

AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU

Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej

Krzysztof Cał

**WPLYW RODZAJU NOŚNIKA ORAZ WŁAŚCIWOŚCI
FIZYKOCHemiczNYCH TERPENÓW NA ICH
PRZENIKANIE DO WARSTW SKÓRY LUDZKIEJ**

Rozprawa habilitacyjna

**Kierownik Katedry:
prof. dr hab. n. farm. Małgorzata Sznitowska**

GDAŃSK 2006

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

© Copyright by Medical University of Gdańsk

Wydawca: *Akademia Medyczna w Gdańsku*
Druk: *Dział Wydawnictw AMG*
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a,
Zlecenie KW/205/06

Rozprawę habilitacyjną stanowi jedno tematyczny cykl załączonych publikacji.

*Opracowanie to jest zestawieniem i podsumowaniem opublikowanych
wyników badań i nie zawiera szczegółowej metodyki doświadczeń
oraz kompletnych danych piśmiennictwa.*

*Rozprawę habilitacyjną wykonano częściowo w ramach projektu badawczego
nr 2 P05F 003 26 Komitetu Badań Naukowych.*

SPIS TREŚCI

1. WPROWADZENIE	7
1.1. BUDOWA I FUNKCJA SKÓRY	7
1.2. PRZENIKANIE KSENOBIOTYKÓW DO SKÓRY I PRZEZ SKÓRĘ	9
1.3. BADANIE PRZENIKANIA KSENOBIOTYKÓW DO SKÓRY I PRZEZ SKÓRĘ	10
1.4. ZASTOSOWANIE TERPENÓW I OLEJKÓW ETERYCZNYCH W FARMACJI, MEDYCYNIE I KOSMETYCE ..	12
<i>Piśmiennictwo.</i>	<i>14</i>
2. ZAŁOŻENIA I CEL BADAŃ	17
3. PRZENIKANIE TERPENÓW DO WARSTW SKÓRY LUDZKIEJ.....	18
3.1. WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE WYBRANYCH TERPENÓW.....	18
3.2. WPŁYW WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNYCH TERPENÓW NA ICH PRZENIKANIE DO WARSTW SKÓRY LUDZKIEJ W WARUNKACH EX VIVO	19
3.3. WPŁYW RODZAJU NOŚNIKA NA PRZENIKANIE TERPENÓW DO WARSTW SKÓRY LUDZKIEJ W WARUNKACH EX VIVO	20
3.4. WPŁYW RODZAJU NOŚNIKA NA PRZENIKANIE TERPENÓW DO WARSTWY ROGOWEJ NASKÓRKA SKÓRY LUDZKIEJ W WARUNKACH IN VIVO	23
4. WNIOSKI KOŃCOWE	25
<i>Tabela 1. Podstawowe właściwości fizykochemiczne badanych terpenów.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabela 2. Przenikanie terpenów do warstw skóry w warunkach ex vivo.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabela 3. Eliminacja terpenów z warstw skóry w warunkach ex vivo po 1 h (t=0) aplikacji.</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 4. Absorpcja terpenów w warstwach skóry w warunkach ex vivo po 8 h aplikacji olejków eterycznych.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabela 5. Absorpcja terpenów w warstwach skóry w warunkach ex vivo po 8 h aplikacji olejków eterycznych inkorporowanych w podłożach dermatologicznych.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabela 6. Przenikanie terpenów do warstw skóry w warunkach ex vivo w czasie ich aplikacji w podłożach dermatologicznych.</i>	<i>33</i>
<i>Tabela 7. Eliminacja terpenów z warstw skóry w warunkach ex vivo po 1 h (t=0) aplikacji w podłożach dermatologicznych.</i>	<i>34</i>
<i>Tabela 8. Absorpcja w warstwie rogowej i eliminacja terpenów po ich aplikacji w podłożach dermatologicznych w warunkach in vivo.</i>	<i>35</i>
PUBLIKACJE STANOWIĄCE ROZPRAWĘ HABILITACYJNĄ	36
1. <i>Aqueous solubility of liquid monoterpenes at 293 K and relationship with calculated log P value.</i>	<i>37</i>
2. <i>Cutaneous absorption and elimination of three acyclic terpenes – in vitro studies.....</i>	<i>40</i>
3. <i>Effect of physicochemical properties of cyclic terpenes on their ex vivo skin absorption and elimination kinetics..</i>	<i>48</i>
4. <i>Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles</i>	<i>54</i>
5. <i>How does the type of vehicle influence the in vitro skin absorption and elimination kinetics of terpenes?.....</i>	<i>60</i>
6. <i>Stratum corneum absorption and retention of linalool and terpinen-4-ol applied as gel or oily solution in humans..</i>	<i>65</i>

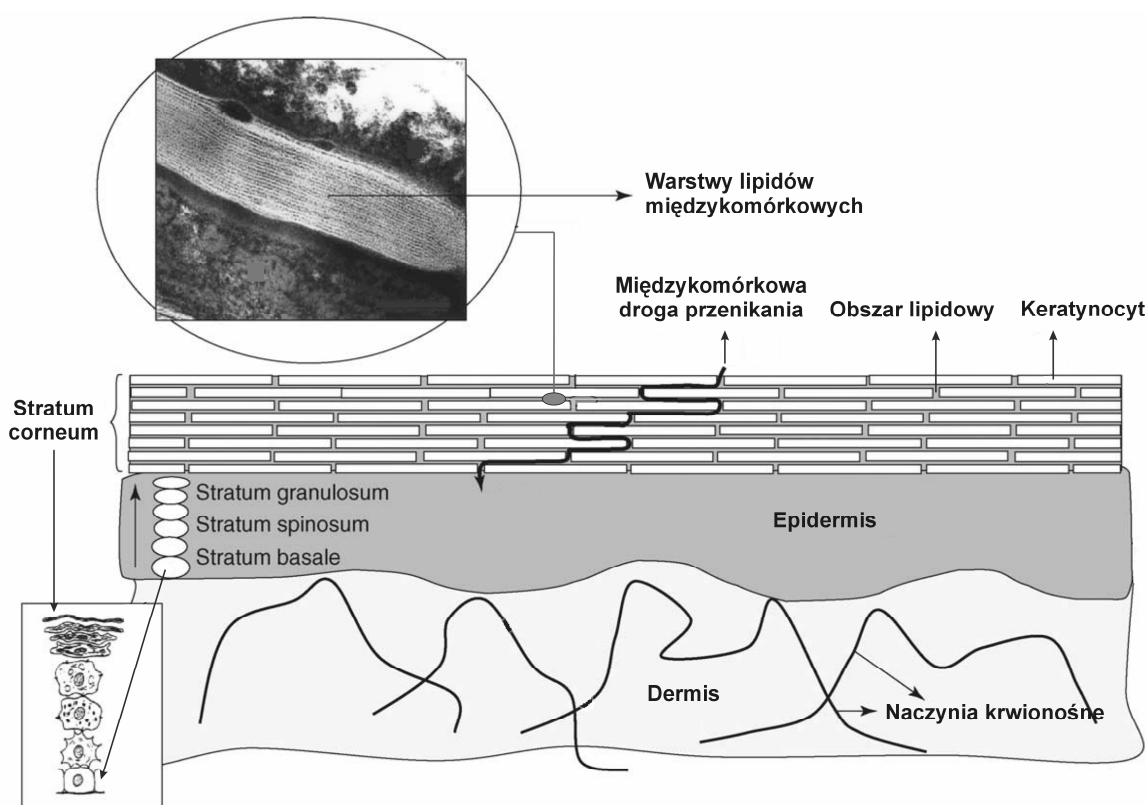
Wykaz użytych skrótów:

- SC - warstwa rogowa naskórka (*stratum corneum*),
SC I - zewnętrzna frakcja warstwy rogowej,
SC II - środkowa frakcja warstwy rogowej,
SC III - wewnętrzna frakcja warstwy rogowej,
ED - skóra właściwa z naskórkiem pozbawionym warstwy rogowej (*epidermis + dermis*),
log P - logarytm dziesiętny współczynnika podziału n-oktanol/woda.

1. WPROWADZENIE

1.1. Budowa i funkcja skóry

Skóra jest barierą chroniącą organizm przed działaniem czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych oraz urazami mechanicznymi (Bronaugh i Maibach, 1999; Hadgraft, 2001; Williams, 2003). Odgrywając istotną rolę w gospodarce cieplnej, wodno-elektrolitowej i procesach odpornościowych, skóra utrzymuje równowagę między ustrojem a środowiskiem zewnętrznym. Zawarta w skórze melanina chroni organizm przed działaniem promieniowania ultrafioletowego. Skóra uczestniczy w metabolizmie lipidów, węglowodanów, białek i witamin. Obecne w skórze zakończenia nerwowe umożliwiają odbiór bodźców z zewnątrz. Organ ten składa się z naskórka (*epidermis*) z warstwą rogową (*stratum corneum*) oraz skóry właściwej (*dermis*). Budowę skóry przedstawiono schematycznie na rycinie 1.



Rycina 1. Schemat budowy skóry (Honeywell-Nguyen i Bouwstra, 2005).

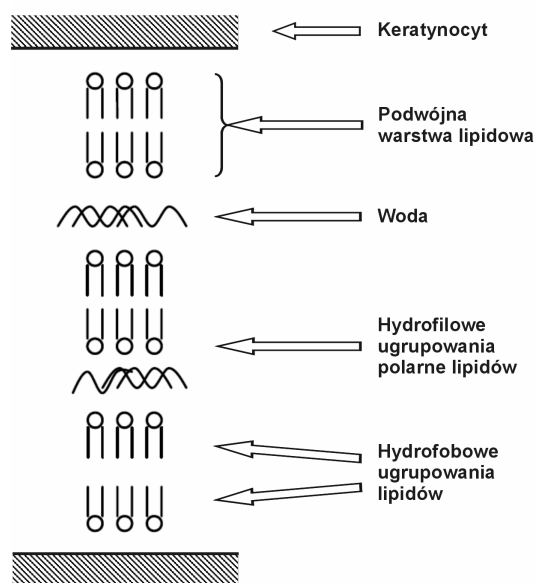
Skóra właściwa ma grubość 0,5–2 mm (Bronaugh i Maibach, 1999; Bochenek i Reicher, 2003; Williams 2003; Burns i in., 2004). Zbudowana jest z włókien kolagenu i niewielkiej ilości elastyny oraz mukopolisacharydów: kwasu hialuronowego i chondroitynosiarkowego,

kompleksów polisacharydowo-białkowych i pojedynczych fibroblastów. Zawiera komórki łącznotkankowe, naczynia krwionośne, zakończenia nerwowe i przydatki skóry (przewody potowe, gruczoły łojowe i mieszki włosowe). Głębiej znajduje się tkanka podskórna (*subcutis*), składająca się ze zrazików tłuszczowych przedzielonych luźną, włóknistą tkanką łączną.

Przez warstwę podstawną (*stratum basale*) skóra właściwa łączy się z naskórkiem (Bronaugh i Maibach, 1999; Bochenek i Reicher, 2003; Williams 2003; Burns i in., 2004). Naskórek składa się z ułożonych warstwowo keratynocytów, powstających w wyniku ciągłych podziałów komórek warstwy podstawnej. W warstwie kolczystej (*stratum spinosum*) wraz ze zbliżaniem się do powierzchni skóry ulegają one spłaszczeniu, natomiast w warstwie ziarnistej (*stratum granulosum*) powstają w nich ciała keratohialinowe, które wraz z białkami włóknistymi i elementami cytoplazmy rozpoczynają proces keratynizacji. W jego wyniku komórka obumiera. Proces przemieszczania się keratynocytów od warstwy podstawnej do momentu złuszczenia na powierzchni skóry trwa od 2 do 4 tygodni. W efekcie powstaje strefa martwych komórek, *stratum corneum*, złożona z około 15-20 warstw. Martwe, pozbawione jąder, keratynocyty zbudowane są głównie z białka – α -keratyny (Hadgraft i Guy, 1989; Williams, 2003; Burns i in., 2004). Komórki warstwy rogowej mogą zawierać od 10 do 80% wody, a grubość *stratum corneum*, w zależności od stopnia uwodnienia, wynosi od 10 do 100 μm .

Przestrzenie międzykomórkowe *stratum corneum* wypełnione są lipidami ułożonymi w uporządkowane struktury laminarne, których jednostką podstawową jest podwójna warstwa lipidowa (Hadgraft i Guy, 1989; Bronaugh i Maibach, 1999; Williams, 2003, Burns i in., 2004). Struktura ta powstaje w czasie keratynizacji – w *stratum granulosum* z lipidów tworzą się tak zwane ciała lamelarne, które podczas obumierania keratynocytów wydzielane są do przestrzeni międzykomórkowych. Lipidy warstwy rogowej to głównie ceramidy, cholesterol i jego estry, kwasy tłuszczowe oraz triglicerydy. Hydrofilowe ugrupowania polarne lipidów zwrócone są do siebie, a pomiędzy nimi znajduje się monomolekularna warstwa wody (ryc. 2).

Znajdujące się w skórze właściwej i dochodzące aż do granicy z warstwą podstawną naczynia krwionośne dostarczają do skóry tlen i substancje odżywcze, a także usuwają z niej toksyny i metabolity (Hadgraft i Guy, 1989; Bochenek i Reicher, 2003; Williams, 2003; Burns i in., 2004). Z drugiej strony, naczynia te dostarczają bezpośrednio do krążenia ogólnego substancje, które przeniknęły barierę warstwy rogowej.



Rycina 2. Układ lipidów międzykomórkowych (Buck, 2004).

1.2. Przenikanie ksenobiotyków do skóry i przez skórę

Zdolność ksenobiotyków do przenikania przez skórę zależy od dwóch następujących po sobie procesów: substancja w postaci rozpuszczonej musi uwolnić się z nośnika, w którym się znajduje, a następnie pokonać barierę skórną (Bronaugh i Maibach, 1999; Langner, 2002; Janicki i in., 2003; Williams, 2003). Oba procesy są ściśle ze sobą związane i zależą od właściwości fizykochemicznych substancji penetrującej, rodzaju nośnika i drogi penetracji.

Wyróżnia się dwie drogi wchłaniania substancji egzogennych przez skórę: drogę transepidermalną przez warstwy komórek skóry oraz drogę transfolikularną przez przydatki skóry (Bronaugh i Maibach, 1999; Janicki i in., 2003; Williams, 2003). Droga transfolikularna przez przewody potowe, gruczoły łojowe i mieszki włosowe ma małe znaczenie, ponieważ przydatki skóry zajmują mniej niż 1% jej powierzchni, a dyfuzję może dodatkowo utrudniać aktywność wydzielnicza tych gruczołów.

Główną drogą przenikania ksenobiotyków przez skórę jest droga transepidermalna (Bronaugh i Maibach, 1999; Williams, 2003). Ponieważ warstwy żywe skóry (*epidermis* i *dermis*) można traktować jako hydrożel białkowy, w którym dyfuzja (przenikanie) substancji penetrującej zachodzi z jednakową, nieograniczoną szybkością, warstwy te nie wpływają na wielkość i szybkość penetracji. Rzeczywistą barierą w przenikaniu substancji przez skórę stanowi martwa warstwa rogowa naskórka, przez którą substancje dyfundują głównie lipidową drogą międzykomórkową (ryc. 1 i 2). Ścisłe ułożenie keratynocytów i laminarne ułożenie lipidów

otaczających komórki sprawiają, że przez warstwę rogową skóry substancje dyfundują ponad tysiąc razy wolniej niż przez żywe warstwy skóry. Charakter lipofilowy warstwy rogowej sprzyja przenikaniu substancji lipofilowych, niepolarnych, niejonizowanych i o niskiej masie cząsteczkowej. Chociaż możliwe jest przenikanie substancji hydrofilowych lub jonów przez komórki *stratum corneum* lub polarne obszary wodne, to drogi te mają niewielki udział w przenikaniu substancji przez skórę (Sznitowska i in., 1996, 1998; Bronaugh i Maibach, 1999).

Przyjmując, że warstwa rogowa naskórka jest jednorodną membraną lipidową, proces przenikania substancji aplikowanej w nośniku (podłożu) na skórę można uznać za dyfuzję bierną, którą opisuje pierwsze prawo Fick'a (wzór 1) (Gabard i in., 1999):

Wzór 1

$$J = \frac{K \times D \times \Delta C}{L}$$

gdzie:

- J - ilość substancji dyfundującej - szybkość dyfuzji ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$),
- K - współczynnik podziału substancji między warstwę rogową a podłoże,
- D - współczynnik dyfuzji substancji w warstwie rogowej (cm^2/h),
- ΔC - różnica stężeń substancji po obu stronach membrany – warstwy rogowej ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$),
- L - długość drogi dyfuzji – grubość warstwy rogowej (cm).

Współczynnik podziału K substancji między warstwę rogową a podłoże jest trudny do wyznaczenia, dlatego do obliczeń zwykle stosuje się wartość współczynnika podziału substancji między n-oktanol a wodę (Gabard i in., 1999). Najlepiej przez skórę przenikają substancje o wartości logarytmu dziesiętnego tego współczynnika ($\log P$) od 2 do 4. Wchłanianie bardziej lipofilowych związków może być ograniczone przez hydrofilowy charakter głębiej położonych, żywych warstw skóry.

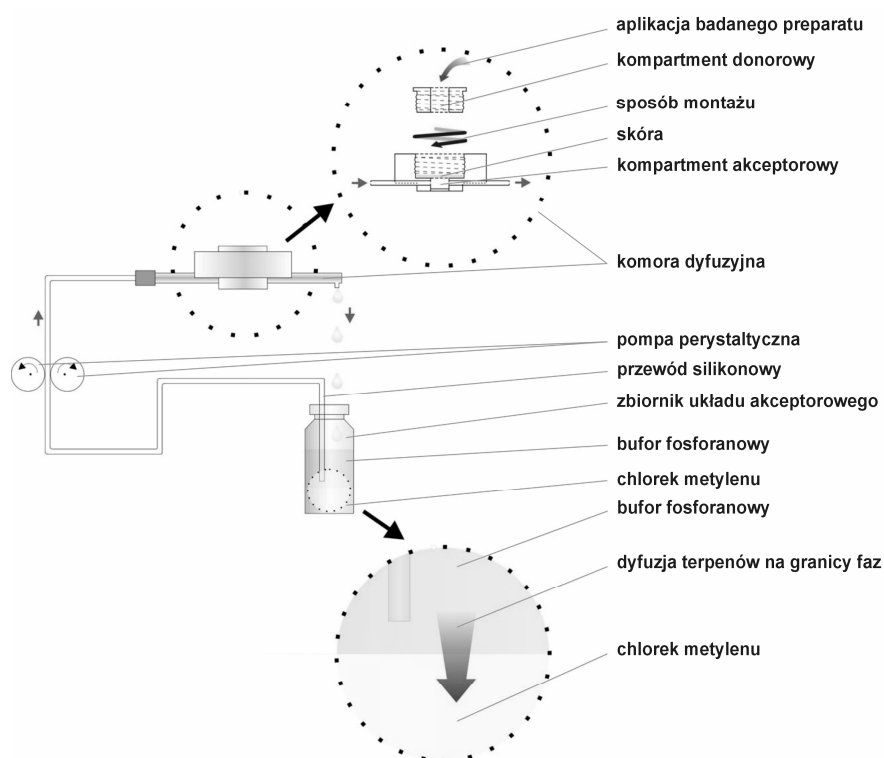
1.3. Badanie przenikania ksenobiotyków do skóry i przez skórę

Rozpatrując przenikanie przez skórę jako proces dyfuzji biernej przez martwą warstwę rogową, z dużym prawdopodobieństwem można przyjąć, że proces ten będzie przebiegał podobnie zarówno w warunkach *in vivo* jak i *ex vivo*, a ewentualne różnice mogą być wynikiem jedynie różnego stopnia uwodnienia warstwy rogowej (Bronaugh i Maibach, 1999; Williams, 2003). W praktyce, w badaniach *ex vivo* często wykorzystuje się skórę ludzką pobraną śródoperacyjnie lub ze zwłok. W zależności od charakteru doświadczenia skórę lub jej izolowane warstwy umieszcza się w komorach dyfuzyjnych, gdzie stanowi ona rodzaj przegrody między

kompartmencie donorowym a akceptorowym. Płyn akceptorowy omywa skórę od strony skóry właściwej. Płyn ten powinien zapewniać warunki *sink*, które panują w warunkach *in vivo* – rozpuszczalność substancji badanej w płynie akceptorowym jest taka, by nie ograniczać szybkości uwalniania lub przenikania. Aby uzyskać stałą i jednocześnie największą szybkość dyfuzji, w warunkach *ex vivo* stosuje się aplikację substancji badanej w tak zwanej dawce nieskończonej (*infinite dose*), to znaczy, że pomimo procesu dyfuzji ilość substancji pozostająca w nośniku jest tak duża, że nie wpływa na szybkość i wielkość jej przezskórnej penetracji.

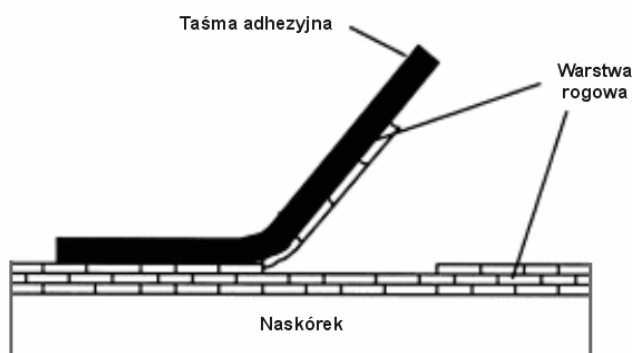
Schemat aparatury wykorzystywanej do badania przenikania terpenów w warunkach *ex vivo* przedstawiono na rycinie 3.

W przypadku ograniczonej rozpuszczalności substancji penetrującej w roztworach wodnych, w celu uzyskania warunków *sink* zastosować można układ dwufazowego płynu akceptorowego, złożony na przykład z izotonicznego buforu fosforanowego o pH 7,3 i niemieszającego się z nim rozpuszczalnika organicznego – chlorku metylenu (ryc. 3) (Cal i in., 2001). Skóra właściwa pozostaje w kontakcie wyłącznie z buforem fosforanowym. Rozpuszczone w fazie wodnej terpeny kumulują się zgodnie z prawem podziału w chlorku metylenu znajdującym się w zbiorniku.



Rycina 3. Schemat aparatury do badania przenikania terpenów (Cal i in., 2001).

W badaniach penetracji prowadzonych w warunkach *ex vivo* oznacza się ilość substancji przenikającej przez skórę do płynu akceptorowego, jak i absorbowanej w skórze lub jej warstwach (Roberts i Walters, 1998; Bronaugh i Maibach, 1999; Williams, 2003). Rozdzielanie warstw skóry po zakończeniu doświadczenia można przeprowadzić stosując metodę *tape-stripping* – progresywnego zdzierania warstwy rogowej (Shah i in., 1998; Surber i in., 2001). Metoda ta polega na pobieraniu warstwy rogowej skóry poprzez przyklejanie i odklejanie kolejnych odcinków taśmy adhezyjnej. Na rycinie 4 przedstawiono schemat pobierania *stratum corneum* tą metodą.



Rycina 4. Schemat pobierania warstwy rogowej metodą progresywnego zdzierania (Moser i in., 2001).

Technika *tape-stripping* pozwala na oznaczenie ilości substancji zaabsorbowanej w warstwie rogowej oraz umożliwia określenie gradientu stężeń w dowolnych jej frakcjach. Metoda ta, ze względu na swoją nieinwazyjność, wykorzystywana jest również w badaniach *in vivo*. *Food & Drug Administration* (USA) dopuszcza metodę progresywnego zdzierania warstwy rogowej do badania biorównoważności preparatów dermatologicznych stosowanych miejscowo.

1.4. Zastosowanie terpenów i olejków eterycznych w farmacji, medycynie i kosmetyce

Nazwą terpeny (izoprenoidy) określa się dużą grupę substancji naturalnych pochodzących od tak zwanego aktywnego izoprenu (izopentylodifosforanu) lub jego izomeru – dimetyloallilodifosforanu (Harborne i in., 1999; Kohlmünzer, 2003). Poprzez połączenie dwóch lub więcej jednostek tych pięciowęglowych prekursorów tworzą się cząsteczki, w których liczba atomów węgla jest wielokrotnością 5, na przykład C_{10} - monoterpeny, C_{15} - seskwiterpeny, C_{20} - diterpeny. Terpeny mogą mieć charakter węglowodorów, alkoholi, aldehydów, ketonów,

12

estrów lub tlenków. Występują w wielu odmianach izomerycznych. Terpeny są głównymi składnikami olejków eterycznych – substancji czynnych wielu roślin.

Terpeny wykazują szerokie spektrum działania biologicznego, które, na przykład w olejkach eterycznych, jest efektem synergistycznego lub antagonistycznego działania poszczególnych składników (Kohlmünzer, 2003; Camp, 2005). Olejki eteryczne i/lub terpeny wchodzi w skład ponad kilkudziesięciu produktów leczniczych zarejestrowanych w Polsce, z czego większość przeznaczona jest do podawania na skórę (Cal, 2003). Są to przede wszystkim roztwory, maści, emulsje, balsamy, żele, pudry płynne. Preparaty te przeznaczone są do wywoływania działania miejscowego lub po rozsmarowaniu – do inhalacji. Leki zawierające terpeny działają między innymi rozgrzewająco, przeciwzapalnie, wykrztuśnie i przeciwbakteryjnie. Cenione jest przeciwgrzybicze działanie olejku drzewa herbacianego. Terpeny wchodzi również w skład wielu preparatów kosmetycznych i parafarmaceutyków - linalol występuje w ponad 90% kompozycji zapachowych używanych w przemyśle kosmetycznym (Matura i in., 2005).

Terpeny wchłaniane są zarówno przez błony śluzowe jamy ustnej, gardła, płuc, żołądka, jelit jak i przez nieuszkodzoną skórę (Jäger i in., 1992). Przedostając się do krwioobiegu dzięki swojej lipofilowości, terpeny mogą oddziaływać bezpośrednio na tkanki i błony komórkowe. Jako związki małowczątkowe i niejonizowane z łatwością pokonują wszelkie bariery (również krew – mózg). Wiele terpenów po aplikacji na skórę ma zdolność wywołania znieczulenia miejscowego.

Oprócz niewątpliwych korzyści, aplikacja terpenów na skórę może prowadzić do wystąpienia wielu, przede wszystkim miejscowych, działań niepożądanych (Rastogi i in., 1996; Schempp i in., 2002; Hausen, 2004; Matura i in., 2005, Hammer i in., 2006). Spośród nich często obserwuje się odczyny uczuleniowe, zapalenia i podrażnienia skóry, alergie kontaktowe oraz reakcje fotouczulające.

W pracach doświadczalnych dotyczących możliwości przezskórnego podawania leków, terpeny pełnią rolę tak zwanych promotorów wchłaniania (sorpcji) – substancji pomocniczych odwracalnie zmieniających strukturę warstwy rogowej naskórka (Williams i Barry, 1991; Walters i Hadgraft, 1993; Sznitowska i in., 1997; Bronaugh i Maibach, 1999; Williams, 2003; Williams i Barry, 2004.). Prowadzi to do zwiększenia przepuszczalności skóry dla samych terenów, jak i innych, obecnych w preparacie substancji. Obecność terpenów w podłożu (nośniku) umożliwia penetrację w głąb skóry substancji występujących zarówno w formie cząsteczkowej jak i jonowej

(Takayama i in. 1992; Arellano i in., 1996; Obata i in., 1999). Jako promotory wchłaniania terpeny są szczególnie aktywne w stosunku do niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Mechanizm działania terpenów jako promotorów sorpcji polega głównie na zaburzeniu uporządkowanego układu lipidów w przestrzeniach międzykomórkowych warstwy rogowej, zwiększeniu rozpuszczalności aplikowanej substancji w tej warstwie oraz zwiększeniu współczynnika podziału substancji penetrującej między *stratum corneum* a nośnik.

Pomimo, że zagadnieniu aplikacji terpenów na skórę, w tym jako promotorów wchłaniania, poświęconych jest wiele prac doświadczalnych, tylko kilka z nich dotyczy ilościowego badania przenikania tych związków do skóry i przez skórę (Jäger i in., 1992; Okabe i in., 1992; Sugibayashi i in., 1995; Obata i in., 1999; Cal i in., 2001, 2005). Wchłanianie terpenów jest często określane pośrednio i wyrażane najczęściej wzrostem przepuszczalności skóry dla substancji leczniczej (Bach i Lippold, 1998; Janicki i in., 2000). Dostępne dane na temat penetracji terpenów nie są kompletne, nie pozwalają na określenie kinetyki ich wchłaniania, bądź dotyczą nośników nie stosowanych w dostępnych preparatach (systemy transdermalne, liposomy) lub takich, w których terpeny nie były jedynymi substancjami penetrującymi do skóry lub wpływającymi na ten proces.

Piśmiennictwo:

- Arellano A, Santoyo S, Martin C, Ygartua P. Enhancing effect of terpenes on the in vitro percutaneous absorption of diclofenac sodium. *Int J Pharm* 1996; 130: 141-145
- Bach M, Lippold BC. Percutaneous penetration enhancement and its quantification. *Eur J Pharm Biopharm* 1998; 46, 1-13
- Bochenek A, Reicher M. *Anatomia człowieka*, t. 5, PZWL, Warszawa, 2003
- Bronaugh RL, Maibach HI. *Percutaneous absorption*. Marcel Dekker, New York, 1999
- Buck P. Skin barrier function: effect of age, race and inflammatory disease. *Int J Aromatherapy* 2004; 14: 70-76
- Burns DA, Breathnach SM, Cox NH, Griffiths CEM. *Rook's textbook of dermatology*. Blackwell Science, Oxford, 2004
- Cal K, Janicki S, Sznitowska M. In vitro studies on penetration of terpenes from matrix-type transdermal systems through human skin. *Int J Pharm* 2001; 244: 85-92
- Cal K. Olejki eteryczne w preparatach leczniczych - mechanizm działania i zastosowanie. *Aromaterapia* 2003; 9: 20-29
- Cal K, Glich M, Gawecka M. Przenikanie liposomowej formy linalolu do warstwy skóry w warunkach in vitro. *Farm Pol* 2005; 61: 314-316

- Camp RD. The wizard of Oz, or the intriguing tale of the Tea tree. *J Invest Dermatol* 2005; 123: xviii-xix
- Gabard B, Elsner P, Surber C, Treffel P. *Dermatopharmacology of topical preparations*. Springer-Verlag, Berlin, 1999
- Hadgraft J. Skin, the final frontier. *Int J Pharm* 2001; 224: 1-18
- Hadgraft J, Guy RH. *Transdermal drug delivery*. Marcel Dekker, New York, 1989
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV, Nielsen JB. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 616-625
- Harborne JB, Baxter H, Moss GP. 1999. *Phytochemical dictionary – a handbook of bioactive compounds from plants*. Taylor and Francis, Philadelphia, 1999
- Hausen BM. Evaluation of the main contact allergens in oxidized tea tree oil. *Dermatitis* 2004; 15: 213-214
- Honeywell-Nguyen PL, Bouwstra JA. Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. *Drug Discov Today* 2005; 2: 67-74
- Janicki S, Cal K, Poćwiardowska A. Wpływ składu matrycy transdermalnego systemu terapeutycznego na przenikanie indometacyny przez skórę ludzką w warunkach *in vitro*. *Farm Pol* 2000; 56: 111-116
- Janicki S, Fiebig A, Sznitowska M. *Farmacja stosowana – podręcznik dla studentów farmacji*. PZWL, Warszawa, 2003
- Jäger W, Buchbauer G, Jirowetz L, Fritzer M. Percutaneous absorption of lavender oil from a massage oil. *J Soc Cosmet Chem* 1992; 43: 49-54
- Kohlmünzer S. *Farmakognozja – podręcznik dla studentów*. PZWL, Warszawa, 2003
- Langner A. *Współczesne leczenie wybranych chorób skóry*. OIN Polfa, Warszawa, 2002
- Matura M, Sköld M, Börje A, Andersen KE, Bruze M, Frosch P, Goossens A, Johansen JD, Svedman C, White IR, Karlberg AT. Selected oxidized fragrance terpenes are common contact allergens. *Contact Dermatitis* 2005; 52: 320-328
- Moser K, Kriwet K, Naik A, Kalia YN, Guy RH. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. *Eur J Pharm Biopharm* 2001; 52: 103-112
- Obata Y, Ozawa Y, Takayama K, Nagai T. Effect of terpenes on skin permeation of non-ionized and ionized ketotifen. *STP Pharma Sci* 1999; 9: 497-503
- Okabe H, Takayama K, Nagai T. Percutaneous absorption of ketoprofen from acrylic gel patches containing d-limonene and ethanol as absorption enhancers. *Chem Pharm Bull* 1992; 40: 1906-1910
- Rastogi SC, Johansen JD, Menne T. Natural ingredients based cosmetics. Content of selected fragrance sensitizers. *Contact Dermatitis* 1996; 34: 423-426
- Roberts MS, Walters KA. *Dermal absorption and toxicity assessment*. Marcel Dekker, New York, 1998

- Schempp CM, Schopf E, Simon JC. Plant-induced toxic and allergic dermatitis (phytodermatitis). *Hautarzt* 2002; 53: 93-97
- Shah VP, Flynn GL, Yacobi A, Maibach HI, Bon C, Fleicher NM, Franz TJ, Kaplan SA, Kawamoto J, Lesko LJ, Marty JP, Pershing LK, Schaefer H, Sequeira JA., Shrivastava SP, Wilkin J, Williams RL. Bioequivalence of topical dermatological dosage forms - methods of evaluation of bioequivalence. *Pharm Res* 1998; 15: 167-171
- Sugibayashi K, Kobayashi D, Nakagaki D, Hatanaka T, Inoue N, Kusumi S, Kobayashi M, Kimura M, Morimoto Y. Differences in enhancing effect of l-menthol, ethanol and their combination between hairless rat and human skin. *Int J Pharm* 1995; 113: 189- 97
- Surber C, Schwarb FP, Smith EW. Tape-stripping technique. *J Toxicol Cut Ocular Toxicol* 2001; 20: 461-474
- Sznitowska M, Janicki S, Gos T. The effect of sorption promoters on percutaneous permeation of a model zwitterion – baclofen. *Int J Pharm* 1996; 137: 125-132
- Sznitowska M, Janicki S, Pietrzak R. Promotory wchłaniania substancji leczniczych przez skórę i mechanizm ich działania. *Postępy Dermatol* 1997; 14: 285-299
- Sznitowska M, Janicki S, Williams AC. Intracellular or intercellular localization of the polar pathway of penetration across stratum corneum. *J Pharm Sci* 1998; 87: 1109-1114
- Takayama K, Takahashi O, Matsui R, Aiba T, Kakemi M, Koizumi T. Effect of l-menthol on the permeation of indomethacin, mannitol and cortisone through excised hairless mouse skin. *Chem Pharm Bull* 1992; 40: 3097-3099
- Walters KA, Hadgraft J. *Pharmaceutical skin penetration enhancement*. Marcel Dekker, New York, 1993
- Williams AC. *Transdermal and topical drug delivery*. Pharmaceutical Press, London, Chicago, 2003
- Williams AC, Barry BW. Terpenes and the lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *Pharm Res* 1991; 8: 17-24
- Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56: 603-618

2. ZAŁOŻENIA I CEL BADAŃ

Terpeny wchodzą w skład ponad kilkudziesięciu zarejestrowanych w Polsce preparatów, z czego większość przeznaczona jest do podawania na skórę. W preparatach leczniczych związki występują nie tylko jako samodzielne substancje lecznicze, lecz często są obecne w mieszaninach z innymi substancjami czynnymi, bądź pełnią rolę substancji pomocniczych, na przykład *corrigens*. Terpeny wchodzą również w skład wielu preparatów kosmetycznych i parafarmaceutyków. W pracach doświadczalnych nad przezskórną aplikacją leków, związki te pełnią rolę promotorów wchłaniania.

Z uwagi na szerokie rozpowszechnienie, dużą aktywność biologiczną, możliwość wchłaniania do skóry i przez skórę oraz wywoływania działań niepożądanych, zarówno ogólnoustrojowych jak i miejscowych, istotne jest określenie czynników wpływających na wchłanianie terpenów do skóry po ich aplikacji szczególnie w najczęściej stosowanych podłożach dermatologicznych.

Określenie wspomnianych czynników posłuży uzupełnieniu danych dotyczących bezpieczeństwa i efektywności stosowania terpenów w preparatach aplikowanych na skórę, pozwalając również określić wpływ postaci leku na kinetykę wchłaniania tych związków. Badania przeprowadzone w oparciu o dwa główne aspekty (technologiczny i farmakokinetyczny) oraz dwa modele doświadczalne (*ex vivo* i *in vivo*) pozwolą na poszukanie korelacji między wynikami wchłaniania uzyskanymi we wspomnianych warunkach. Wyniki badań rozszerzą także wiedzę na temat roli i funkcji poszczególnych warstw skóry.

3. PRZENIKANIE TERPENÓW DO WARSTW SKÓRY LUDZKIEJ

3.1. Właściwości fizykochemiczne wybranych terpenów

Piśmiennictwo główne:

Cal K. Aqueous solubility of liquid monoterpenes at 293 K and relationship with calculated log P value. Yakugaku Zasshi 2006; 126: 307-309

Terpeny do badań wytypowano na podstawie powszechności ich występowania w dermatologicznych preparatach leczniczych lub kosmetykach. Wszystkie badane związki należą do grupy monoterenów i występują w temperaturze pokojowej w stanie ciekłym. Umożliwiło to ich aplikację na skórę także w postaci czystej, a więc z pominięciem wpływu na ich przenikanie substancji pomocniczych obecnych w nośniku. Badane terpeny wraz z ich głównym źródłem pochodzenia, strukturą i podstawowymi właściwościami fizykochemicznymi wpływającymi na przenikanie przez skórę (rozpuszczalność w wodzie oraz wartość log P) przedstawiono w tabeli 1 (str. 28).

Wymienione w tabeli terpeny podzielić można na grupy związków charakteryzujących się budową acykliczną: ($\pm$)- β -cytronelol, ($\pm$)-linalol, octan linalilu oraz budową cykliczną: (-)- α -pinen, (-)- β -pinen, eukaliptol i terpinen-4-ol. Badane związki należą do różnych grup chemicznych: węglowodorów ((-)- α -pinen, (-)- β -pinen), alkoholi (($\pm$)- β -cytronelol, ($\pm$)-linalol, terpinen-4-ol), estrów (octan linalilu) oraz tlenków (eukaliptol).

Biorąc pod uwagę rozpuszczalność w wodzie, wśród badanych terpenów można wyróżnić grupę związków dobrze rozpuszczalnych ($> 1,0$ mg/ml): ($\pm$)-linalol, eukaliptol i terpinen-4-ol, trudno rozpuszczalnych ($< 0,1$ mg/ml): octan linalilu, (-)- α -pinen i (-)- β -pinen oraz o średniej rozpuszczalności w wodzie: ($\pm$)- β -cytronelol. Wartością log P w zakresie 2-4, optymalną z punktu widzenia przenikania przez skórę, charakteryzują się ($\pm$)- β -cytronelol, ($\pm$)-linalol, eukaliptol i terpinen-4-ol.

Dla celów interpretacyjnych, na podstawie przedstawionej w tabeli struktury i wartości log P, badane terpeny podzielono na następujące grupy:

- acykliczne, charakteryzujące się wartością log P ≈ 3 : ($\pm$)- β -cytronelol i ($\pm$)-linalol,
- acykliczne, log P > 4 : octan linalilu,
- cykliczne, log P ≈ 3 : eukaliptol i terpinen-4-ol,
- cykliczne, log P > 4 : (-)- α -pinen i (-)- β -pinen.

3.2. Wpływ właściwości fizykochemicznych terpenów na ich przenikanie do warstw skóry ludzkiej w warunkach *ex vivo*

Piśmiennictwo główne:

Cal K, Sznitowska M. Cutaneous absorption and elimination of three acyclic terpenes – *in vitro* studies. J Control Release 2003; 93: 369-376

Cal K, Kupiec K, Sznitowska M. Effect of physicochemical properties of cyclic terpenes on their *ex vivo* skin absorption and elimination kinetics. J Dermatol Sci 2006; 41: 137-142

Wpływ właściwości fizykochemicznych badanych terpenów na ich penetrację do warstw skóry ludzkiej w warunkach *ex vivo* określano nanosząc je pojedynczo w postaci czystej i w dawce nieskończonej na skórę ludzką umieszczoną w przepływowych komorach dyfuzyjnych (ryc. 3, str. 11). Określono zarówno kinetykę przenikania terpenów do warstw skóry jak i ich eliminację z warstw skóry. W badaniach przenikania terpeny aplikowano na 1, 2 i 4 h, a skóra znajdowała się w warunkach okluzyjnych. W badaniach kinetyki eliminacji ze skóry terpeny nanoszono na 1 h, a skórę pozostawiano w otwartych komorach dyfuzyjnych na 1, 2, 3 i 4 h od chwili usunięcia badanych związków. Po zakończeniu każdego doświadczenia skórę dzielono metodą progresywnego zdzierania *stratum corneum* (ryc. 4, str. 12) na warstwy: trzy frakcje warstwy rogowej (SC I, SC II i SC III) oraz naskórek ze skórą właściwą (ED). Uzyskane próby ekstrahowano metanolem. Analizę ilościową terpenów w ekstraktach metanolowych i płynie akceptorowym wykonano metodą chromatografii gazowej. Wyniki badań penetracji terpenów do warstw skóry przedstawiono w tabeli 2 (str. 29), natomiast kinetykę ich eliminacji po 1 h aplikacji – w tabeli 3 (str. 30).

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono penetrację do warstw skóry wszystkich terpenów (tab. 2, str. 29). Ilość terpenów penetrującą do skóry jest bardzo duża. W zależności od terpenu wynosiła ona od 200 do nawet 1 800 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, z czego większość wykrywano w skórze właściwej z naskórkiem. Całkowite przenikanie czystych terpenów do skóry pozwala uszeregować te związki następująco: octan linalilu < (-)- α -pinen < (-)- β -pinen = eukaliptol << ($\pm$)- β -cytronelol < terpinen-4-ol < ($\pm$)-linalol. Spośród terpenów o budowie acyklicznej, w największej ilości do wszystkich warstw skóry penetrował ($\pm$)-linalol, a spośród terpenów cyklicznych – terpinen-4-ol. Stwierdzić można podobne przenikanie do skóry terpenów charakteryzujących się wartością $\log P > 4$. Wśród terpenów charakteryzujących się $\log P \approx 3$ całkowita kumulacja w skórze jest 2 do 3 razy większa dla związków o budowie acyklicznej niż o budowie cyklicznej. Wskazać również można na większą penetrację do skóry terpenów o charakterze alkoholi lub tlenków niż związków o charakterze

estrów lub węglowodorów. Profil przenikania badanych związków do poszczególnych warstw skóry jest różny. Nasycenie warstwy rogowej terpenem osiągnięto już po 1 h dla ($\pm$)- β -cytronelolu, (-)- α -pinenu, (-)- β -pinenu i eukaliptolu, a po 2 h dla octanu linalilu. Uzyskane wyniki wskazują na progresywną dyfuzję ($\pm$)-linalolu i terpinen-4-olu do tej warstwy skóry. Zjawisko progresywnej dyfuzji w czasie 4 h doświadczenia można również zaobserwować dla skóry właściwej z naskórkiem po aplikacji ($\pm$)-linalolu, octanu linalilu, (-)- α -pinenu, (-)- β -pinenu i terpinen-4-olu. Należy zaznaczyć, że pomimo zastosowania dawki nieskończonej związków penetrujących, bardzo duża kumulacja terpenów w żywych warstwach skóry i stosunkowo krótki czas trwania doświadczeń mogą być przyczyną ich braku w płynie akceptorowym.

W czasie badania eliminacji również nie stwierdzono obecności terpenów w płynie akceptorowym, mimo spadku ich zawartości w skórze właściwej z naskórkiem. Wskazuje to na wysoką wartość współczynnika podziału terpenów między hydrofilowe warstwy skóry a płyn akceptorowy. Eliminacja terpenów z głębszych warstw *stratum corneum* następuje szybko (tab. 3, str. 30). Stosunkowo niewielką eliminację lub jej brak można natomiast zaobserwować dla najbardziej zewnętrznej frakcji warstwy rogowej – SC I. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość występowania zjawiska dyfuzji wstecznej terpenów z żywych warstw skóry do *stratum corneum* i na proces parowania jako główny mechanizm eliminacji terpenów z tej warstwy.

3.3. Wpływ rodzaju nośnika na przenikanie terpenów do warstw skóry ludzkiej w warunkach *ex vivo*

Piśmiennictwo główne:

Cal K. Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. *Planta Med* 2006; 72: 311-316

Cal K. How does the type of vehicle influence the *in vitro* skin absorption and elimination kinetics of terpenes? *Arch Dermatol Res* 2006; 297: 311-315

Wpływ rodzaju nośnika na przenikanie terpenów do warstw skóry badano aplikując na nią następujące układy:

- terpeny w postaci olejków eterycznych (zawartość terpenów w olejkach wynosiła 28-41%, czas aplikacji wynosił 8 h),

- terpeny w postaci olejków eterycznych inkorporowane w podłożach dermatologicznych: roztworze olejowym, żelu i emulsji typu o/w (zawartość terpenów w podłożach - 0,21-0,31%, czas aplikacji – 8 h),
- czyste terpeny inkorporowane pojedynczo w podłożach dermatologicznych: roztworze olejowym, żelu i emulsji typu o/w (zawartość terpenów w podłożach - 5%, czas aplikacji – 1 i 4 h).

Kinetykę eliminacji terpenów po 1 h aplikacji określono dla układów złożonych z inkorporowanych w podłożach dermatologicznych czystych terpenów po 1 i 4 h od chwili usunięcia preparatów.

Wyniki badań penetracji terpenów z olejków eterycznych i olejków eterycznych inkorporowanych w podłożach dermatologicznych przedstawiono odpowiednio w tabelach 4 (str. 31) i 5 (str. 32), natomiast kinetykę penetracji i eliminacji czystych terpenów inkorporowanych w podłożach dermatologicznych – w tabelach 6 (str. 33) i 7 (str. 34).

Ponieważ nasycenie warstwy rogowej czystym ($\pm$)- β -cytronelolem, (-)- α -pinenem i octanem linalilu osiągnęto już po 1-2 h aplikacji (tab. 2, str. 29), porównanie przenikania do warstw skóry czystych terpenów (tab. 2, str. 29) z ich przenikaniem z olejków eterycznych (tab. 4, str. 31) uwidacznia nie tyle wpływ czasu aplikacji (czyste terpeny - 4 h, olejki eteryczne – 8 h) na wielkość penetracji, ale przede wszystkim wpływ składników układu nośnikowego na ten proces. Z wyjątkiem β -cytronelolu, kumulacja terpenów, szczególnie w warstwie rogowej, jest większa, gdy aplikowane były w postaci olejków eterycznych. Obecne w olejkach eterycznych inne terpeny istotnie wpływają na przenikanie badanych związków. Wpływ ten jest wyraźnie widoczny dla octanu linalilu aplikowanego w obecności linalolu. Całkowite przenikanie terpenów z olejków eterycznych do skóry pozwala je uszeregować w następującej kolejności: β -cytronelol = octan linalilu = α -pinen $\ll$ linalol < terpinen-4-ol, a więc podobnej, chociaż nie identycznej jak aplikowanych w postaci czystej. Pomimo, że całkowita penetracja terpenów z olejków eterycznych do skóry jest większa, to analiza stosunku zawartości terpenów w warstwie rogowej i skórze właściwej z naskórkiem wskazuje jednak na szybszy proces dyfuzji badanych związków do żywych warstw skóry po aplikacji w postaci czystej.

Aplikacja olejków eterycznych inkorporowanych w trzech podłożach dermatologicznych – roztworze olejowym, żelu i emulsji o/w (tab. 5, str. 32), w których zawartość oznaczanych terpenów była ponad 100 razy mniejsza niż w olejkach eterycznych, nie potwierdziła

proporcjonalnej zależności kumulacji terpenów w warstwach skóry od ich aplikowanego stężenia – oznaczona całkowita zawartość terpenów w skórze była nie 100-krotnie, lecz tylko 10-30 razy mniejsza niż po aplikacji olejków eterycznych. Aplikacja olejków eterycznych inkorporowanych w podłożach dermatologicznych uwiarygodniła wyraźny wpływ lipofilowości badanych terpenów na ich kumulację w warstwach skóry. Terpeny charakteryzujące się wartością $\log P > 4$ (β -cytronelol, α -pinen, octan linalilu) i jednocześnie najniższą rozpuszczalnością w wodzie nie dyfundowały ani do warstwy rogowej ani przez warstwę rogową do skóry właściwej lub kumulacja w tych warstwach skóry była bardzo niewielka, niezależnie od zastosowanego podłoża.

Interesujący jest fakt, że β -cytronelol był jedynym terpenem wykrywanym w płynie akceptorowym. Terpen ten przenikał przez skórę zarówno po aplikacji w postaci olejku eterycznego jak i w postaci olejku eterycznego inkorporowanego w podłożach dermatologicznych, nie przenikał natomiast, jak wspomniano wcześniej, gdy aplikowany był w postaci czystej. Przenikanie β -cytronelolu przez skórę do płynu akceptorowego wynosiło około $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, niezależnie od rodzaju nośnika.

Aplikacja czystych terpenów (($\pm$)-linalolu i terpinen-4-olu), inkorporowanych w podłożach dermatologicznych (roztworze olejowym, żelu i emulsji o/w), pozwoliła na wykazanie wpływu podłoża szeroko stosowanych w dermatologicznych preparatach leczniczych i kosmetykach na proces przenikania terpenów do skóry (tab. 6, str. 33).

O ile wszystkie badane terpeny są związkami lipofilowymi, o tyle zastosowane podłoża charakteryzują się odmiennymi właściwościami. Roztwór olejowy jest typowym bezwodnym podłożem lipofilowym, żel natomiast to beztłuszczowe podłoże hydrofilowe, zawierające około 98% wody. Terpeny w podłożu lipofilowym znajdowały się w postaci rozpuszczonej, zaś w podłożu żelowym – częściowo rozpuszczone i zdyspergowane. Właściwości pośrednie posiadała emulsja typu o/w, w której terpeny mogły znajdować się rozpuszczone zarówno w lipofilowej fazie wewnętrznej jak i częściowo w hydrofilowej fazie rozpraszającej.

Największą całkowitą kumulację w skórze, zarówno dla ($\pm$)-linalolu jak i terpinen-4-olu, oznaczono przy ich aplikacji w podłożu żelowym (tab. 6, str. 33). Jest to wynikiem wysokiego współczynnika podziału lipofilowych cząsteczek terpenów między lipofilową warstwę rogową a hydrofilowe podłoże żelowe. Podłoże żelowe oraz podłoże olejowe sprzyjały penetracji terpenu lepiej rozpuszczalnego w wodzie – kumulacja w warstwach skóry, szczególnie żywych, ponad dwa razy bardziej rozpuszczalnego w wodzie terpinen-4-olu była większa niż

(±)-linalolu. Przenikanie terpenów do warstw skóry z roztworu olejowego i emulsji o/w było porównywalne i niższe niż z podłoża żelowego, głównie z powodu niekorzystnego współczynnika podziału między warstwę rogową a nośnik.

W czasie 4 h aplikacji zaobserwować można istotny wzrost całkowitej penetracji do skóry terpenów aplikowanych we wszystkich podłożach. Różny jest natomiast wzrost ich absorpcji w poszczególnych warstwach skóry. Po 4 h aplikacji charakterystyczna jest, dla wszystkich badanych układów, porównywalna lub większa niż w warstwie rogowej kumulacja terpenów w żywych strukturach skóry.

Kinetykę eliminacji terpenów po 1 h aplikacji badanych układów przedstawia tabela 7 (str. 34). Po 1 h procesu eliminacji odnotowano około 10-20% spadek ilości terpenów w skórze. Wydłużenie procesu eliminacji do 4 h powodowało znaczący spadek zawartości obu terpenów w zewnętrznej frakcji warstwy rogowej, a dla związków aplikowanych w postaci roztworu olejowego i emulsji o/w – także w skórze właściwej z naskórkiem. Szybkość eliminacji terpenów ze skóry zależy od ich ilości zaabsorbowanej w czasie 1 h aplikacji, to znaczy, że im więcej terpenu uległo absorpcji, tym szybciej jest on eliminowany. Przedstawione wyniki potwierdzają możliwość występowania zjawiska dyfuzji wstecznej terpenów z żywych warstw skóry do warstwy rogowej, a konsekwencji parowania jako głównego mechanizmu eliminacji terpenów z tej warstwy.

3.4. Wpływ rodzaju nośnika na przenikanie terpenów do warstwy rogowej naskórka skóry ludzkiej w warunkach *in vivo*

Piśmiennictwo główne:

Cal K, Krzyżaniak M. *Stratum corneum* absorption and retention of linalool and terpinen-4-ol applied as gel or oily solution in humans. J Dermatol Sci 2006; 42: 265-367

Przenikanie do warstwy rogowej skóry oraz kinetykę eliminacji z tej warstwy w warunkach *in vivo* określono dla dwóch terpenów, (±)-linalolu i terpinen-4-olu, inkorporowanych w dwóch podłożach dermatologicznych: roztworze olejowym i żelu. Były to preparaty identyczne jak badane w warunkach *ex vivo*. W badaniach penetracji preparaty aplikowano na skórę przedramion ochotników przez 1 h, a ilość zaabsorbowanych po tym czasie terpenów określano za pomocą metody progresywnego zdzierania warstwy rogowej (ryc. 4, str. 12). W badaniach eliminacji preparaty również aplikowano na 1 h, a pozostałość terpenów

w warstwie rogowej oznaczano po 1 i 2 h od usunięcia preparatów. Badania przeprowadzono w warunkach nieokluzyjnych. Wyniki oznaczeń przedstawiono w tabeli 8 (str. 35).

Dla każdego z terpenów większą jego ilość w warstwie rogowej oznaczono po aplikacji w podłożu żelowym, z tym, że całkowita kumulacja terpinen-4-olu w *stratum corneum* była prawie 2,5 razy większa niż ($\pm$)-linalolu. Absorpcja obu terpenów w warstwie rogowej po aplikacji roztworu olejowego była jednakowa.

Eliminacja terpenów z warstwy rogowej przebiega najintensywniej już w czasie pierwszej godziny, co wskazuje na parowanie jako główną drogę tego procesu. Dla obu terpenów eliminacja zachodzi szybciej po ich aplikacji w podłożu wodnym niż olejowym.

Przeprowadzone badania wskazują, że hydrofilowe podłoże żelowe zapewnia większą penetrację terpenów do warstwy rogowej niż podłoże lipofilowe. Szybkość eliminacji terpenów z warstwy rogowej jest proporcjonalna do ich zaabsorbowanej ilości. Pozostająca dłużej w *stratum corneum* ilość terpenów wynosi około $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ i jest niezależna od ich struktury chemicznej oraz właściwości podłoża.

Porównując wyniki badań *ex vivo* i *in vivo* (tab. 7 i 8, str. 34 i 35) wskazać można na niższą oznaczoną w *stratum corneum* w warunkach *in vivo* niż *ex vivo* ilość obu terpenów po aplikacji w podłożu żelowym oraz terpinen-4-olu (terpenu o większej rozpuszczalności w wodzie niż ($\pm$)-linalol) po aplikacji w roztworze olejowym. Jest to wynikiem większego nawodnienia warstwy rogowej w warunkach *ex vivo* niż *in vivo*, spowodowanego między innymi procesem płukania i równoważenia (ekwilibracji) skóry, ciągłym przepływem wodnego płynu akceptorowego i zastosowanymi warunkami okluzyjnymi. Ilości ($\pm$)-linalolu kumulującego się w *stratum corneum* w warunkach *ex vivo* i *in vivo* po aplikacji w postaci roztworu olejowego można uznać za zbliżone.

4. WNIOSKI KOŃCOWE

Przenikanie terpenów do skóry jest procesem, na który wpływ mają właściwości fizykochemiczne cząsteczki danego terpenu oraz rodzaj nośnika, z którego jest uwalniana. Przedstawione badania przenikania do warstw skóry wybranych terpenów: ($\pm$)- β -cytronelolu, ($\pm$)-linalolu, octanu linalilu, (-)- α -pinenu, (-)- β -pinenu, eukaliptolu i terpinen-4-olu, potwierdziły zakres wartości log P optymalny dla przenikania substancji do skóry oraz wykazały zależność między strukturą związku penetrującego a szybkością tego procesu.

Wykazano złożoną zależność między lipofilowością terpenów a wielkością ich penetracji do poszczególnych, lipofilowych i hydrofilowych, warstw skóry. W warunkach *ex vivo* stwierdzono podobne przenikanie do skóry terpenów charakteryzujących się wartością log P > 4. Wśród terpenów charakteryzujących się log P $\approx$ 3 całkowita kumulacja w skórze była 2 do 3 razy większa dla związków o budowie acyklicznej niż dla związków o budowie cyklicznej. Spośród terpenów o budowie acyklicznej, w największej ilości do wszystkich warstw skóry penetrował ($\pm$)-linalol, natomiast spośród terpenów cyklicznych – terpinen-4-ol. Wskazać również można na większą penetrację do skóry terpenów o charakterze alkoholi lub tlenków niż związków o charakterze estrów lub węglowodorów.

Porównanie przenikania do warstw skóry w warunkach *ex vivo* czystych terpenów z ich przenikaniem z olejków eterycznych uwidocznilo wpływ składników towarzyszących w układach nośnikowych (olejkach eterycznych) na ten proces. Z wyjątkiem β -cytronelolu, kumulacja terpenów, szczególnie w warstwie rogowej, jest większa, gdy aplikowane były w postaci olejków eterycznych.

Aplikacja *ex vivo* olejków eterycznych inkorporowanych w trzech podłożach dermatologicznych – roztworze olejowym, żelu i emulsji o/w, w których zawartość terpenów była ponad 100 razy mniejsza niż w olejkach eterycznych, nie potwierdziła proporcjonalnej zależności kumulacji terpenów w warstwach skóry od ich aplikowanego stężenia – oznaczona całkowita zawartość terpenów w skórze była tylko 10-30 razy mniejsza niż po aplikacji olejków eterycznych. Uwidocznili się natomiast wyraźny wpływ lipofilowości badanych związków na ich kumulację w warstwach skóry. Terpeny charakteryzujące się wartością log P > 4 (β -cytronelol, α -pinen, octan linalilu) i jednocześnie najniższą rozpuszczalnością w wodzie nie dyfundowały ani do warstwy rogowej ani przez warstwę rogową do skóry właściwej lub

kumulacja w tych warstwach skóry była bardzo niewielka, niezależnie od zastosowanego podłoża.

Badania absorpcji *ex vivo* czystych terpenów, ($\pm$)-linalolu i terpinen-4-olu, inkorporowanych w podłożach dermatologicznych (roztworze olejowym, żelu i emulsji o/w) pozwoliły na wykazanie wpływu podłoża stosowanych w dermatologicznych preparatach leczniczych i kosmetykach na proces przenikania terpenów do skóry. Największą całkowitą kumulację w skórze, zarówno dla ($\pm$)-linalolu jak i terpinen-4-olu, oznaczono, gdy aplikowane były w podłożu żelowym. Jest to wynikiem wysokiego współczynnika podziału lipofilowych cząsteczek terpenów między lipofilową warstwę rogową a hydrofilowe podłoże żelowe. Podłoże żelowe i podłoże olejowe sprzyjały penetracji terpenu lepiej rozpuszczalnego w wodzie – terpinen-4-olu.

Uzyskane wyniki badań kinetyki eliminacji terpenów w warunkach *ex vivo* wskazują na możliwość występowania zjawiska dyfuzji wstecznej tych związków z hydrofilowych warstw skóry do *stratum corneum* i na proces parowania jako główny mechanizm eliminacji terpenów z tej warstwy.

Porównanie wyników badań uzyskanych w warunkach *ex vivo* z wynikami badań uzyskanymi w warunkach *in vivo* wskazuje na występowanie pewnych różnic ilościowych w wielkości przenikania terpenów do warstwy rogowej naskórka, lecz główne zależności dotyczące wpływu właściwości fizykochemicznych badanych związków i rodzaju nośnika na proces penetracji są niezależne od zastosowanego modelu doświadczalnego. Badania przeprowadzone w warunkach *in vivo* jednoznacznie potwierdziły obserwowany w warunkach *ex vivo* wpływ hydrofilowego podłoża żelowego na wzrost kumulacji terpenów w warstwie rogowej i na szybkość ich eliminacji z tej warstwy.

Uzyskane w warunkach *ex vivo* jak i *in vivo* wyniki doświadczeń wskazują na silny związek kinetyki absorpcji terpenów do warstw skóry z ich właściwościami fizykochemicznymi oraz charakterem i właściwościami nośnika, w jakim są aplikowane. Jednocześnie, z powodu niedoskonałości aktualnie dostępnych zarówno *ex vivo* jak i *in vivo* modeli doświadczalnych, trudno jest, pomimo zgromadzonej dużej ilości danych, zaprezentować jednoznaczne wskazówki dotyczące zasad stosowania terpenów w praktyce klinicznej i kosmetyce. Krótki czas potrzebny do nasycenia warstwy rogowej terpenami oraz ich bardzo duża kumulacja w warstwach skóry wskazują na pokonywanie przez te związki bariery *stratum corneum* i możliwość łatwej penetracji do krążenia ogólnego w warunkach *in vivo*. Chociaż więc

w niniejszej pracy wykazano, że większą zdolność wchłaniania do skóry wykazują terpeny aplikowane w postaci olejków eterycznych i w podłożu żelowym, to w zastosowaniu klinicznym może się okazać, że takie preparaty będą łatwiej wywierały działania niepożądane (drażniące, a nawet toksyczne). Z drugiej strony, wykryta w pracy szybka eliminacja terpenów ze skóry, na skutek najprawdopodobniej parowania, może redukować powyższe efekty i warunkować bezpieczeństwo stosowania terpenów w różnych układach.

Tabela 1. Podstawowe właściwości fizykochemiczne badanych terpenów

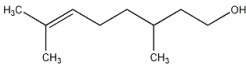
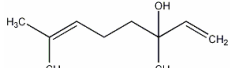
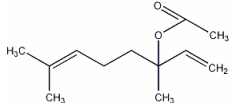
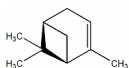
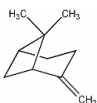
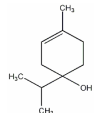
Terpen	Pochodzenie	Wzór strukturalny	Rozpuszczalność w wodzie (mg/ml)	Log P
<i>Terpeny acykliczne</i>				
(±)-β-cytronelol	Olejek geraniowy		0,322	3,38
(±)-linalol	Olejek lawendowy		1,336	3,28
octan linalilu	Olejek lawendowy		0,054	4,12
<i>Terpeny cykliczne</i>				
(-)-α-pinen	Olejek jałowcowy		0,018	4,37
(-)-β-pinen	Olejek sosnowy		0,023	4,37
eukaliptol	Olejek eukaliptusowy		2,633	2,82
terpinen-4-ol	Olejek drzewa herbacyanego		2,945	2,99

Tabela 2. Przenikanie terpenów do warstw skóry w warunkach *ex vivo* ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$; $\bar{x} \pm \text{S.D.}$, $n=4$)

Warstwy skóry	Czas (h)		
	1	2	4
<i>(\pm)</i> - β -cytronelol			
SC I	133,0 $\pm$ 19,6	159,3 $\pm$ 16,0	143,9 $\pm$ 15,7
SC II	69,8 $\pm$ 9,2	78,5 $\pm$ 9,3	80,5 $\pm$ 8,1
SC III	67,8 $\pm$ 5,8	48,8 $\pm$ 8,9	54,9 $\pm$ 9,1
ED	683,9 $\pm$ 56,0	951,5 $\pm$ 109,4	824,5 $\pm$ 37,9
<i>(\pm)</i> -linalol			
SC I	34,3 $\pm$ 8,8	65,9 $\pm$ 36,5	242,6 $\pm$ 36,4
SC II	22,4 $\pm$ 3,5	22,4 $\pm$ 4,7	144,3 $\pm$ 13,2
SC III	21,6 $\pm$ 3,7	20,8 $\pm$ 6,1	92,0 $\pm$ 12,9
ED	827,0 $\pm$ 66,5	1083,5 $\pm$ 106,1	1343,0 $\pm$ 127,1
<i>octan linalilu</i>			
SC I	27,3 $\pm$ 7,9	64,1 $\pm$ 8,1	54,6 $\pm$ 7,4
SC II	19,5 $\pm$ 4,3	19,1 $\pm$ 2,5	19,3 $\pm$ 0,7
SC III	14,8 $\pm$ 2,9	15,5 $\pm$ 2,4	12,5 $\pm$ 2,7
ED	62,4 $\pm$ 9,2	87,6 $\pm$ 9,7	129,9 $\pm$ 15,9
<i>(-)</i> - α -pinen			
SC I	4,3 $\pm$ 0,8	3,4 $\pm$ 0,4	7,7 $\pm$ 4,3
SC II	4,0 $\pm$ 0,5	3,2 $\pm$ 0,6	6,5 $\pm$ 4,1
SC III	3,0 $\pm$ 0,4	3,4 $\pm$ 0,8	6,0 $\pm$ 4,0
ED	66,4 $\pm$ 16,8	147,2 $\pm$ 25,9	313,7 $\pm$ 38,3
<i>(-)</i> - β -pinen			
SC I	19,4 $\pm$ 5,6	28,8 $\pm$ 14,3	23,8 $\pm$ 15,7
SC II	10,5 $\pm$ 2,1	20,3 $\pm$ 11,0	12,2 $\pm$ 7,0
SC III	9,9 $\pm$ 5,4	23,5 $\pm$ 2,2	10,5 $\pm$ 3,0
ED	89,0 $\pm$ 12,4	318,2 $\pm$ 103,4	417,8 $\pm$ 28,8
<i>eukaliptol</i>			
SC I	42,7 $\pm$ 11,3	41,7 $\pm$ 5,9	40,0 $\pm$ 12,9
SC II	8,3 $\pm$ 1,0	19,6 $\pm$ 5,4	21,2 $\pm$ 7,8
SC III	9,7 $\pm$ 3,8	10,8 $\pm$ 2,7	17,5 $\pm$ 6,6
ED	290,1 $\pm$ 75,0	384,6 $\pm$ 94,7	410,7 $\pm$ 76,0
<i>terpinen-4-ol</i>			
SC I	123,8 $\pm$ 11,2	193,5 $\pm$ 17,6	262,7 $\pm$ 46,8
SC II	44,9 $\pm$ 4,7	51,6 $\pm$ 14,7	204,1 $\pm$ 29,1
SC III	3,4 $\pm$ 0,7	27,8 $\pm$ 4,9	124,4 $\pm$ 25,8
ED	134,8 $\pm$ 31,2	615,1 $\pm$ 82,8	782,9 $\pm$ 100,1

Tabela 3. Eliminacja terpenów z warstw skóry w warunkach *ex vivo* po 1 h (t=0) aplikacji ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$; $\text{śr.} \pm \text{S.D.}$, n=3 dla ($\pm$)- β -cytronelolu, ($\pm$)-linalolu i octanu linalilu, n=4 dla (-)- α -pinenu, (-)- β -pinenu, eukaliptolu i terpinen-4-olu)

Warstwy skóry	Czas (h)				
	0	1	2	3	4
<i>(\pm)</i> - β -cytronelol					
SC I	133.0 $\pm$ 19.6	61.8 $\pm$ 6.6	59.0 $\pm$ 8.0	61.6 $\pm$ 6.7	52.4 $\pm$ 7.6
SC II	69.8 $\pm$ 9.2	19.8 $\pm$ 2.9	26.0 $\pm$ 3.6	25.5 $\pm$ 4.5	17.6 $\pm$ 3.2
SC III	67.8 $\pm$ 5.8	18.5 $\pm$ 4.6	25.4 $\pm$ 3.3	17.0 $\pm$ 2.4	10.2 $\pm$ 2.7
ED	683.9 $\pm$ 56.0	245.8 $\pm$ 31.5	156.2 $\pm$ 9.4	100.3 $\pm$ 6.7	86.9 $\pm$ 9.8
<i>(\pm)</i> -linalol					
SC I	34.3 $\pm$ 8.8	68.4 $\pm$ 8.8	59.9 $\pm$ 4.3	43.1 $\pm$ 5.8	61.4 $\pm$ 9.9
SC II	22.4 $\pm$ 3.5	164.3 $\pm$ 12.7	87.2 $\pm$ 8.6	39.6 $\pm$ 8.0	17.5 $\pm$ 6.2
SC III	21.6 $\pm$ 3.7	168.2 $\pm$ 15.5	106.4 $\pm$ 9.3	68.2 $\pm$ 7.0	15.6 $\pm$ 3.6
ED	827.0 $\pm$ 66.5	144.5 $\pm$ 16.4	261.4 $\pm$ 19.2	347.6 $\pm$ 31.9	446.8 $\pm$ 17.7
<i>octan linalilu</i>					
SC I	27.3 $\pm$ 7.9	30.5 $\pm$ 4.9	24.1 $\pm$ 4.6	17.2 $\pm$ 8.0	3.8 $\pm$ 1.5
SC II	19.5 $\pm$ 4.3	22.4 $\pm$ 4.0	20.6 $\pm$ 5.6	4.2 $\pm$ 0.9	0
SC III	14.8 $\pm$ 2.9	14.2 $\pm$ 4.3	11.6 $\pm$ 4.6	0	0
ED	62.4 $\pm$ 9.2	30.5 $\pm$ 4.9	24.1 $\pm$ 4.6	17.2 $\pm$ 8.0	3.8 $\pm$ 1.5
<i>(-)</i> - α -pinen					
SC I	4.3 $\pm$ 0.8	3.2 $\pm$ 1.9	2.0 $\pm$ 1.8	0.7 $\pm$ 0.6	0.6 $\pm$ 0.7
SC II	4.0 $\pm$ 0.5	0.9 $\pm$ 1.0	0	0	0
SC III	3.0 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.2	0	0	0
ED	66.4 $\pm$ 16.8	45.7 $\pm$ 13.0	35.9 $\pm$ 8.2	37.3 $\pm$ 3.6	33.9 $\pm$ 5.7
<i>(-)</i> - β -pinen					
SC I	19.4 $\pm$ 5.6	14.9 $\pm$ 6.2	12.0 $\pm$ 2.2	11.1 $\pm$ 4.2	4.8 $\pm$ 4.8
SC II	10.5 $\pm$ 2.1	6.6 $\pm$ 6.0	5.8 $\pm$ 5.0	5.5 $\pm$ 6.5	0
SC III	9.9 $\pm$ 5.4	5.1 $\pm$ 4.9	0	0	0
ED	89.0 $\pm$ 12.4	84.0 $\pm$ 9.8	83.8 $\pm$ 7.4	78.1 $\pm$ 5.1	64.5 $\pm$ 4.5
<i>eukaliptol</i>					
SC I	42.7 $\pm$ 11.3	42.5 $\pm$ 4.1	26.6 $\pm$ 4.6	25.6 $\pm$ 6.7	25.1 $\pm$ 14.5
SC II	8.3 $\pm$ 1.0	7.2 $\pm$ 4.6	6.5 $\pm$ 1.7	6.3 $\pm$ 2.3	4.8 $\pm$ 1.1
SC III	9.7 $\pm$ 3.8	7.9 $\pm$ 4.1	5.5 $\pm$ 1.7	5.2 $\pm$ 0.9	1.8 $\pm$ 1.8
ED	290.1 $\pm$ 75.0	262.7 $\pm$ 44.5	260.3 $\pm$ 75.7	259.9 $\pm$ 69.3	143.6 $\pm$ 20.5
<i>terpinen-4-ol</i>					
SC I	123.8 $\pm$ 11.2	124.7 $\pm$ 12.3	110.4 $\pm$ 10.4	96.0 $\pm$ 12.3	86.8 $\pm$ 9.9
SC II	44.9 $\pm$ 4.7	41.9 $\pm$ 7.7	39.6 $\pm$ 3.2	28.7 $\pm$ 9.5	21.5 $\pm$ 5.0
SC III	3.4 $\pm$ 0.7	23.5 $\pm$ 4.2	25.9 $\pm$ 6.8	0	0
ED	134.8 $\pm$ 31.2	105.4 $\pm$ 17.0	135.6 $\pm$ 11.6	128.4 $\pm$ 10.8	64.5 $\pm$ 4.5

Tabela 4. Absorpcja terpenów w warstwach skóry w warunkach *ex vivo* po 8 h aplikacji olejków eterycznych ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$; $\text{śr.} \pm \text{S.D.}$, $n=4$)

Terpen	Warstwy skóry	Absorpcja
<i>Olejek geraniowy</i>		
β -cytronelol	SC I	$100,3 \pm 24,0$
	SC II	$39,1 \pm 5,8$
	SC III	$15,4 \pm 3,4$
	ED	$200,6 \pm 39,7$
<i>Olejek lawendowy</i>		
linalol	SC I	$603,2 \pm 150,4$
	SC II	$81,8 \pm 3,9$
	SC III	$16,1 \pm 11,6$
	ED	$606,0 \pm 120,1$
octan linalilu	SC I	$250,1 \pm 30,1$
	SC II	$40,8 \pm 7,8$
	SC III	0
	ED	$102,2 \pm 15,0$
<i>Olejek jałowcowy</i>		
α -pinen	SC I	$61,2 \pm 7,6$
	SC II	$37,4 \pm 4,9$
	SC III	$37,2 \pm 4,3$
	ED	$216,0 \pm 35,2$
<i>Olejek drzewa herbacianego</i>		
terpinen-4-ol	SC I	$711,5 \pm 88,3$
	SC II	$128,3 \pm 14,6$
	SC III	$69,0 \pm 6,8$
	ED	$1510,6 \pm 389,8$

Tabela 5. Absorpcja terpenów w warstwach skóry w warunkach *ex vivo* po 8 h aplikacji olejków eterycznych inkorporowanych w podłożach dermatologicznych ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$; $\bar{x} \pm \text{S.D.}$, $n=4$)

Terpen	Warstwy skóry	Absorpcja
<i>Roztwór olejowy - olejek geraniowy i olejek jałowcowy</i>		
β -cytronelol	SC I	$2,3 \pm 0,8$
	SC II	$2,3 \pm 0,7$
	SC III	$2,3 \pm 0,7$
	ED	0
α -pinen	SC I	0
	SC II	0
	SC III	0
	ED	0
<i>Roztwór olejowy - olejek lawendowy i olejek drzewa herbacianego</i>		
linalol	SC I	$17,1 \pm 4,2$
	SC II	$13,4 \pm 2,5$
	SC III	$13,4 \pm 2,4$
	ED	$15,7 \pm 1,8$
octan linalilu	SC I	$18,0 \pm 2,3$
	SC II	0
	SC III	0
	ED	0
terpinen-4-ol	SC I	$43,9 \pm 8,2$
	SC II	0
	SC III	0
	ED	$45,2 \pm 5,1$
<i>Żel - olejek geraniowy i olejek jałowcowy</i>		
β -cytronelol	SC I	$3,6 \pm 1,2$
	SC II	$3,5 \pm 1,0$
	SC III	$3,8 \pm 0,7$
	ED	$14,0 \pm 2,3$
α -pinen	SC I	0
	SC II	0
	SC III	0
	ED	$4,6 \pm 2,2$
<i>Emulsja O/W - olejek lawendowy i olejek drzewa herbacianego</i>		
linalol	SC I	$13,2 \pm 4,5$
	SC II	$11,5 \pm 2,2$
	SC III	$11,5 \pm 2,1$
	ED	$17,1 \pm 5,0$
octan linalilu	SC I	$7,7 \pm 1,8$
	SC II	0
	SC III	0
	ED	0
terpinen-4-ol	SC I	$25,7 \pm 6,3$
	SC II	0
	SC III	0
	ED	$32,7 \pm 4,6$

Tabela 6. Przenikanie terpenów do warstw skóry w warunkach *ex vivo* w czasie ich aplikacji w podłożach dermatologicznych ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$; śr. $\pm$ S.D., n=4)

Terpen	Warstwy skóry	Czas (h)	
		1	4
(±)-linalol	<i>Roztwór olejowy</i>		
	SC I	4,4 $\pm$ 2,4	64,3 $\pm$ 15,1
	SC II	1,8 $\pm$ 0,5	10,3 $\pm$ 2,2
	SC III	1,4 $\pm$ 0,3	6,0 $\pm$ 1,9
	ED	3,7 $\pm$ 2,0	74,7 $\pm$ 15,6
	<i>Żel</i>		
	SC I	64,7 $\pm$ 10,5	150,6 $\pm$ 27,2
	SC II	18,7 $\pm$ 6,6	26,4 $\pm$ 10,0
	SC III	14,4 $\pm$ 3,6	14,6 $\pm$ 4,3
	ED	140,7 $\pm$ 37,7	193,7 $\pm$ 21,3
	<i>Emulsja O/W</i>		
	SC I	21,7 $\pm$ 6,5	42,6 $\pm$ 7,9
	SC II	6,3 $\pm$ 2,3	7,6 $\pm$ 0,9
	SC III	4,0 $\pm$ 0,9	4,5 $\pm$ 1,7
	ED	25,3 $\pm$ 5,7	66,1 $\pm$ 11,1
terpinen-4-ol	<i>Roztwór olejowy</i>		
	SC I	41,9 $\pm$ 8,1	43,2 $\pm$ 7,8
	SC II	4,2 $\pm$ 1,7	9,7 $\pm$ 0,9
	SC III	4,9 $\pm$ 2,6	4,0 $\pm$ 1,5
	ED	46,9 $\pm$ 14,9	141,2 $\pm$ 12,5
	<i>Żel</i>		
	SC I	85,7 $\pm$ 6,5	116,2 $\pm$ 16,5
	SC II	22,5 $\pm$ 1,7	33,2 $\pm$ 4,2
	SC III	11,5 $\pm$ 3,5	25,8 $\pm$ 11,6
	ED	105,6 $\pm$ 16,6	529,7 $\pm$ 50,3
	<i>Emulsja O/W</i>		
	SC I	20,2 $\pm$ 7,1	57,0 $\pm$ 5,8
	SC II	6,6 $\pm$ 1,5	15,6 $\pm$ 4,1
	SC III	7,2 $\pm$ 2,4	6,5 $\pm$ 2,4
	ED	24,4 $\pm$ 7,5	98,2 $\pm$ 14,4

Tabela 7. Eliminacja terpenów z warstw skóry w warunkach *ex vivo* po 1 h (t=0) aplikacji w podłożach dermatologicznych ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$; $\bar{x} \pm \text{S.D.}$, n=4)

Terpen	Warstwy skóry	Czas (h)		
		0	1	4
(±)-linalol	<i>Roztwór olejowy</i>			
	SC I	4,4 ± 2,4	3,6 ± 1,6	0,8 ± 0,2
	SC II	1,8 ± 0,5	1,6 ± 0,2	0,6 ± 0,2
	SC III	1,4 ± 0,3	0,8 ± 0,2	0,4 ± 0,1
	ED	3,7 ± 2,0	2,8 ± 0,8	0,9 ± 0,3
	<i>Żel</i>			
	SC I	64,7 ± 10,5	68,3 ± 6,8	23,2 ± 4,8
	SC II	18,7 ± 6,6	13,9 ± 3,5	5,2 ± 1,7
	SC III	14,4 ± 3,6	6,1 ± 1,2	4,3 ± 1,7
	ED	140,7 ± 37,7	136,5 ± 16,8	134,2 ± 16,2
	<i>Emulsja O/W</i>			
	SC I	21,7 ± 6,5	14,2 ± 3,8	10,8 ± 1,9
	SC II	6,3 ± 2,3	5,4 ± 1,7	4,2 ± 1,0
	SC III	4,0 ± 0,9	3,7 ± 1,3	3,6 ± 0,6
	ED	25,3 ± 5,7	19,1 ± 3,9	8,4 ± 1,6
terpinen-4-ol	<i>Roztwór olejowy</i>			
	SC I	41,9 ± 8,1	40,2 ± 4,9	20,5 ± 1,9
	SC II	4,2 ± 1,7	3,4 ± 0,7	0,8 ± 0,3
	SC III	4,9 ± 2,6	3,9 ± 1,7	0,8 ± 0,2
	ED	46,9 ± 14,9	30,1 ± 5,2	11,2 ± 1,8
	<i>Żel</i>			
	SC I	85,7 ± 6,5	76,6 ± 6,4	25,1 ± 3,3
	SC II	22,5 ± 1,7	20,6 ± 4,8	17,2 ± 3,2
	SC III	11,5 ± 3,5	10,9 ± 3,1	9,0 ± 2,2
	ED	105,6 ± 16,6	90,4 ± 8,7	73,9 ± 4,7
	<i>Emulsja O/W</i>			
	SC I	20,2 ± 7,1	13,6 ± 1,9	3,3 ± 0,4
	SC II	6,6 ± 1,5	3,1 ± 1,4	1,2 ± 0,2
	SC III	7,2 ± 2,4	3,1 ± 1,4	0,8 ± 0,1
	ED	24,4 ± 7,5	17,6 ± 3,5	5,1 ± 0,8

Tabela 8. Absorpcja w warstwie rogowej i eliminacja terpenów po ich aplikacji w podłożach dermatologicznych w warunkach *in vivo* ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$; śr. $\pm$ S.D., n=8)

Terpen	Frakcje warstwy rogowej naskórka	Czas (h)		
		1 h absorpcji	1 h eliminacji	2 h eliminacji
(±)-linalol	<i>Roztwór olejowy</i>			
	SC I	9,8 $\pm$ 1,7	4,4 $\pm$ 0,6	3,3 $\pm$ 0,6
	SC II	7,6 $\pm$ 1,4	3,7 $\pm$ 0,6	3,3 $\pm$ 0,8
	SC III	6,9 $\pm$ 1,0	3,7 $\pm$ 0,6	3,5 $\pm$ 0,8
	<i>Żel</i>			
	SC I	18,7 $\pm$ 3,5	4,8 $\pm$ 1,5	4,1 $\pm$ 1,0
	SC II	13,1 $\pm$ 2,9	4,4 $\pm$ 1,2	3,3 $\pm$ 0,4
	SC III	12,7 $\pm$ 3,3	3,7 $\pm$ 0,7	3,2 $\pm$ 0,3
terpinen-4-ol	<i>Roztwór olejowy</i>			
	SC I	10,2 $\pm$ 2,8	3,2 $\pm$ 0,9	2,2 $\pm$ 1,0
	SC II	7,1 $\pm$ 1,7	2,5 $\pm$ 1,0	1,8 $\pm$ 0,6
	SC III	5,7 $\pm$ 1,7	2,1 $\pm$ 0,6	1,5 $\pm$ 0,5
	<i>Żel</i>			
	SC I	57,1 $\pm$ 14,6	5,6 $\pm$ 2,1	3,4 $\pm$ 0,8
	SC II	33,9 $\pm$ 9,1	4,0 $\pm$ 2,0	2,2 $\pm$ 0,8
	SC III	19,4 $\pm$ 4,9	2,6 $\pm$ 1,0	1,1 $\pm$ 0,5

PUBLIKACJE STANOWIĄCE ROZPRAWĘ HABILITACYJNĄ

	strona
1. <u>Cal K.</u> Aqueous solubility of liquid monoterpenes at 293 K and relationship with calculated log P value. Yakugaku Zasshi 2006; 126: 307-309	37
2. <u>Cal K.</u> , Sznitowska M. Cutaneous absorption and elimination of three acyclic terpenes – <i>in vitro</i> studies. J Control Release 2003; 93: 369-376	40
3. <u>Cal K.</u> , Kupiec K, Sznitowska M. Effect of physicochemical properties of cyclic terpenes on their <i>ex vivo</i> skin absorption and elimination kinetics. J Dermatol Sci 2006; 41: 137-142	48
4. <u>Cal K.</u> Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. Planta Med 2006; 72: 311-316	54
5. <u>Cal K.</u> How does the type of vehicle influence the <i>in vitro</i> skin absorption and elimination kinetics of terpenes? Arch Dermatol Res 2006; 297: 311-315	60
6. <u>Cal K.</u> , Krzyżaniak M. <i>Stratum corneum</i> absorption and retention of linalool and terpinen-4-ol applied as gel or oily solution in humans. J Dermatol Sci 2006; 42: 265-267	65

Skumulowany IF ISI (2005) publikacji stanowiących rozprawę habilitacyjną wynosi 10,888.