole, ki so pogojno hepatotoksične učinkovine in povzročajo potencialno nevarne interakcije z učinkovinami, ki se metabolizirajo prek jetrnega sistema s citokromom P-450 ter nekaterimi drugimi učinkovinami (9, 10, 12). Itrakonazol ima širok spekter protiglivičnega delovanja in visoko afiniteto do keratina. Po prenehanju zdravljenja ostane delujoča koncentracija učinkovine v nohtih tudi do nekaj mesecev, kar omogoča pulzno zdravljenje z manjšim celotnim odmerkom, ki dosega podobno učinkovitost kot nepretrgana uporaba pripravka (2, 9, 10, 13). Flukonazol premore ožji spekter delovanja, njegova uporaba v zdravljenju nohtnih glivičnih okužb pa je sorazmerno nova

(9). Alilamin terbinafin sam ali v kombinaciji z drugimi antimikotiki uporabljamo tako peroralno kot lokalno (10, 13). Peroralno dajanje terbinafina lahko povzroči številne neželene učinke ter hude zaplete, ki so sicer zelo redki, pojavijo pa se lahko tudi pri azolskih antimikotikih. To so različne vrste kožnih izpuščajev, Steven-Johnson sindrom in toksična epidermalna nekroliza. Terbinafin izkazuje nižjo frekvenco interakcij z drugimi učinkovinami, ki so omejene predvsem na rifampicin in cimetidin (12).

Sistemsko zdravljenje luskavice z antimetabolitom folne kisline metotreksatom, imunosupresivom ciklosporinom ali retinoidom etretinatom uporabljamo le za hude oblike nohtne luskavice (9).

4.3 Zdravila za lokalno zdravljenje

Zdravila za lokalno nanašanje v kombinaciji s sistemskim dajanjem povečajo učinkovitost, zmanjšajo pa trajanje in s tem morebitne neželene učinke sistema zdravljenja ter možnost ponovnega pojava bolezni (14).

Antimikotike najdemo v različnih nosilnih sistemih, kot so kreme, mazila, raztopine, pršila in laki. Zaradi nohtove zgradbe so najboljši inovativni laki za nohte, ki so sicer učinkoviti pri distalnih okužbah nohtne plošče (15, 16, 17). Nanašamo jih tako kot kozmetične lake za nohte. Na nohtu ostane polimerni film, ki po odparitvi topila vsebuje večjo koncentracijo učinkovine, katera pri povečanem difuzijskem gradientu bolje prodira v nohtno ploščo (18). V Sloveniji je registriran lak za nohte s 5 % amorfolfinom, ki je na tržišču že od leta 1992 (19). V svetu je poznan še lak z 8 % ciklopiroksom, ki je na tržišču od leta 1991; leta 1995 ga je FDA odobrila za zdravljenje dermatofitnih onihomikoz (15). Klinične študije kažejo na učinkovitost raztopine za nohte z azolskim antimikotikom tiokonazolom (16).

Na tujem tržišču se pojavlja še nekaj zdravil, katerih učinkovitost ni splošno priznana. Novi pripravek na nemškem tržišču vsebuje 0,5 % pirolakton olamin v hidroksipropil hitosanskem ogrodju, ki deluje protiglivično ter hkrati utrjuje in ščiti noht (20, 21). Raztopina salicilne kisline ima keratolitne in protiglivične lastnosti (22). Proti onihomikozi naj bi delovala tudi raztopina klorobutanola, metil in propil undekanoata ter salicilne kisline in njenih estrov. Klorobutanol ima

protibakterijske in protiglivične lastnosti, undekanojska kislina in njene soli prav tako delujejo proti nekaterim glivam (22, 23).

Za zdravljenje luskavice pogosto uporabljajo kortikosteroidne pripravke. Biološko uporabnost lahko izboljša okluzija obolelih nohtov s celofanskim ovojem. Uporaba raztopine ali kreme antimetabolita fluorouracila na območju nohtne matice zmanjša pojav jamic in subungualne hiperkeratoze. Raztopina kalcipotriola, sinteznega analoga vitamina D₃, pomaga pri zmerni nohtni luskavici. Znana lokalna antipsoriatika sta še retinoid tazaroten in antralin (9, 11). Pri nas sta registrirana le dva lokalna antipsoriatika kalcipotriol in kalcitriol. Fototerapija, peroralno ali lokalno dajanje psoralena (metoksalena) in obsevanje z UVA žarki, to je t.i. PUVA, ki je zelo učinkovita metoda za zdravljenje kožne luskavice, lahko izboljša tudi nohtno v treh do šestih mesecih. Možno je tudi zdravljenje luskavice nohtov z intralezionalno injekcijo kortikosteroida v proksimalno, če je obolela matica, ali lateralno v nohtno gubo, kadar je bolna nohtna posteljica (2, 9, 11).

5 Raziskave za izboljšanje permeacije učinkovin skozi noht

Raziskave v zadnjih dvajsetih letih so usmerjene predvsem na opredeljevanje in izboljšanje permeacije učinkovin v globlje nohtove plasti, kjer so vnetja in okužbe pogostejše.

5.1 Dejavniki, ki vplivajo na permeacijo učinkovine v noht

Med prodiranjem v noht se učinkovina najprej porazdeli med polimerno keratinsko mrežo, nato pride do difuzije. Potek je odvisen od fizikalno-kemijskih lastnosti učinkovine molekule (velikosti, oblike, nabitosti, hidrofobnosti), lastnosti nosilnega sistema (narave vehikla, pH, koncentracije učinkovine), prisotnosti pospeševalcev permeacije, nohtnih lastnosti (debeline, hidratacije) in interakcij med molekulo učinkovine in nohtnim keratinom. Hitrost permeacije molekule skozi membrano je obratno odvisna od velikosti molekule (24, 25). Kemična sestava nohta kaže na to, da so za prehod učinkovin najpomembnejše hidrofilne poti. Nabrekanje v vodi poveča razdaljo med keratinskimi vlakni, zato noht postane bolj elastičen. Vendar se permeabilnost zaradi hidratacije ne poveča. Vehiklov pH vpliva na disociacijo učinkovin. Tako nenabite molekule prehajajo membrano hitreje kot nabite, ker so slednje obdane z vodo, kar poveča njihovo velikost (24, 25). Ovirana permeacija nabitih učinkovin skozi noht je lahko tudi posledica t.i. Donnanovega učinka, elektrostatskega odboja med nabitim keratinom in enako nabito molekulo učinkovine (24, 25). Če vehikel ne spremeni nohtove barierne vloge, vpliva na prehod učinkovin skozi noht samo vrednost pH. Kadar del vehikla po nanosu odpari, nastane na površini nohta nasičena raztopina učinkovine, kjer koncentracijski gradient pospeši permeacijo učinkovine v noht in skozenj (2, 18).

5.2 Pospeševanje permeacije učinkovin v noht

Če hočemo doseči signifikantno koncentracijo učinkovin na mestu okužbe, moramo njihov prehod skozi nohtno ploščo povečati, kar lahko storimo na fizikalni ali kemični način.

Fizikalna odstranitev površine nohta s piljenjem ali striženjem okužene plasti, preden bomo topikalno nanесли učinkovino, se je izkazala za učinkovito metodo, kar podpirajo tudi izsledki kliničnih študij (2, 7). V literaturi ni zaslediti priljubljenih fizikalnih metod, ki jih uporabljajo za izboljšanje transdermalne permeacije učinkovin, kot so sonoforeza, elektroforeza in elektroporacija.

V našem raziskovalnem delu smo membrane govejih parkljev izpostavili ultrazvoku. Pred testom permeacije v modificiranih Franzovih celicah smo jih obdelali z ultrazvokom pri določeni frekvenci, jakosti, ciklusu in času uporabe, in ugotovili, da ostanejo v stanju visoke permeabilnosti kar nekaj časa (slika 4). Permeabilnost teh membran v primerjavi z neobdelanimi je bila signifikantno večja ($p < 0,05$). Da bi z večjo gotovostjo lahko govorili o učinkovitosti metode, bi jo bilo potrebno preizkusiti tudi na človeških nohtih (26).

Kemični pospeševalci

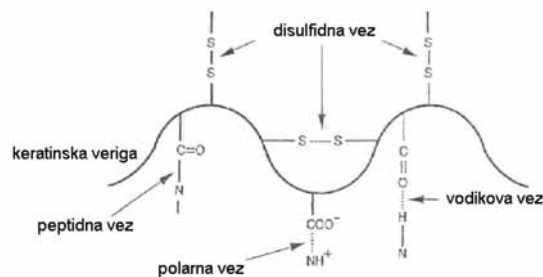
Kemični pospeševalci absorpcije učinkovin v noht morajo biti predvsem sposobni reagirati s komponentami keratina tako, da povzročijo spremembe v primarni ali višjih strukturah keratina. Tarčne vezi nohtnega keratina za potencialne pospeševalce prikazuje shematični diagram (slika 5).

Keratinolitiki

Salicilna kislina, urea in gvanidin (slika 6) vplivajo na terciarno strukturo, mogoče tudi sekundarne vezi (vodikove vezi) v keratinu (27). Poleg tega še hidratirajo in mehčajo nohtno ploščo, ki postane manj kompaktna in zato tudi bolj permeabilna za učinkovine (2). Omenili smo že, da keratinolitike uporabljajo tudi pri kemični odstranitvi nohtne plošče. Quintanar in sodelavci (1998) so raziskovali učinek keratinolitikov na permeabilnost treh imidazolnih antimikotikov in na podlagi slik vrstične elektronske mikroskopije ugotovili, da se v nohtni plošči izoblikujejo pore (28). Kljub vsemu so v številnih raziskavah dokazali, da so keratinolitiki učinkoviti le v sinergiji skupaj z drugimi kemičnimi pospeševalci, kot sta npr. N-(2-merkaptopropionil)glicin (27) in N-acetilcistein (29).

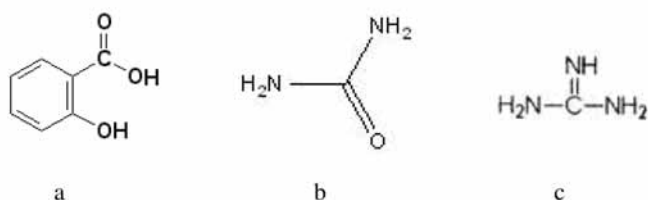
Merkaptani

Kemične spojine, ki vsebujejo skupino -SH, kot so derivati aminokislin, N-acetilcistein, cistein in merkaptetoetanol (slika 7) z redukcijo disulfidnih vezi porušijo strukturo in povečajo prodiranje učinkovin v



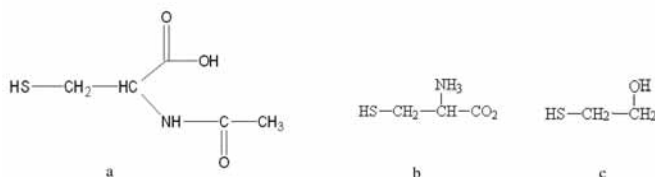
Slika 5: Vezi v keratinu, potencialne tarče kemičnih pospeševalcev penetracije (2, 7)

Figure 5: Bonds in keratin that could potentially be targeted by chemical penetration enhancers (2, 7)



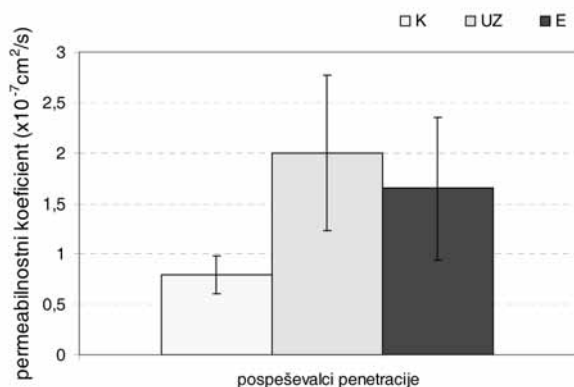
Slika 6: Salicilna kislina (a), urea (b) in gvanidin (c)

Figure 6: Salicylic acid (a), urea (b) and guanidine(c)



Slika 7: N-acetil-L-cistein (a), cistein (b) in 2-merkaptetoanol (c)

Figure 7: N-acetyl-L-cysteine (a), cysteine (b) and 2-mercaptoethanol (c)



Slika 8: Vpliv keratinolitičnega encima (E) in ultrazvoka (UZ) na permeabilnostni koeficient modelne učinkovine skozi membrane kravjih parkljev v primerjavi s kontrolo, kjer integriteta membrane ni bila spremenjena (K – kontrola). Permeabilnostni koeficient opisuje hitrost potovanja modelne učinkovine (metformina) skozi noht in je definirana kot produkt difuzijskega koeficienta in porazdelitvenega koeficienta, ki ju izračunamo po 2. Fickovem principu, deljeno z debelino membrane.

Figure 8: The effect of keratinolytic enzyme (E) and ultrasound (UZ) on permeability coefficient of the drug through bovine hoof membranes in comparison to the control where the membrane integrity was not disrupted (K – control). Permeability coefficient describes the rate of the model drug (metformin) transport through the nail per unit concentration and it is conventionally defined as the product of diffusion coefficient and partition coefficient (according to Fick's second law), divided by the membrane thickness.

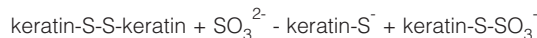
noht. Pri tem se sami oksidirajo, kot poenostavljeno ponazarja reakcija (2):



Učinkovitost sulfhidrilnih snovi so dokazali v številnih študijah. Sun in sodelavci (1997) so poročali o pospešeni permeaciji z acetilcisteinom in njegovem sinergističnem učinku z ureo (29). Kobayashi in sodelavci (1998) so pokazali, da acetilcistein in 2-merkaptetoanol učinkovito pospešita perungualno permeacijo, tako v vodnem kot lipofilnem vehiklu (30). Ker pa je 2-merkaptetoanol zdravju škodljiva in farmatcevtsko nesprejemljiva spojina z močnim vonjem, jo v študijah uporabljajo le za pozitivno kontrolo.

Sulfiti in bisulfiti

Sulfiti in bisulfiti, kot sta npr. Na₂S₂O₅ ali Na₂SO₃, so znani reducenti disulfidnih vezi v keratinu. Uporabljajo jih tudi za trajno kodranje las. Mehanizem redukcije (27):



Keratinolitični encimi

Keratine v naravi hidrolizirajo nekateri mikroorganizmi, ki sintetizirajo keratinolitične encime, npr. patogene glive, ki povzročajo dermatofitije ali kandidoze. Keratinolitični encimi spadajo med najaktivnejše proteinaze; so široko specifični, kar kaže na njihovo uporabo na različnih področjih, med drugim v medicini, kozmetiki, industriji usnja in detergentov (31). Keratinaze razgradijo keratin s cepitvijo peptidnih vezi. Prvič so poročali o redukciji disulfidnih vezi s keratinazami leta 1999 (32). Glede na njihovo hidrolitično aktivnost bi keratinaze lahko bile učinkovite tudi na nohtih. Po inkubaciji s keratinazo glive *Doratomyces microsporus* so dokazali hidrolitično aktivnost na roženi plasti kože, nohtih in parkljih (31, 32, 33, 34).

Keratinolitični encim glive *Paecilomyces marasmioides* smo raziskovalno v poskusih permeacije v Franzovih celicah preizkušali na membranah kravjih parkljev, kjer je bila v primerjavi s kontrolo permeacija modelne učinkovine statistično signifikantno hitrejša (slika 8). Po inkubaciji z nohtnimi odrezki so bili pod vrstičnim elektronskim mikroskopom vidni razdiralni učinki na integriteto nohtne plošče (26, 35). Čeprav je bila učinkovitost encima v primerjavi z agresivnimi kemikalijami (2-merkaptetoanolom, N-acetilcisteinom) statistično manjša, je njegova prednost pred preostalimi pospeševalci predvsem neškodljivost za organizem. Težava pri keratinazah je njihova majhna obstojnost in posledično težavno vgrajevanje encimov v nosilne sisteme, kar pomeni poseben izziv farmacevtskim tehnologom.

6 Sklep

Ker bolezni nohtov ne pomenijo življenjske ogroženosti ljudi, jim farmacevtska industrija dolgo ni posvečala pozornosti. Raziskave zadnjih let kažejo pozitivne premike na tem področju. Zaradi mnogih zapletov ima lokalno zdravljenje prednost pred sistemskim, kar dokazujejo tudi klinične in farmakoekonomske raziskave. Prihodnost je usmerjena v iskanje in karakterizacijo novih kemičnih pospeševalcev, preizkušanje fizikalnih metod, sonoforeze in elektroforeze ter različnih kombinacij reducentov disulfidnih vezi, keratolitikov in keratinaz s fizikalnimi metodami.

7 Zahvala

Hvala dr. Jožici Friedrich in Martini Mohorčič s Kemijskega inštituta v Ljubljani za seznaničev s keratinazami.

8 Literatura

1. De Berker D, Forslind B. The structure and properties of nails and periungual tissues. V: Forslind B, Lindberg M, Norlen L. Skin, hair and nails. Marcel Dekker Inc. 2004: 409-464.
2. Murdan S. Drug delivery to the nail following topical application. Int J Pharm 2002; 236: 1-26.
3. Stojanovič L. Bolezni nohtov. V: Kinsky A. Kožne in spolne bolezni. Združenje slovenskih dermatovenerologov. 2002: 311-318.
4. Peyrefitte G. Lehrbuch Anatomie und Physiologie der Haut für Kosmetikerinnen. Verlag Hans Huber Bern. 2001: 66-67.
5. Fleckman P. Basic science of the nail unit. V: Scher RK, Daniel CR. Nails: Therapy, Diagnosis, Surgery. WB Saunders. 1997: 37-54.
6. Dawber RPR, De Berker D, Baran R. Science of the nail apparatus. V: Baran R, Dawber RPR. Diseases of the nails and their management. Blackwell Scientific Publications. 1994: 1-34.
7. Sun Y, Liu JC, Wang JCT, De Doncker P. Nail penetration. Focus on topical delivery of antifungal drugs for onychomycosis treatment. V: Brough RL, Maibach HIE. Percutaneous Absorption. Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology. Marcel Dekker Inc. 1999: 759-787.
8. Mertin D, Lippold BC. In-vitro permeability of the human nail and a keratin membrane from bovine hooves: influence of the partition coefficient octanol/water solubility of drugs on their permeability and maximum flux. J Pharm Pharmacol 1997; 49: 30-34.
9. Rich P, Scher RK. An atlas of diseases of the nail. The Parthenon Publishing Group. 2003.
10. Niewerth M, Kortig HC. Management of onychomycoses. Drugs 1999; 58: 283-296.
11. Do CL in Scher RK. Psoriasis, Nails. <http://www.emedicine.com/DERM/topic363.htm> 2006.
12. Elewski BE. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis and management. Clin Microbiol Rev 1998; 11 (3): 415-429.
13. Meis JFGM, Verweij PE. Current management of fungal infections. Drugs 2001; 61 Suppl.1: 13-25.
14. Gupta AK. Management of the toe onychomycosis: What is the potential for improving efficacy of treatment? Clinics in Dermatology 2002; 20: 607-609.
15. Gupta AK, Baran R. Ciclopirox nail lacquer solution 8 % in the 21st century. J Am Acad Dermatol 2000; 43 (4): 96-102.
16. Roberts DT, Taylor WD, Boyle J. Guidelines for treatment of onychomycosis. Brit J Derm 2003; 148: 402-410.
17. Zaig M. Amorolfine nail lacquer: clinical experience in onychomycosis. J Eur Acad Dermatol Venerol 1995; 4 (Suppl.1): 23-30.
18. Mertin D, Lippold BC. In-vitro permeability of the human nail and of a keratin membrane from bovine hooves: penetration of chloramphenicol from lipophilic vehicles and a nail lacquer. J Pharm Pharmacol 1997; 49: 241-245.
19. <http://www.penlac.com> 2006.
20. <http://www.tauruspharma.de> 2006.
21. Dubini F, Bellotti MG, Frangi A, Monti D, Saccomani L. In vitro antimycotic activity and nail permeation models of a piroctone olamine (octopirox) containing transungual water soluble technology. Arzneimittelforschung 2005; 55(8): 478-83.
22. Sweetman SC. Martindale 3-4Ed. Pharmaceutical Press. 2005.
23. <http://www.cerumol.com/mspc.htm> 2003.
24. Mertin D, Lippold BC. In-vitro permeability of the human nail and of a keratin membrane from bovine hooves: prediction of the penetration rate of antimycotics through the nail plate and their efficacy. J Pharm Pharmacol 1997; 49: 866-872.
25. Kobayashi Y, Komatsu T, Sumi M, Numajiri S, Miyamoto M, Kobayashi D, Sugibayashi K, Morimoto Y. In vitro permeation of several drugs through the human nail plate: relationship between physicochemical properties and nail permeability of drugs. Eur J Pharm Sci 2004; 21: 471-477.
26. Torkar A. Vpliv keratinaze in ultrazvoka na permeacijo modelne učinkovine v noht. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, september 2005.
27. Malhotra GG, Zatz JL. Investigation of nail permeation enhancement by chemical modification using water as a probe. Pharm Sci 2002; 91: 312-323.
28. Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A, Tapia-Olguin P, Kalia YN, Buri P. The effect of keratolytic agents on the permeability of three imidazole antimycotic drugs through the human nail. Drug Dev Ind Pharm 1998; 24 (7): 685-690.
29. Sun Y, Liu JC, Kimbleton E in Wang, J. Antifungal treatment of nails. US Patent No. 5, 696, 164. 1997.
30. Kobayashi Y, Miyamoto M, Sugibayashi K, Morimoto Y. Enhancing effect of N-acetyl-L-cysteine or 2-mercaptoethanol on the in vitro permeation of 5-fluorouracil or tolinaftate through the human nail plate. Chem Pharm Bull 1998; 46 (11): 1797-1802.
31. Friedrich J, Kern S. Hydrolysis of native proteins by keratinolytic protease of *Doratomyces microsporus*. J Mol Cat Enzym 2003; 21: 35-37.
32. Vignardet C, Guillaume YC, Friedrich J, Millet J. A first order experimental design to assess soluble proteins released by a new keratinase from *Doratomyces microsporus* on human substrates. Int J Pharm 1999; 191 (2): 95-102.
33. Friedrich J, Gradišar H, Vrecl M, Pogačnik A. In vitro degradation of porcine skin epidermis by a fungal keratinase of *Doratomyces microsporus*. Enzyme and Microbial Technology 2005; 36: 455-460.
34. Vignardet C, Guillaume YC, Michel L, Friedrich J, Millet J. Comparison of two hard keratinous substances submitted to the action of a keratinase using an experimental design. Int J Pharm 2001; 224 (1-2): 115-122.
35. Mohorčič M, Torkar A, Friedrich J, Kristl J, Murdan S. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery. Int J Pharm 2007; 322 (1-2): 196-201.