



Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej

Hanna Wosicka-Fraćkowiak

MIKRO- I NANOCZĄSTKI LIPIDOWE JAKO NOŚNIKI ROKSYTROMYCYNY DO MIESZKÓW WŁOSOWYCH

Praca wykonana
w Katedrze i Zakładzie Technologii Postaci Leku
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
oraz w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
i przedstawiona Radzie Wydziału Farmaceutycznego
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
w celu uzyskania stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Promotor pracy:
dr hab. Krzysztof Cal, prof. nadzw. GUMed
Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk 2014

**Badania finansowane z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa
Wyższego (grant nr N N405 674740)**

Panu **Profesorowi Krzysztofowi Calowi**
serdecznie dziękuję
za wskazanie bardzo interesującego tematu pracy oraz
cenne wskazówki podczas jej wykonywania.

Podziękowania składam także Kierownikowi Katedry i Zakładu Farmacji
Stosowanej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego –
prof. dr hab. Małgorzacie Sznitowskiej
za umożliwienie wykonania pracy w tej Katedrze.

Dziękuję również Kierownikowi mojej macierzystej jednostki – Katedry i Zakładu
Technologii Postaci Leku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu –
prof. dr hab. Janinie Lulek
za przychylność oraz motywujące dyskusje.

Składam serdecznie podziękowania

dr n. farm. Elizie Główce

mgr Justynie Stefanowskiej

dr n. farm. Bartłomiejowi Milanowskiemu

za nieocenioną pomoc w realizacji pracy, życzliwość i wartościowe dyskusje.

Dziękuję również moim **Rodzicom** oraz **Mężowi** za nieustające wsparcie.

WYKAZ SKRÓTÓW	7
STRESZCZENIE	9
SUMMARY	12
I WSTĘP	15
II CZĘŚĆ TEORETYCZNA	17
1. BUDOWA SKÓRY	17
2. WŁOSY	19
3. CYKL WŁOSOWY	24
4. PRZENIKANIE DO I PRZEZ MIESZKI WŁOSOWE	25
4.1. Metody badania przenikania do/przez mieszki włosowe	28
5. MIKRO- I NANOCZĄSTKI JAKO NOŚNIKI LEKÓW DO MIESZKÓW WŁOSOWYCH	29
5.1. Lipidowe nano- i mikrocząstki	36
6. ROKSYTROMYCYNĄ	44
7. TOKSYCZNOŚĆ LIPIDOWYCH NANO- I MIKROCZĄSTEK	46
III CEL PRACY	50
IV CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	52
1. ODCZYNNIKI	52
2. SPRZĘT	52
3. MATERIAŁY	54
4. METODY	54
4.1. Otrzymywanie zawiesin cząstek lipidowych z roksytromycyną	54
4.2. Charakterystyka cząstek lipidowych z roksytromycyną	56
4.2.1. Różnicowa kalorymetria skaningowa	56
4.2.2. Morfologia cząstek	56
4.2.3. Wielkość cząstek, współczynnik polidispersji i potencjał Zeta	56
4.2.4. Zawartość roksytromycyny w cząstkach	57
4.2.5. Wartość pH formulacji	59
4.3. Uwalnianie <i>in vitro</i> roksytromycyny z formulacji B S	59
4.4. Badanie aktywności formulacji B S przeciw <i>Propionibacterium acnes</i> (Ph. Eur. 7.0)	60
4.5. Ocena potencjału drażniącego formulacji B S <i>in vitro</i>	61
4.6. Obrazowanie wnikania cząstek do mieszków włosowych skóry ludzkiej <i>ex vivo</i>	61
4.6.1. Obrazowanie rozmieszczenia cząstek w skórze z okolicy klatki piersiowej	62
4.6.2. Obrazowanie rozmieszczenia cząstek w skórze głowy	63
4.7. Penetracja cząstek do mieszków włosowych <i>in vivo</i> i oznaczenie roksytromycyny w pobranych biopsjach cyjanoakrylowych	64
5. WYNIKI	70
5.1. Charakterystyka cząstek lipidowych z roksytromycyną	70
5.1.1. Różnicowa kalorymetria skaningowa	70
5.1.2. Morfologia cząstek	73
5.1.3. Wielkość cząstek, współczynnik polidispersji i potencjał Zeta	75
5.1.4. Zawartość roksytromycyny w cząstkach	78
5.1.5. Wartość pH formulacji	80
5.2. Uwalnianie <i>in vitro</i> roksytromycyny z formulacji B S	80

5.3. Badanie aktywności formułacji B S przeciw <i>Propionibacterium acnes</i> (Ph. Eur. 7.0)	81
5.4. Ocena potencjału drażniącego formułacji B S <i>in vitro</i>	82
5.5. Obrazowanie wnikania cząstek do mieszków włosowych skóry ludzkiej <i>ex vivo</i>	82
5.5.1. Obrazowanie rozmieszczenia cząstek w skórze z okolicy klatki piersiowej	82
5.5.2. Obrazowanie rozmieszczenia cząstek w skórze głowy	84
5.6. Penetracja cząstek do mieszków włosowych <i>in vivo</i> i oznaczanie roksytromycyny w pobranych biopsjach cyjanoakrylowych	90
V OMÓWIENIE I Dyskusja Wyników	92
VI Wnioski	108
VII Piśmiennictwo	109
VIII Spis Rycin i Tabel	119
IX Załącznik	124

WYKAZ SKRÓTÓW

- AFM** - mikroskopia sił atomowych (ang. *atomic force microscopy*)
- API** - substancja lecznicza (ang. *active pharmaceutical ingredient*)
- BCS** - system klasyfikacji biofarmaceutycznej (ang. *Biopharmaceutical Classification System*)
- CLSM** - laserowy skanujący mikroskop konfokalny (ang. *confocal laser scanning microscope*)
- CSSS** - usuwanie powierzchni skóry przy pomocy cyjanoakrylu (ang. *cyanoacrylate skin surface stripping*)
- ESI** - jonizacja przez elektrorozpylanie (ang. *electrospray ionisation*)
- FDA** - Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*)
- FP** - Farmakopea Polska
- HLB** - równowaga hydrofilowo-lipofilowa (ang. *hydrophilic-lipophilic balance*)
- HPLC** - wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *high-performance liquid chromatography*)
- IRS** - wewnętrzna pochewka włosa (ang. *inner root sheath*)
- LOD** - granica wykrywalności (ang. *limit of detection*)
- LOQ** - granica oznaczalności (ang. *limit of quantification*)
- MIC** - minimalne stężenie hamujące (ang. *minimal inhibitory concentration*), parametr charakteryzujący leki przeciwbakteryjne
- MRM** - tryb monitorowania wielu reakcji (ang. *multiple reaction monitoring*) w spektrometrii mas
- MS** - spektrometria mas (ang. *mass spectrometry*)
- MTT** - (bromek 3-[4,5-dimetylotiazolo-2-ilo]-2,5-difenylotetrazoliowy) (ang. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*)
- MWCO** - masa molowa związku powyżej której 90% jego cząsteczek zostaje zatrzymanych na filtrze (ang. *molecular weight cut off*)
- NLC** - nanostrukturalne nośniki lipidowe (ang. *nanostructured lipid carriers*)
- ORS** - zewnętrzna pochewka włosa (ang. *outer root sheath*)
- PdI** - współczynnik polidispersji (ang. *polydispersity index*)

Ph. Eur. - Farmakopea Europejska

PLGA - kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego

RBHE - ester heksylowy nadchloranu rodaminy B (ang. *rhodamine B, hexyl ester, perchlorate*)

RSD% - względne odchylenie standardowe (ang. *relative standard deviation*)

ROX - roksytromycyna

SCCP - Komitet Naukowy ds. Produktów Konsumenckich (ang. *Scientific Committee on Consumer Products*)

SD - odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*)

SDS - dodecylosiarczan sodu (ang. *sodium dodecyl sulfate*)

SEM - skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *scanning electron microscopy*)

S/N - stosunek sygnału do szumu (ang. *signal to noise*)

SLN - stałe nanocząstki lipidowe (ang. *solid lipid nanoparticles*)

TEM - transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. *transmission electron microscopy*)

USP - Farmakopea Amerykańska (ang. *United States Pharmacopeia*)

STRESZCZENIE

Droga transfolikularna (przez mieszkową), jako jedna z możliwości transportu przezskórnego, wymieniana była w publikacjach naukowych od wielu lat, jednak nie była uznawana za znaczącą. Obecnie istnieją badania dowodzące, że niektóre substancje mogą tą drogą docierać do krążenia ogólnego, gdyż mieszki włosowe to miejsce, gdzie warstwa rogowa traci swą ciągłość. Same mieszki włosowe natomiast zyskują coraz większe znaczenie jako zbiornik substancji aplikowanych na skórę, uwalniając je w sposób przedłużony. Coraz więcej nadziei wiąże się także z leczeniem schorzeń związanych z jednostką włosowo-łojową przez selektywne dostarczanie do niej substancji leczniczych zawartych w odpowiednich nośnikach. Taki też był cel wykonanych badań. Miały one wykazać możliwość inkorporacji roksytromycyny do nośników lipidowych i zasadność zastosowania takiego systemu dostarczania leku w terapii miejscowej. Roksytromycyna nie jest dostępna nigdzie na świecie w postaci preparatu farmaceutycznego do stosowania zewnętrznego (w Japonii były prowadzone badania kliniczne lotionu z 0,5% roksytromycyny).

W badaniach zastosowano dwie metody otrzymywania cząstek lipidowych: sonikację poprzedzoną homogenizacją szybkoobrotową oraz samą sonikację. Ustalono, że druga metoda pozwala uzyskać najmniejsze (< 300nm) i najbardziej jednorodnie cząstki (PdI=0,246). W badaniach wstępnych użyto techniki DSC, aby ustalić sposób inkorporacji roksytromycyny w nośnikach lipidowych. Morfologię otrzymywanych cząstek scharakteryzowano dzięki technikom: SEM, TEM i AFM. Wielkość nośników oceniano dwoma niezależnymi metodami: dynamicznego rozproszenia światła i dyfrakcji laserowej, używając aparatów o różnych zakresach pomiarowych (Zetasizer i Mastersizer). Mierzono również współczynnik polidispersji oraz potencjał Zeta otrzymywanych cząstek lipidowych. Aby ilościowo ocenić inkorporację roksytromycyny w nośnikach, najpierw opracowano i zwalidowano metodę jej oznaczania techniką HPLC. Wyznaczony dla wszystkich formułacji procentowy stopień inkorporacji leku wyniósł: 61-86%.

Na podstawie opisanych wyżej wyników badań wybrano 1 formułację – B S, zawierającą 1% roksytromycyny, 5% stałego lipidu (Compritol) i 2,5% emulgatora (Poloxamer 188). Tę dyspersję poddano dalszym badaniom, m.in. stabilności

fizycznej. Dowiedziono, że formułacje przechowywane w temperaturze 25 i 40°C zachowały wyjściową wielkość cząstek oraz $PdI < 0,3$ przez cały czas badania. Natomiast potencjał Zeta w przypadku wszystkich zawiesin wzrósł.

Kolejnym etapem charakterystyki formułacji B S było badanie uwalniania z niej roksytromycyny przy użyciu błony dializacyjnej 10 kDa MWCO. Po 24 h do płynu akceptorowego (woda) uwolniło się ok. 21% leku, będącego w większości frakcją niezaincorporowaną w nośnikach. Badanie aktywności formułacji B S przeciw *Propionibacterium acnes* wykazało znaczną (99,9%) redukcję wzrostu bakterii, a ocena jej potencjału drażniącego na ludzkim modelu naskórka *EpiDerm*® udowodniła brak cytotoksyczności.

Następną częścią doświadczeń było obrazowanie wnikania cząstek formułacji B S do mieszków włosowych skóry ludzkiej *ex vivo*. Użyto w tym celu skóry z głowy i okolicy klatki piersiowej, a zawiesinę przygotowano z dodatkiem barwnika fluorescencyjnego - estru heksylowego nadchloranu rodaminy B. Jako próby kontrolnej użyto olejowego roztworu wymienionego barwnika. W procedurę aplikacji preparatu włączono masaż, który jak wynika z wielu badań znacznie poprawia penetrację nośników do mieszków. Po inkubacji w 37°C wykonano kriotomem poprzeczne oraz podłużne przekroje zamrażanych fragmentów skóry, które oglądano i wykonywano zdjęcia przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego z kamerą. Po aplikacji nośników lipidowych z barwnikiem widoczna była fluorescencja w głębokiej części mieszka, aż do cebulki włosa. Natomiast po zastosowaniu roztworu barwnika zauważalna była bardzo silna fluorescencja na powierzchni skóry, brak jej natomiast było w kanale włosa. Dodatkowo przeprowadzono procedurę *differential stripping*, otrzymując cyjanoakrylowe biopsje zawartości mieszków, uwidaczniające drogę penetracji nośników lipidowych w mieszkach i dowodzące wnikania formułacji głęboko do kanałów włosowych. W celu dokładniejszego porównania penetracji folikularnej cząstek lipidowych oraz roztworu na różnych głębokościach, wykonano przekroje poprzeczne o grubości 100 μm , poczynając od ok. 300 μm w głąb skóry. Na podstawie komputerowej analizy zdjęć, stwierdzono, że intensywność fluorescencji w przypadku barwnika aplikowanego w nośniku jest wyraźnie większa niż roztworu tego barwnika na porównywalnych głębokościach.

W ostatnim etapie badań podjęto próbę oznaczenia ilości roksytromycyny dostarczonej w postaci formułacji B S do ludzkich mieszków włosowych *in vivo*. W tym celu przeprowadzono procedurę *differential stripping in vivo* na skórze łydki oraz przedramienia. Po ekstrakcji otrzymanych biopsji metanolem, oznaczono w nich zawartość leku techniką HPLC-ESI-MS/MS, uzyskując wyniki w granicach 0,24-2,4% aplikowanej ilości roksytromycyny.

Badania wykonano w Katedrze i Zakładzie Technologii Postaci Leku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej oraz Katedrze Biofarmacji i Farmakodynamiki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, a także we współpracy z Centrum Naukowo-Badawczym Dr Irena Eris i Katedrą Technologii Farmaceutycznej Uniwersytetu w Lublanie (Słowenia).

Dotychczasowym efektem pracy są dwa zgłoszenia patentowe: polskie i międzynarodowe.

SUMMARY

Transfollicular pathway has been listed in scientific publications as one of transdermal drug delivery routes for many years, however it has not been regarded significant. Nowadays there are scientific proofs that some chemicals can reach the general circulation transfollicularly. The reason is that a hair follicle is a place, where the *stratum corneum* is not consistent any more. Hair follicles are gaining in importance as reservoirs for topically applied substances, providing their prolonged release. There are increasing hopes that treating hair follicle-associated diseases will be possible by targeted follicular delivery of active agents in suitable carriers. That was the aim of the studies that have been performed. They were to prove the possibility of roxithromycin incorporation into lipid carriers and validity of using this drug delivery system in local therapy. Nowhere in the world is there any registered preparation containing this antibiotic that would be designated for topical application (only clinical studies with lotion containing 0.5% roxithromycin have been conducted in Japan).

In the study two methods of lipid particles preparation were used: high-shear homogenization followed by sonication and sole sonication. It was concluded that the second method allows to obtain the smallest (< 300 nm) and most homogenous particles (Pdl=0.246). During the preliminary experiments DSC technique was used to evaluate the way of roxithromycin incorporation in the lipid carriers. Morphology of the obtained particles was characterized using SEM, TEM and AFM. The particles' size was measured using two independent techniques (dynamic light scattering and laser diffraction) and apparatuses with different measuring ranges (Zetasizer and Mastersizer). Poldispersity index and Zeta potential of the carriers were also evaluated. In order to quantify the incorporation of the drug in the particles a method using high performance liquid chromatography was developed and validated. The incorporation efficiency for all formulations that were prepared ranged: 61-86%.

On the basis of the results described above, one formulation was chosen for further examination - dispersion B S containing 1% of roxithromycin, 5% of solid lipid (Compritol) and 2.5% of emulsifier (Poloxamer 188). The formulation

was checked for physical stability and proved to have stable particles' size and PDI < 0.3 throughout the time of the study when stored at 25 or 40°C. However Zeta potential increased for all tested dispersions.

The next stage of characterizing the chosen formulation was determining the *in vitro* roxithromycin release using a dialysis sac 10 kDa MWCO. After 24h 21% of the drug was determined in the acceptor fluid (water). This was mainly the drug fraction that was not incorporated in the carriers. The B S formulation was also evaluated for its antibacterial properties against *Propionibacterium acnes* (99.9% reduction of bacterial growth) and for skin irritation (no cytotoxicity).

The following step was to visualize follicular penetration of formulation B S particles. Human scalp and chest skin *ex vivo* was used. The dispersion had the addition of a fluorescent dye (rhodamine B hexyl ester perchlorate) and the dye's solution in oil served as a reference. The application procedure included massage that has been proved to promote follicular penetration. After incubation at 37°C vertical and horizontal sections of the frozen skin samples were obtained using a cryotome and observed using a fluorescence microscope coupled with a camera. Photographs were taken and analyzed. Application of the dye incorporated into the particles resulted in strong fluorescence deep in the follicles down to the bulb area. The dye applied in the solution form resulted in very strong fluorescence on the skin surface, but not in the hair canal. Additionally the differential stripping procedure was performed producing cyanoacrylate follicular biopsies that helped to visualize follicular penetration path of the particles and prove their deep follicular delivery. In order to precisely compare the penetration of lipid particles and solution at increasing depths, horizontal sections 100 µm thick were obtained starting from the depth of 300 µm. The photographs of the sections were analyzed by the software and revealed that the dye incorporated into the particles produced significantly greater fluorescence, compared to the solution at the same depths.

In the last stage of experiments an attempt was taken to quantify roxithromycin delivered in the form of B S dispersion to human hair follicles *in vivo*. In order to do this differential stripping was performed *in vivo* at the forearm and the calf areas. Cyanoacrylate biopsies, obtained by this procedure, were extracted with methanol. The drug concentration assayed by HPLC-ESI-MS/MS technique ranged 0.24-2.4% of the applied amount.

The studies were carried out at the Department of Pharmaceutical Technology (Poznan University of Medical Sciences), Department of Pharmaceutical Technology and Department of Biopharmaceutics and Pharmacodynamics (Medical University of Gdansk) as well as with the cooperation of Dr Irena Eris Scientific-Research Centre and Department of Pharmaceutical Technology (University of Ljubljana, Slovenia).

Two patent notifications (polish and international) have been the effects of the work so far.

I WSTĘP

Od kilku lat panuje opinia, że nanotechnologia może odgrywać ważną rolę w rozwoju preparatów farmaceutycznych o pożądanym właściwościach, szczególnie w przypadku leków o niekorzystnych cechach biofarmaceutycznych (niska rozpuszczalność, słaba przenikalność przez błony biologiczne, itp.) (Devalapally *et al.*, 2007). Badania w tej dziedzinie skoncentrowane są na jak najbardziej celowanym i specyficznym dostarczaniu substancji leczniczych do konkretnych miejsc w organizmie. Wiąże się z tym rozwój nanomedycyny, jako gałęzi medycyny korzystającej w praktyce z osiągnięć nanotechnologii (Saraceno *et al.*, 2013). Jednocześnie pojawia się wiele obaw dotyczących toksyczności „nanoleków”. Wynika to przede wszystkim z braku wystarczającej ilości badań w tym zakresie oraz trudności w porównaniu między sobą istniejących wyników. Nystrom i Fadeel (2012) sformułowali kryteria, jakie powinien spełniać idealny nanopreparat. Są nimi: biogodność, celowane („inteligentne”) dostarczanie API, biodegradowalność preparatu, możliwość śledzenia/obrazowania jego losów w organizmie oraz przeniesienia jego produkcji do skali przemysłowej przy jak najmniejszych kosztach.

Mimo wielu zastrzeżeń jakie wysuwane są w kierunku nanotechnologii, brak jest w dalszym ciągu uniwersalnej definicji nanocząstek, czyli podstawowego nośnika API w nanotechnologii. W pracy posłużono się więc określeniami: nano- i mikrocząstki. Istnieje wiele klasyfikacji nanocząstek, jako nośników leków. Biorąc pod uwagę ich interakcje z błonami biologicznymi i skórą, zasadny wydaje się być podział zaproponowany przez Papakostas *et al.* (2011). Wyróżnili oni dwie grupy nanonośników: „miękkie” (deformowalne) i „sztywne” (niedeformowalne). Do pierwszej grupy zaliczyli organiczne nośniki (cząstki polimerowe, lipidowe, proteinowe, liposomy), które mogą tymczasowo zmieniać swój kształt pod wpływem kontaktu z błoną biologiczną lub inną powierzchnią. Drugą grupę stanowią nieorganiczne nośniki, takie jak nanocząstki złota, srebra, tlenku żelaza czy krzemionki. Nie ulegają one deformacji w kontakcie np. z błoną.

Droga transfolikularna (przezmięskowa), jako jedna z możliwości transportu przezskórnego, wymieniana była w publikacjach naukowych od wielu lat, jednak nie była uznawana za istotną. Obecnie istnieją badania dowodzące, że niektóre

substancje mogą tą drogą docierać do krążenia ogólnego (Otberg *et al.*, 2007), gdyż mieszek włosowy to miejsce, gdzie warstwa rogowa traci swą ciągłość. Same mieszki włosowe natomiast zyskują coraz większe znaczenie jako zbiorniki substancji aplikowanych na skórę, uwalniając je w sposób przedłużony (Lademann *et al.*, 2006). Coraz więcej nadziei wiąże się także z leczeniem chorób związanych z jednostką włosowo-łojową przez selektywne dostarczanie do niej leków zawartych w odpowiednich nośnikach. Może to pozwolić na rozwój innowacyjnych strategii terapeutycznych w przypadku takich schorzeń jak trądzik, łojotok czy łysienie (Rancan *et al.*, 2014). Papakostas *et al.* (2011) wyróżnili trzy potencjalne strategie terapii opierające się na dostarczaniu nośników z lekami do mieszków włosowych. Pierwsza wykorzystuje je jako „boczne wejście” w głąb skóry, przy czym nośniki ulegają degradacji w mieszku, a sam lek przenika dalej. Druga strategia opiera się na celowanym dostarczaniu nośników do mieszków, aby leczyć schorzenia zlokalizowane w obrębie jednostki włosowo-łojowej. Trzeci rodzaj terapii to wykorzystywanie mieszków jako drogi dotarcia nanocząstek do żywych komórek skóry, np. tych odpowiedzialnych za reakcje immunologiczne (przezskórne szczepionki).

II CZĘŚĆ TEORETYCZNA

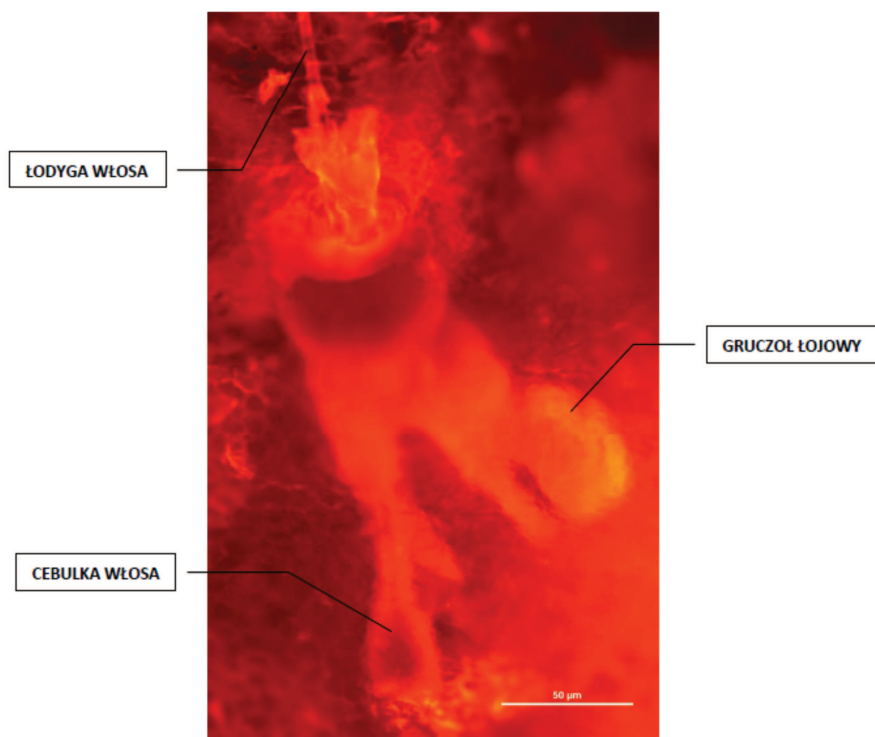
1. BUDOWA SKÓRY

Skóra, bariera chroniąca organizm przed wnikaniem niepożądanych substancji z zewnątrz, może stanowić wygodną drogę podawania związków leczniczych. Jej budowa pozornie nie jest tak skomplikowana jak innych ludzkich organów, jednak wymaga osobnego omówienia.

Skórę ludzką, której średnia grubość to ok. 2,5 mm, można podzielić na trzy podstawowe warstwy: rogową, naskórek oraz skórę właściwą. Najbardziej zewnętrzną jest warstwa rogowa - *stratum corneum*. Naskórek (*epidermis*) utworzony jest z wielowarstwowego nabłonka płaskiego, ma grubość od 40 μm (powieki) do 1,6 mm (dłonie, podeszwy stóp). Ogromna większość komórek naskórka to keratynocyty, oprócz nich są także melanocyty, w których przebiega synteza melaniny oraz komórki *Langerhansa*, biorące udział w odpowiedzi immunologicznej. W obrębie naskórka można wyróżnić warstwę ziarnistą (*stratum granulosum*) oraz rozrodczą (*stratum germinativum*), która dzieli się na warstwę kolczystą (*stratum spinosum*) i podstawną (*stratum basale*). Nowe keratynocyty powstają w warstwie podstawnej i w miarę jak dojrzewają przesuują się w stronę powierzchni naskórka, ulegając w końcowym etapie, w warstwie rogowej, złuszczeniu. Proces ten trwa ok. 30 dni. Keratynocyty tworzące warstwę rogową to już korneocyty – komórki martwe, całkowicie zrogowaciałe, spłaszczone i bezjądrzaste. *Stratum corneum*, złożone z 15-30 warstw korneocytów, jest podstawową barierą – zapobiega nadmiernemu parowaniu wody ze skóry oraz wnikaniu substancji egzogennych. Warstwa rogowa jest często dla uproszczenia określana jako model – „cegły – zaprawa”. Cegły to wypełnione keratyną korneocyty, połączone między sobą cienkimi korneodesmosomami, natomiast zaprawę tworzą dwuwarstwy lipidowe zawierające m.in. ceramidy, cholesterol i wolne kwasy tłuszczowe. Skóra właściwa (*dermis*) ma grubość od 500 μm do 1 mm i złożona jest z dwóch warstw: brodawkowatej (*stratum papillare*) oraz siateczkowatej (*stratum reticulare*). Ta ostatnia stanowi ok. 80% grubości skóry i ma

bezpośredni wpływ na jej elastyczność, ponieważ składa się z włókien kolagenowych i elastynowych oraz fibroblastów. Warstwa brodawkowata natomiast zawiera naczynia włosowate. Skóra właściwa przechodzi bez wyraźnej granicy w tkankę podskórną, tworzoną przez komórki tkanki łącznej oraz tłuszczowej. W warstwie podskórnej przebiegają naczynia żyłne, tętnicze oraz chłonne, tworząc w dolnej części skóry właściwej splot głęboki. Biorą z niego początek drobne naczynia (tętniczki i żyłki), tworzące w górnej części warstwy siateczkowej splot naczyń powierzchnowy, dzięki któremu odżywiany jest naskórek, pozbawiony naczyń (Tobin, 2006; Martini, 2007; Mutschler *et al.*, 2010; Prow *et al.*, 2011).

Do wytworów naskórka, określanymi mianem przydatków zalicza się: paznokcie, włosy, gruczoły łojowe i potowe. Gruczoły łojowe zaliczane są do tzw. gruczołów holokrynowych, co znaczy, że uwalniają sebum podczas rozpadu komórek. Większość gruczołów łojowych (z wyjątkiem tych obecnych na obszarach pozbawionych włosów) uchodzi do mieszków włosowych, tworząc tzw. jednostkę włosowo-łojową (Zouboulis, 2004). Gruczoł łojowy wraz z jego ujściem do kanału włosa przedstawia rycina 1.



Rycina 1. Zdjęcie jednostki włosowo-łojowej spod mikroskopu fluorescencyjnego (preparat barwiony Czerwienią Nilu, obiektyw 40 x).

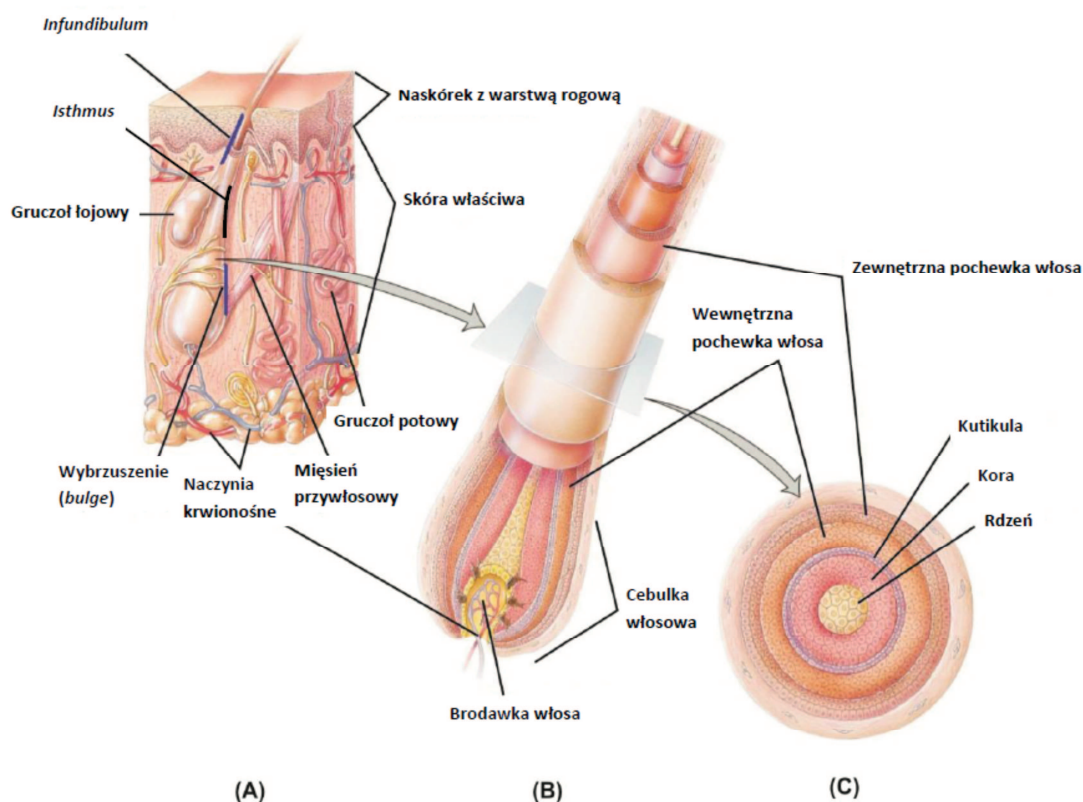
Gruzoły łojowe budowane są przez duże komórki - sebocyty - produkujące i magazynujące wydzielinę – sebum. Keratynocyty natomiast budują ujście gruczołu do kanału włosa. Sebum uchodzi tą drogą na powierzchnię skóry. Skład ludzkiego sebum stanowią m.in.: skwaleń, triglicerydy, cholesterol i jego estry oraz woski. Podczas przemieszczania się sebum przez kanał włosa, enzymy bakteryjne hydrolizują triglicerydy, więc w skład sebum wydostającego się na powierzchnię skóry wchodzi dodatkowo wolne kwasy tłuszczowe oraz mono- i diglicerydy (Downie *et al.*, 2004; Thiboutot, 2004; Tobin, 2006; Sakuma i Maibach, 2012). Ilość wydzielanego sebum podlega dużym wahaniom, uwarunkowanym zarówno genetycznie, jak i hormonalnie. Przykładowo, jako normę dla kobiet niektórzy podają 0,4 mg/cm²/min (Baroli, 2010).

2. WŁOSY

Włos to kolejny ważny wytwór naskórka. Jest to jednocześnie jeden z bardziej złożonych „miniorganów” ludzkiego ciała, który przez cały czas się odnawia, przechodząc wiele razy przez cykl życiowy od anagenu po telogen (Tobin, 2006).

Całe ciało ludzkie pokryte jest ok. 5 milionami włosów, a jedyne obszary ich pozbawione to wewnętrzna strona dłoni, podeszwy stóp, usta oraz fragmenty zewnętrznych narządów płciowych (Krause i Foitzik, 2006; Wosicka i Cal, 2010). Umieszczenie mieszka włosowego w skórze, strukturę mieszka włosowego oraz jego przekrój przedstawia rycina 2. Włos otaczają dwie pochewki: zewnętrzna i wewnętrzna (ryc. 2B). Zewnętrzna pochewka włosa jest przedłużeniem naskórka wpuklającego się do skóry właściwej (dlatego włos jest klasyfikowany jako wytwór naskórka). Elementem wywodzącym się z ORS jest też gruczoł łojowy. Zewnętrzna pochewka włosa może pośrednio lub bezpośrednio wpływać na rozwój włosa. Produkuje czynniki, które wpływają na zakończenie fazy wzrostu włosa, kontrolując w ten sposób jego długość. Wewnętrzna pochewka włosa, tworzona przez komórki macierzy włosa (*hair matrix*), zbudowana jest z trzech warstw: *Henle'a*, *Huxley'a* oraz kutikuli związanej bezpośrednio z kutikulą włókna włosa. IRS, otaczająca włos

od dołu, kończy się w miejscu ujścia gruczołu łojowego i odpowiada za prawidłowe formowanie się włosa (Meidan *et al.*, 2005; Schlake, 2007).



Rycina 2. Struktura skóry (A), struktura (B) i przekrój (C) mieszka włosowego (Wosicka i Cal, 2010).

Włókno włosa (ryc. 2C) jest tworzone od wewnątrz przez: rdzeń (*medulla*), korę (*cortex*), zawierającą melanosomy, oraz kutikulę (*cuticula*) złożoną z płaskich, skeratynizowanych komórek, nachodzących na siebie dachówkowato. Te komórki tworzą tzw. łuski włosa, których wolne brzegi skierowane są ku końcowi włosa. Wymienione trzy warstwy włosa wspólnie odpowiadają za jego strukturę, kształt i połysk. Kora nadaje sztywność włóknu włosowemu (Schlake, 2007).

Łodygę włosa, zakończoną cebulką włosową (*hair bulb*), można podzielić na trzy części, określane jako (od góry): *infundibulum*, *isthmus* oraz strefa nadcebulkowa. Dwie pierwsze części znajdują się na poziomie naskórka i skóry właściwej, a trzecia część łodygi włosa wraz z cebulką może sięgać aż do tkanki podskórnej. Ujście przewodu gruczołu łojowego do kanału włosowego znajduje się zwykle na granicy *infundibulum* i *isthmus*, natomiast nieco niżej, na granicy *isthmus*

i strefy nadcebulkowej (500-800 μm od powierzchni skóry) znajduje się tak zwane wybrzuszenie (*bulge*). Jest ono częścią ORS i zawiera morfologicznie nieróżnicowane komórki macierzyste keratynocytów o dużym potencjale proliferacji. Biorą one udział nie tylko w odbudowie włosa w czasie cyklu włosowego, ale także mogą odtwarzać gruczoły łojowe oraz komórki naskórka. Rejon bezpośrednio przy i pod *bulge* jest miejscem przyczepu mięśnia przywłosowego (Toll *et al.*, 2004; Ohyama, 2007; Wosicka i Cal, 2010). Cebulka włosa ukrywa jego brodawkę (*dermal papilla*), strukturę zbudowaną z fibroblastów mezodermalnego pochodzenia, które zachowują embrionalne własności i są zdolne indukować wzrost nowego włosa oraz determinować jego grubość i długość. W cebulce włosa znajduje się również grupa intensywnie dzielących się keratynocytów tworząca macierz włosa (*hair matrix*). ORS, macierz oraz włókno włosa powstają z nabłonkowych komórek macierzystych rejonu wybrzuszenia (*bulge*). Błona podstawna tworzy granicę między komórkami wywodzącymi się z ektodermy (naskórek) i mezodermy (skóra właściwa). Przez mały otwór w podstawie otoczki włosa do brodawki włosa wnikają włókna nerwowe i naczynia krwionośne (Krause i Foitzik, 2006). Związki dostarczone do mieszka włosowego, które dotrą aż do naczyń krwionośnych w brodawce mogą być wchłonięte do krążenia ogólnego. Stwarza to możliwość terapii transdermalnej drogą transfolikularną, ale również tworzy potencjalne niebezpieczeństwo, gdy dostaną się tam substancje mające działać tylko miejscowo. Skrajnym tego przykładem mogą być przypadki reakcji anafilaktycznych po zastosowaniu farb do włosów (Belton i Chira, 1997; Wosicka i Cal, 2010).

Na ludzkim ciele występują trzy rodzaje włosów:

- meszek płodowy (tzw. lanugo), powstający u płodu ok. czwartego miesiąca ciąży i zanikający przed urodzeniem lub krótko po przyjściu noworodka na świat;
- włosy meszkowe (*vellus*), cienkie i krótkie, pokrywające większość powierzchni ciała dorosłego człowieka. Ich średnica nie przekracza zwykle 30 μm , a długość 2 cm. Pozbawione są rdzenia i sięgają ok. 1 mm w głąb skóry właściwej;

- włosy terminalne, charakteryzujące się największą średnicą (powyżej 60 μm) i długością (powyżej 2 cm). Zakotwiczone są w tkance podskórnej na głębokości ponad 3 mm. Występują na skórze głowy oraz w miejscach, w których ich obecność jest uwarunkowana hormonalnie (broda, pachy, okolice narządów płciowych). Do tego rodzaju włosów zaliczane są także brwi i rzęsy (Meidan *et al.*, 2005; Vogt *et al.*, 2007; Knorr *et al.*, 2009).

Ten sam mieszek włosowy jest w stanie wytworzyć każdy rodzaj włosa, a niektóre włosy mogą znajdować się w stanie przejściowym między włosem terminalnym a meszkowym (Blume-Peytavi i Vogt, 2011). Stosunek ilościowy włosów terminalnych do meszkowych nie jest stały. Ostatnio Luther *et al.* (2012) wyznaczyli go dla trzech różnych grup etnicznych. Dla Azjatów wynosi on 1:1, dla Afrykańczyków 1,9:1, a dla przedstawicieli rasy kaukaskiej 2:1.

Istnieją zasadnicze różnice zarówno w średnicy włosów meszkowych, jak i gęstości ich występowania na ciele oraz średnicy całych mieszków włosowych. Najważniejsze z nich przedstawia tabela 1 (Otberg *et al.*, 2004).

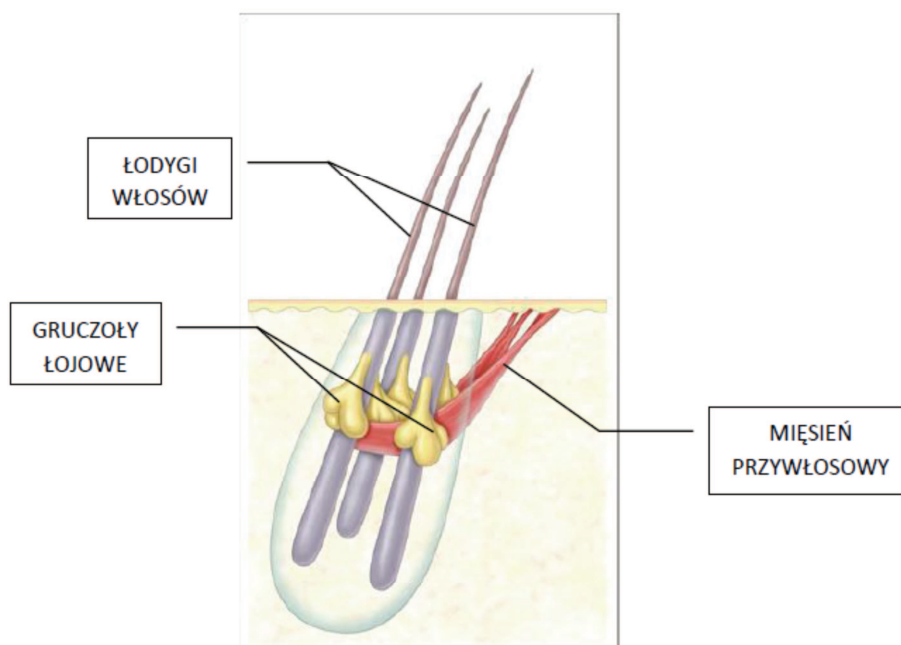
Tabela 1. Parametry charakteryzujące włosy meszkowe na różnych obszarach ciała (Otberg *et al.*, 2004; Wosicka *et al.*, 2011)

Parametr (dotyczy włosów meszkowych)	Obszar ciała wykazujący:	
	największą wartość	najmniejszą wartość
gęstość włosów	czoło	łydka
średnica włosa	łydka	czoło
średnica otworu mieszka włosowego	łydka	czoło
objętość mieszka włosowego	czoło	przedramię

Vogt *et al.* (2007) zmierzili różne parametry włosów terminalnych i meszkowych z ludzkiej skóry głowy i obszaru za uszami. Określili średnice otworu mieszków włosowych na powierzchni skóry, wykazując znaczącą różnicę między włosami terminalnymi (średnica $172 \pm 70 \mu\text{m}$), a meszkowymi (średnica $86 \pm 37 \mu\text{m}$). Jednocześnie stwierdzili, że włosy na konkretnym obszarze ciała są do

siebie podobne, czyniąc możliwym celowane dostarczanie leków w postaci mikro- lub nanocząstek do mieszków na określonych obszarach ciała.

„Jednostka folikularna”, określana również jako aparat włosowo-łojowy, to struktura składająca się z 2-4 włosów terminalnych, 1-2 włosów mieszkowych, wielu płatów gruczołów łojowych oraz mięśnia przywłosowego przyczepionego do włosów. Dawniej przypuszczano, że każda łydga włosowa ma swój mięsień przywłosowy. Jednak w obliczu coraz dokładniejszych metod obrazowania, prawdziwym wydaje się być taki model jednostki folikularnej, w której jeden mięsień przywłosowy oplata wszystkie jej włosy i jednocześnie podpira gruczoł łojowy (ryc. 3). Liczba ujść gruczołów łojowych może wynosić nawet do trzech na jeden włos. Mięsień przywłosowy umożliwia stroszenie włosa, wywołując tzw. gęsią skórę. Powoduje on również wyciśnięcie wydzieliny z gruczołu łojowego (Song *et al.*, 2007).

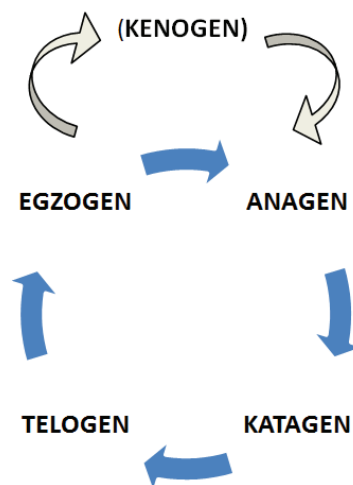


Rycina 3. Model jednostki włosowo-łojowej (Song *et al.*, 2007).

3. CYKL WŁOSOWY

Średnia szybkość wzrostu włosa wynosi między 0,3 a 0,5 mm na dzień (Krause i Foitzik, 2006; Wosicka i Cal, 2010). Wyróżnia się następujące fazy cyklu wzrostowego włosa (ryc. 4):

- anagen – faza wzrostu, podczas której nabłonkowe komórki macierzyste (zlokalizowane w wybrzuszeniu) różnicują się w przynajmniej 8 różnych linii komórkowych, dających początek wszystkim częściom mieszka włosowego. Wzrost włosa oraz proces jego pigmentacji zachodzą tylko w tej fazie;
- katagen – pierwszą jego oznaką jest zaprzestanie tworzenia melaniny w cebulce włosa. Podczas tego etapu brodawka włosa ulega zmniejszeniu i przesunięciu wyżej w kierunku wybrzuszenia. Włos traci miejsce przyczepu w skórze;
- telogen – faza pozornego spoczynku włosa. Zaczyna się w momencie, gdy brodawka starego włosa zbliża się do wybrzuszenia. Trwa ona do momentu, w którym zostanie przerwana przez sygnał bądź z zewnątrz mieszka, bądź z samego mieszka;
- egzogen - w tym etapie następują procesy prowadzące do wypadnięcia starego włosa. Ze względu na to, iż w jednym mieszkach włosowym może znajdować się kilka włosów w różnych fazach cyklu, egzogen jednego włosa często przypada na koniec anagenu drugiego (Krause i Foitzik, 2006).



Rycina 4. Cykl wzrostowy włosa.

Rebora i Guarrera (2002) wyróżnili i opisali także kenogen – fazę spoczynku, której długość i częstotliwość jest wyraźnie większa u osób dotkniętych łysieniem androgenowym. Jest ona jednak fazą fizjologiczną podczas której mieszek włosowy jest całkowicie pusty i nieaktywny, ale faza ta nie występuje zawsze w każdym cyklu, jest etapem alternatywnym. Zwykle na kilka włosów jednostki folikularnej tylko jeden znajduje się w tej fazie.

Dla większości włosów cykl trwa kilka miesięcy, natomiast w przypadku włosów na głowie – 3 do 8 lat (Meidan *et al.*, 2005). Zwykle 85-90% włosów na głowie znajduje się w fazie anagenu (trwającej 2-6 lat), 1-2% w katagenie (2 tygodnie), a ok. 10% w telogenie (2-4 miesiące) (Krause i Foitzik, 2006). Wiele związków wpływa na cykl włosa. Ważną grupą są androgeny, które oddziałują w różny sposób na różne typy włosów. Stymulują wzrost włosów na brodzie, brzuchu i klatce piersiowej, natomiast odpowiednio wrażliwe włosy terminalne na głowie pod wpływem androgenów ulegają miniaturyzacji. Jest to tzw. łysienie androgenowe, charakteryzowane przez skrócony anagen, przedłużony telogen oraz miniaturyzację włosów na głowie nawet włącznie z ich przekształceniem we włosy meszkowe. Molekularny mechanizm tego schorzenia związany jest z przekształceniem testosteronu do dihydrotestosteronu przez 5α -reduktazę. Dihydrotestosteron wiąże się z receptorami androgenowymi w mieszkach włosowych, powodując skrócenie fazy wzrostu włosa oraz zmniejszenie populacji komórek macierzy włosa. Zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn dotkniętych łysieniem androgenowym, zaobserwowano zwiększoną aktywność 5α -reduktazy typu II oraz receptorów androgenowych w przednim obszarze czaszki w porównaniu do rejonu potylicznego (Krause i Foitzik, 2006). Odwrotny mechanizm, tzn. wydłużenie fazy anagenu oraz przekształcenie włosów meszkowych w terminalne ma miejsce m.in. w hirsutyzmie (Guarrera i Rebora, 2005)

4. PRZENIKANIE DO I PRZEZ MIESZKI WŁOSOWE

Przenikanie do i przez mieszki włosowe substancji leczniczych stosowanych na skórę było przez wiele lat niedoceniane ze względu na znikomą powierzchnię, jaką zajmują mieszki w stosunku do powierzchni całego ciała. Są jednak obszary

na których gęstość włosów jest na tyle duża, aby mogły one stanowić ważną drogę ogólnoustrojowego wchłaniania substancji leczniczych. Zarówno gęstość (500-1000/cm²) jak i objętość mieszków włosowych na czole i głowie należą do największych spośród obszarów ludzkiego ciała (Otberg *et al.*, 2004). Sumaryczna powierzchnia mieszków włosowych w tych miejscach może stanowić nawet 10% powierzchni skóry tych rejonów ciała (Knorr *et al.*, 2009). Naskórek wpuklający się do mieszka włosowego (ryc. 2A) wykazuje normalne różnicowanie w górnej części *infundibulum* (*acroinfundibulum*), przypominając naskórek wraz ze *stratum corneum* na powierzchni skóry. Jednak na wysokości dolnej części *infundibulum* włosa (*infracinfundibulum*) korneocyty są już mniejsze, bardziej kruche i sprawiają wrażenie gorzej wykształconych, nie ma tam normalnej warstwy rogowej. Tworzą w ten sposób wrota do wnikania substancji z mieszka włosowego do naczyń krwionośnych gęsto otaczających mieszki na tej wysokości (Schaefer i Lademann, 2001; Meidan *et al.*, 2005; Otberg *et al.*, 2007).

Możliwość przenikania do krążenia ogólnego drogą transfolikularną została udowodniona np. przez Otberg *et al.* (2007) dla kofeiny stosowanej w postaci szamponu. Została ona wykryta we krwi w stężeniu (6,3 ng/ml) już 5 min po aplikacji na skórę klatki piersiowej. Dla porównania podobny poziom kofeiny we krwi został stwierdzony dopiero po 20 min od aplikacji na tę samą partię ciała, ale przy zablokowanych mieszkach włosowych. Mieszki zostały selektywnie zaklejone mieszaniną wosku i lakieru do paznokci (*varnish-wax mixture*), aby sprawdzić tylko przenikanie przezskórne, eliminując drogę transfolikularną.

Jednostka włosowo-łojowa może być również celem terapii miejscowej, a zarazem zbiornikiem dostarczanego tam leku. W aparacie włosowo-łojowym wyróżnia się kilka miejsc, do których możliwe i pożądane jest celowane podawanie substancji leczniczych w celach terapeutycznych. Należy do nich między innymi rejon *bulge* z komórkami macierzystymi, który jest obiektem zainteresowania terapii genowej (Meidan *et al.*, 2005). Bardzo obiecującym celem są także gruczoły łojowe, których przewody uchodzą do światła kanału włosowego, a jednocześnie są kolonizowane przez bakterie *Propionibacterium acnes*, co jest jedną z przyczyn rozwoju trądziku pospolitego. Największe gruczoły łojowe oraz ich największą gęstość można zaobserwować na twarzy i głowie (Thiboutot, 2004). Gruczoły łojowe są związane z patogenezą nie tylko trądziku pospolitego, ale również łysienia

androgenowego. Zachodzi w nich ekspresja 5 α -reduktazy, enzymu odpowiedzialnego za przekształcanie testosteronu do 5 α -dihydrotestosteronu (Krause i Foitzik, 2006). Przykłady leków, które próbowano podawać selektywnie do gruczołów łojowych to: adapalen (Rolland *et al.*, 1993), kompleks erytromycyny i cynku (Morgan *et al.*, 1993), izotretynoina (Tschan *et al.*, 1997), związek o działaniu antyandrogenowym RU58841 (Munster *et al.*, 2005). Brodawka włosa z komórkami macierzystymi jest kolejnym pożądanym celem w dostarczaniu substancji aktywnych do mieszków aby wpływać na wzrost i pigmentację włosa (Meidan *et al.*, 2005).

Sebum na powierzchni skóry stanowi pierwszą barierę do pokonania dla substancji aplikowanych zewnętrznie. Z drugiej strony, dzięki lipofilowemu charakterowi, nie stwarza ono problemu dla penetracji substancji o takich samych właściwościach (Lu *et al.*, 2009). Także charakter samej formulacji może wpływać na skuteczność wnikania jej składników do mieszków włosowych. Dowiedziono, że lepsze są do tego celu podłoża lipofilowe niż hydrofilowe (Meidan *et al.*, 2005). Część badań sugeruje, że transfolikularna droga przenikania substancji, w odróżnieniu od transepidermalnej, jest korzystna dla silnie hydrofilowych i wielkocząsteczkowych (masa molowa > 100 kDa) związków (Mitragotri, 2003). Z drugiej jednak strony wypływ sebum w kanale włosa może hamować wnikanie do mieszków, szczególnie hydrofilowych substancji (Meidan *et al.*, 2005). Zarzut ten jest odrzucany w szczególności dla nośników cząsteczkowych, których penetracja w kanale włosa jest dużo szybsza niż wypływ sebum w odwrotnym kierunku. Dowodzą tego badania, w których nanocząstki w bardzo krótkim czasie (15 min) docierają do głębszych partii mieszków (Lademann *et al.*, 2006).

Nie wszystkie mieszki włosowe są równocześnie dostępne dla penetrujących skórę nośników, czy substancji. Zależy to od fazy wzrostu włosa. Najkorzystniejsze dla dostarczania formulacji są mieszki w fazie wzrostu (anagen). Określane są w literaturze jako „otwarte” lub „aktywne” i charakteryzowane przez wzrost włosa i/lub wypływ sebum. Natomiast mieszki określane jako „zamknięte” lub „nieaktywne” dla penetracji w ich głąb nie wykazują ani wzrostu włosa, ani wypływu sebum. Różnicę we wnikaniu nośników/ substancji do tych dwóch rodzajów mieszków tłumaczy się tym, że „nieaktywne” mieszki są „zapchane” przez wyschnięte sebum oraz resztki obumarłych korneocytów, przez co nie są dostępne

dla preparatów nakładanych na skórę (Lademann *et al.*, 2008). Problemem przy badaniu przenikania do mieszków *ex vivo* może być obkurczanie się włókien elastynowych wokół mieszków po wycięciu skóry (Patzelt *et al.*, 2008). Abdulmajed *et al.* (2008) ocenili wpływ rozciągania świńskiej skóry na penetrację w niej API. Po rozciągnięciu skóry, odnotowali 20-40% większą zawartość badanej substancji w skórze, tłumacząc to nagromadzeniem w mieszkach włosowych.

4.1. Metody badania przenikania do/przez mieszki włosowe

Stosuje się różne metody w celu oceny przenikania substancji drogą transfolikularną. Porównuje się owłosione obszary ciała z nieowłosionymi u świńek morskich. Wykorzystuje się gryzonie ze skórą naturalnie owłosioną oraz te ze skórą bez włosów (Schaefer i Lademann, 2001). Barry (2002) zaproponował model skóry przypominający kanapkę, złożony z naskórka z własną warstwą rogową wzbogaconego o dodatkową warstwę rogową na powierzchni, zakrywającą ujścia mieszków włosowych. Dawniej stosowano też prostą bezpośrednią metodę do oceny penetracji substancji do mieszków – wyrywano włosy pęsetą i obserwowano pod mikroskopem fluorescencję pochodzącą od aplikowanego wcześniej *in vivo* leku (Rolland *et al.*, 1993).

Niedawno wprowadzono technikę selektywnego zamykania mieszków włosowych w ludzkiej skórze za pomocą mieszaniny wosku i lakieru (*varnish-wax mixture*), aby odróżnić przenikanie substancji drogą transepidermalną od przenikania drogą transfolikularną i móc ocenić jaki jest udział mieszków włosowych w całościowym przenikaniu przezskórnym (Desai *et al.*, 2013). Podejście to wykorzystano przy ocenie przenikania *in vivo* kofeiny (aplikowanej w formie szamponu) (Otberg *et al.*, 2007) oraz chemicznych i fizycznych filtrów przeciwsłonecznych i kurkuminy w warunkach zarówno *in vivo* jak i *in vitro* (Teichmann *et al.*, 2006).

Opracowano również metodę *differential stripping* pozwalającą oszacować ilościowo wnikanie substancji do mieszków lub zanalizować ich zawartość w warunkach *in vivo* lub *in vitro*. Metoda ta łączy technikę *tape stripping* (progresywne usuwanie warstwy rogowej naskórka za pomocą taśmy adhezyjnej) z pobraniem cyjanoakrylowej biopsji z zawartością mieszków włosowych. Najpierw za pomocą *tape stripping* usuwa się warstwę rogową naskórka (lub taką ilość warstw

pozwalającą usunąć substancję aplikowaną zewnętrznie i zgromadzoną w *stratum corneum*), następnie aplikuje się klej cyjanoakrylowy na ten sam fragment skóry, przyciska się go np. szkiełkiem, aby uległ równomiernemu rozproszaniu i pozostawia na kilka minut (5-10) w celu polimeryzacji. Po tym czasie jednym ruchem odrywa się szkiełko od skóry usuwając jednocześnie zawartość mieszków włosowych związaną przez klej (oprócz substancji aplikowanych zewnętrznie, także sebum, skeratynizowane komórki, bakterie) (Thielitz *et al.*, 2001; Ossadnik *et al.*, 2007; Lademann *et al.*, 2012).

Do bezinwazyjnej wizualizacji penetracji folikularnej *in vivo* lub *in vitro* wykorzystuje się także laserowy skanujący mikroskop konfokalny (CLSM). Ograniczeniem jest jednak głębokość wizualizacji w skórze wynosząca maksymalnie ok. 200 μm (Alvarez-Roman *et al.*, 2004; Toll *et al.*, 2004; Lademann *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2013). W podobny sposób w skórę pozwala „zajrzeć” spektroskop Ramana (Blume-Peytavi i Vogt, 2011).

5. MIKRO- I NANOCZĄSTKI JAKO NOŚNIKI LEKÓW DO MIESZKÓW WŁOSOWYCH

Nanotechnologia coraz szerzej wkracza do technologii farmaceutycznej, ponieważ pozwala pokonać ograniczenia, takie jak np. niewielka szybkość rozpuszczania substancji leczniczej w wodzie, słaba przenikalność przez błony, czy szybka degradacja leku. Nanonośniki substancji czynnych, poza zwiększeniem trwałości inkorporowanego w nich leku, pozwalają także na jego celowane dostarczanie do wybranego miejsca w organizmie i często dzięki temu na zmniejszenie dawki (Devalapally *et al.*, 2007). Korzyścią z zastosowania nanotechnologii w farmacji jest więc zwiększenie skuteczności leku z jednoczesnym zmniejszeniem jego działań ubocznych (Nystrom i Fadeel, 2012).

Definicja nanocząstki przyjęta przez Amerykański Instytut Standardów (*American National Standards Institute*) zakłada, że każdy z wymiarów nanocząstki musi mieścić się w zakresie między 1 a 100 nm (Prow *et al.*, 2011). Jednak w farmaceutycznym ujęciu nanotechnologii termin ten stosuje się praktycznie dla cząstek o wymiarach poniżej 1 μm (Keck i Muller, 2013). Baroli (2010)

w obszernym artykule przeglądowym rozgranicza pojęcia nanocząstek i nanomateriałów. Farmaceutyczne i kosmetyczne nanocząstki mają wielkość powyżej 100 nm, a nanotechnologiczne nanomateriały wielkość 1-100 nm, a nawet poniżej, co powoduje odmienne właściwości i narzuca konieczność odrębnego ich traktowania. Komisja Europejska (Komisja Europejska, 2011) wydała 18 października 2011 roku rekomendację w sprawie definicji nanomateriałów. Wynika z niej, że ustalanie sztywnego limitu wielkości nanomateriału może być ograniczające i nie jest zalecane. Komisja natomiast zaleca podawanie rozkładu wielkości wraz z odchyleniem standardowym, sugerując jednocześnie następujący limit dla definicji nanomateriałów: co najmniej 50% cząstek powinno mieć przynajmniej jeden zewnętrzny wymiar w granicach 1-100 nm. Komisja równocześnie zastrzega, że definicja ta nie może stać się ograniczająca dla przemysłu medycznego i farmaceutycznego, ze względu na jego specyfikę. Wobec braku uniwersalnej definicji nanocząstek w niniejszej pracy posłużono się określeniami: nano- i mikrocząstki.

Istnieje powszechna opinia, że możliwość przenikania nano- i mikrocząstek przez nieuszkodzoną skórę jest niewielka. Europejski Komitet Naukowy ds. Produktów Konsumenckich, oceniając prawdopodobieństwo takiego przenikania, doszedł do następujących wniosków:

- nie ma jednoznacznych dowodów na przenikanie przez nieuszkodzoną skórę cząstek o rozmiarach 20 nm i większych (takich jak fizyczne filtry przeciwsłoneczne);
- nanocząstki o wielkości co najmniej 20 nm wnikają głęboko do mieszków włosowych, ale nie zaobserwowano ich penetracji do żywej tkanki;
- nie ma wystarczających informacji na temat przenikania nano- i mikrocząstek przez skórę z naruszoną/uszkodzoną barierą, np. atopową, opaloną;
- są dowody na przenikanie do żywej tkanki (głównie do *stratum spinosum*, ale także do skóry właściwej) cząstek o wielkości mniejszej niż 10 nm (funkcjonalizowane fulereny, kropki kwantowe) (Prow *et al.*, 2011).

Jedno z ostatnich badań (Campbell *et al.*, 2012) zweryfikowało możliwość wnikania cząstek polimerowych (200, 100, 20 nm) znakowanych fluorescencyjnie w świnią skórę. Do oceny głębokości penetracji użyto laserowego mikroskopu

konfokalnego. Autorzy doszli do wniosku, że cząstki, niezależnie od średnicy, wnikały zaledwie na głębokość warstwy rogowej (2-3 μm). Podobne wyniki otrzymali dla skóry, której warstwę rogową częściowo usunięto przy pomocy *tape stripping*. Jednocześnie autorzy sugerują, że podobne cząstki mogą być użyteczne jako zbiorniki na powierzchni skóry, z których lek uwalniany jest stopniowo przez dłuższy czas.

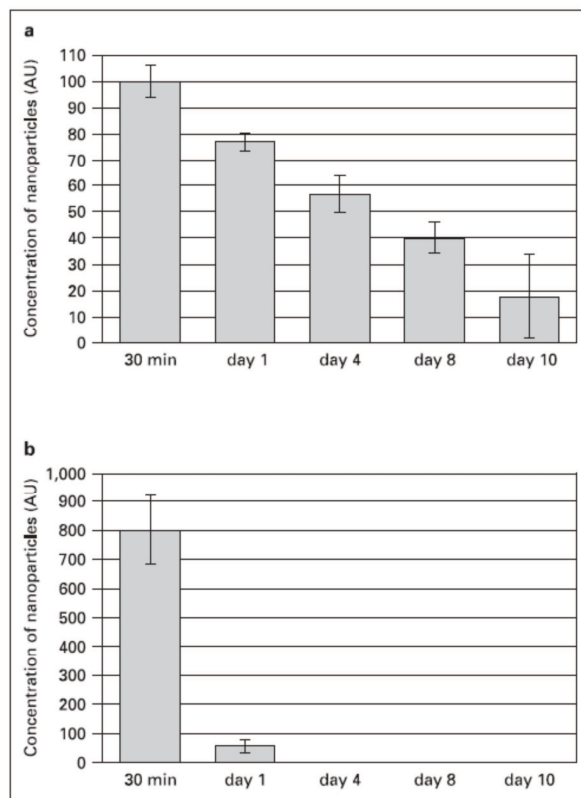
Wiele badań dowodzi, że nowe nośniki leków w formie cząstek mogą być z korzystnym skutkiem użyte do celowanego dostarczania leków do mieszków włosowych, a nawet do konkretnych typów komórek w mieszkach. Mikro- i nanocząstki, ze względu na gromadzenie się w okolicy mieszków oraz dalszą penetrację w ich głąb stanowią efektywne nośniki substancji leczniczych a także kosmetycznych (Wosicka i Cal, 2010; Rancan *et al.*, 2014). Dowiedziono, że lek inkorporowany do cząstek, dociera do mieszków włosowych w większej ilości niż lek podawany na przykład w postaci roztworu. Ważną rolę odgrywa sposób aplikacji preparatu - poparty masażem skóry znacznie zwiększa głębokość penetracji. Dodatkowo aplikacja preparatu poprzedzona lekkim złuszczeniem skóry (usunięcie zewnętrznych warstw *stratum corneum*) także polepsza wnikanie nośników z API do mieszków włosowych (Knorr *et al.*, 2009).

Możliwość wnikania mikro- i nanocząstek do jednostek foliularnych jest uzasadniona ich wielkością. Średnica mieszków włosowych w obrębie np. czoła wynosi ok. 60 μm , a średnica samej łodygi włosa ok. 15 μm (Otberg *et al.*, 2004). W doniesieniach naukowych nie ma jednak zgodności co do odpowiedniej wielkości nośników, promującej ich gromadzenie się w mieszkach. Według niektórych mikrocząstki o wielkości $> 10 \mu\text{m}$ pozostają na powierzchni skóry, natomiast cząstki o mniejszej średnicy wnikają do kanału włosowego, tym głębiej im mniejsza jest ich średnica (Knorr *et al.*, 2009). Możliwe jest więc ukierunkowane podawanie leków do jednostki włosowo-łojowej za pomocą nośników o określonej wielkości. Przykładem mogą być stałe cząstki lipidowe o wielkości ok. 500 nm, których przenikanie badano na ludzkiej skórze głowy, a ich obecność zaobserwowano w mieszkach włosowych i gruczołach łojowych nawet na głębokości 900 μm (Munster *et al.*, 2005). W tabeli 2 przedstawiono przykłady penetracji różnych nośników w mieszkach włosowych.

Tabela 2. Przykłady głębokości penetracji różnych nośników w mieszkach włosowych

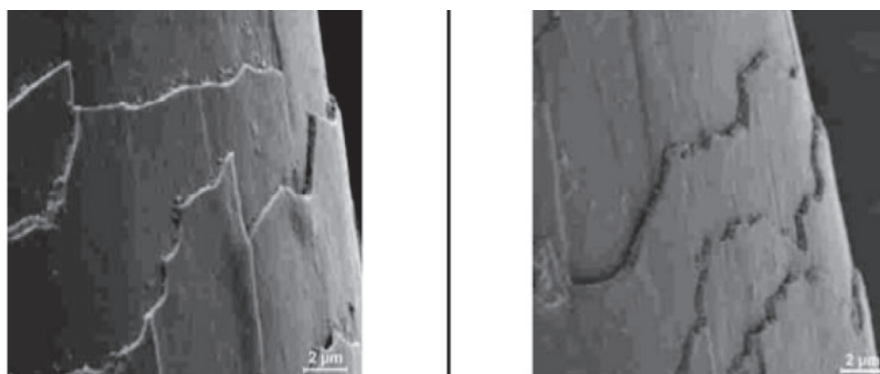
NOŚNIK	WIELKOŚĆ [μm]	MAKSYMALNA GŁĘBOKOŚĆ PENETRACJI [μm]	RODZAJ SKÓRY	MASAŻ/CSSS	ŹRÓDŁO
Mikrosfery z polistyrenu	0,75	2000-2300	ludzka	+ / +	(Toll <i>et al.</i> , 2004)
	1,50	1700-2000			
	3,00	1100-1400			
	6,00	1700-2000			
Lipidowe nanocząstki	0,484	900	ludzka (z głowy)	- / -	(Munster <i>et al.</i> , 2005)
Polimerowe nano- i mikrocząstki	1,5	gromadzenie się na powierzchni i w górnej części mieszka	ludzka	- / +	(Vogt <i>et al.</i> , 2006)
	0,75				
	0,04				
Lipidowe nanocząstki z podofilotoksyną	0,07	275	świńska	- / -	(Chen <i>et al.</i> , 2006)
Polimerowe nanocząstki (PLGA)	0,32	1500	świńska	+ / -	(Lademann <i>et al.</i> , 2007)
		300		- / -	
Nanocząstki z dwutlenku tytanu	0,02 (szerokość)	100-400	świńska	+ / -	(Lekki <i>et al.</i> , 2007)
	0,10 (długość)		ludzka		
Polimerowe nanocząstki (PLGA)	0,122	520	świńska	+ / -	(Patzelt <i>et al.</i> , 2011)
	0,230	800			
	0,300	920			
	0,470	1000			
	0,643	1100			
	0,860	680			
Nanocząstki z dwutlenku krzemu	0,300	1000	świńska	+ / -	(Patzelt <i>et al.</i> , 2011)
	0,646	1400			
	0,920	780			
	1,000	520			

Lademann *et al.* (2006) porównywali przenikanie i gromadzenie się nanocząstek polimerowych (320 nm) zawierających barwnik fluorescencyjny (5-fluoresceinamina) w warstwie rogowej i mieszkach włosowych. Badanie wykonano na skórze ludzkiej *in vivo*. Nanocząstki wykryto na powierzchni skóry oraz w dwóch pierwszych frakcjach korneocytów *stratum corneum*. Natomiast w mieszkach włosowych fluorescencję wykryto dużo głębiej - w okolicach *infundibulum*. Analizowano też ilościowo zawartość cząstek z barwnikiem w czasie 10 dni po ich aplikacji (ryc. 5). Po pierwszych 30 min zawartość nanocząstek była 8 razy większa w warstwie rogowej, niż w mieszkach. Po 24 h stężenia te się wyrównały, natomiast później cząstek nie wykryto już w *stratum corneum*. Z kolei w mieszkach włosowych cząstki były wykrywalne jeszcze po 10 dniach od aplikacji. Badanie to dowodzi, że mieszki włosowe stanowią długoterminowy zbiornik substancji aplikowanej zewnętrznie w postaci cząstek. W obrębie warstwy rogowej cząstki nie przenikają głębiej, tylko gromadzą się w dużej ilości na powierzchni, co powoduje, że bardzo szybko są eliminowane nie tylko przez złuszczenie korneocytów, ale także przez mycie skóry, czy kontakt z ubraniami (Lademann *et al.*, 2006).



Rycina 5. Zawartość nanocząstek w mieszkach włosowych (a) i warstwie rogowej (b) po 30 min, 1, 4, 8 i 10 dniach od aplikacji (Lademann *et al.*, 2006).

Ten sam autor (Lademann *et al.*, 2006) twierdzi, że łuski kutikuli włosa (ryc. 6) tworzą swoisty mechanizm zębaty w stosunku do nośników w formie cząstek, których wielkość jest porównywalna z wielkością tych łusek. Przez ruchy włosa, jakie zachodzą naturalnie w warunkach *in vivo*, nośniki są wpychane przez łuski głębiej. W warunkach *in vitro* ruchy te może symulować masaż, dlatego jest on ważnym elementem aplikacji formułacji z cząstkami, znacząco wpływającym na głębokość ich penetracji w mieszkach.



Rycina 6. Łuski kutikuli ludzkiego włosa terminalnego (lewy) i mieszkowego (prawy)
(Prow *et al.*, 2011).

Rolę mechanizmu zębatego w penetracji nośników cząsteczkowych podważają Lekki *et al.* (2007), twierdząc, że cała formułacja z cząstkami jest „wpychana” w głąb mieszka, a wielkość cząstek nie jest tu istotna. Brak zależności między głębokością penetracji, a wielkością nośnika zauważono w przypadku liposomów (Jung *et al.*, 2006).

Porównywano także ilościowo w warunkach *in vivo* zawartość leku (azotan izokonazolu) w warstwie rogowej naskórka i mieszkach po aplikacji w postaci kremu. Po 6 godzinach od zakończenia stosowania kremu (czas kuracji – 14 dni), 72% leku było zlokalizowane w warstwie rogowej, natomiast pozostałe 28% w mieszkach włosowych. Po tygodniu od zakończenia terapii, ilości leku w obu kompartmentach wyrównały się (Lademann *et al.*, 2012). Badanie to potwierdza możliwość funkcjonowania mieszków jako długoterminowego zbiornika leku. Na tle innych badań można też potwierdzić teorię, że skuteczniejsze celowanie do mieszków włosowych uzyskiwane jest przy zastosowaniu cząstek jako nośników.

Toll *et al.* (2004) na podstawie wcześniejszych wyników badań podjęli próbę stworzenia profilu penetracji mikrocząstek polimerowych do mieszków włosowych.

Wykorzystali technikę *cyanoacrylate skin surface stripping* (CSSS), polegającą na rozprowadzeniu kropli kleju cyjanoakrylowego na powierzchni szkiełka, które następnie przyciskane jest do powierzchni skóry przez co najmniej 30 sekund. Po tym czasie szkiełko jest delikatnie odrywane razem z częścią warstwy rogowej oraz zawartością mieszków włosowych (skeratynizowane resztki komórkowe, lipidy sebum, bakterie) czasem włącznie z włosem. Podczas wykonywania CSSS *in vivo*, w odróżnieniu od warunków *ex vivo*, włosy terminalne nie ulegają usunięciu, jedynie niektóre włosy meszkowe są wrywane. Tłumaczy się to luźniejszym umocowaniem włosa w mieszku po ustaniu krążenia krwi i napięcia skóry. Zaobserwowano, że mikrocząstki nie gromadzą się w pustych mieszkach, pozbawionych włókien włosowych (Toll *et al.*, 2004). Jest to dowód na potwierdzenie teorii, że łuski włosa, tworząc mechanizm zębaty, pomagają wprowadzać cząstki w głąb mieszka (Lademann *et al.*, 2006). Toll *et al.* (2004) udowodnili, że przeprowadzenie CSSS przed aplikacją formułacji z mikrocząstkami znacząco polepsza ich wnikanie do mieszków, ponieważ czyni powierzchnię skóry bardziej gładką i „otwiera” mieszki włosowe. W dalszej części badania aplikowano na skórę mikrocząstki wielkości: 0,75; 1,5; 3 i 6 μm w postaci zawiesiny. Większe cząstki (3 i 6 μm) wykazywały wyraźną tendencję do agregacji w okolicach mieszków włosowych, natomiast mniejsze rozmieszczały się równomiernie na skórze oraz penetrowały głębiej w mieszkach. Nie zaobserwowano zależności między fazą wzrostu włosa, a penetracją mikrocząstek. Potwierdzono natomiast korzystny wpływ masażu na wnikanie cząstek do mieszków (Toll *et al.*, 2004).

Patzelt *et al.* (2011) porównali w warunkach *ex vivo* przenikanie w głąb mieszków włosowych świńskiej skóry nanocząstek polimerowych i krzemionkowych. Cząstki miały wielkość od 122 nm do 1 μm , a ich aplikacja była poparta trzyminutowym masażem. Wykonano przekroje zamrożonej skóry. Zarówno w przypadku nośników polimerowych jak i krzemionkowych najgłębszą penetrację (1100-1400 μm) zaobserwowano dla cząstek wielkości pośredniej - ok. 600 nm. Autorzy tłumaczą to omówioną wcześniej hipotezą Lademanna (Lademann *et al.*, 2006) i jednocześnie wskazują, że świńskie mieszki włosowe są porównywalne pod względem wielkości do ludzkich terminalnych, stąd wyniki eksperymentu można odnieść do skóry ludzkiej. Wyniki Patzelt *et al.* (2011) nie pozostają w zgodzie z rezultatami wcześniejszych badań Alvarez-Roman *et al.* (2004) przeprowadzonych

również w warunkach *ex vivo* na świńskiej skórze. Autorzy użyli polimerowych nanocząstek o wielkości 20 i 200 nm znakowanych fluorescencyjnie. Przy pomocy konfokalnego skanującego mikroskopu laserowego zaobserwowali większe gromadzenie się mniejszych cząstek (20 nm) w mieszkach włosowych, ale nie badali głębokości penetracji (Alvarez-Roman *et al.*, 2004). Można przypuszczać, że odmienny wynik tych dwóch eksperymentów może wynikać, poza innym sposobem oceny penetracji w skórze, z innego sposobu aplikacji cząstek. Alvarez-Roman *et al.* (2004) nie zastosowali masażu, który ma udowodniony promujący wpływ na penetrację nośników w mieszkach włosowych.

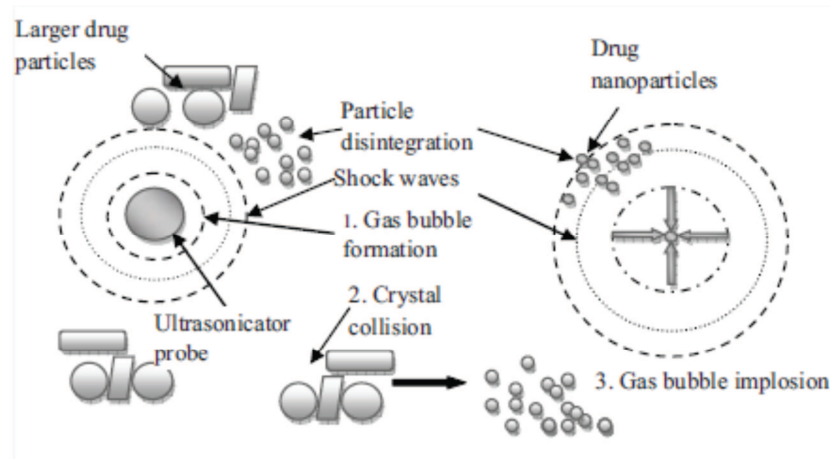
5.1. Lipidowe nano- i mikrocząstki

Cząstki lipidowe opracowano na początku lat osiemdziesiątych XX wieku jako nośnik leku alternatywny dla liposomów, mikroemulsji i cząstek polimerowych (Mehnert i Mader, 2001). Dziś znajdują szerokie zastosowanie w kosmetologii, a potencjalne możliwości wykorzystania w farmacji obejmują oprócz podania na skórę, także podanie doustne, wziewne, parenteralne, doodbytnicze oraz do oka (Pardeike *et al.*, 2009). Nie ma jeszcze w chwili obecnej zarejestrowanego żadnego preparatu farmaceutycznego do stosowania zewnętrznego opartego na nanocząstkach lipidowych, choć wiele przechodzi już badania kliniczne. Pierwszy preparat kosmetyczny z zawartością nanocząstek lipidowych - krem Nanobase firmy Astellas (Yamanouchi), został zarejestrowany na polskim rynku w 2004 roku.

Mając na uwadze budowę skóry, preparaty oparte na lipidach wydają się być najwłaściwsze do zewnętrznego stosowania. Lipidowe nano- i mikrocząstki ze względu na zawartość fizjologicznych i biodegradowalnych lipidów, wykazują powinowactwo do skóry i aplikowane zewnętrznie nie zaburzają jej funkcji (Pardeike *et al.*, 2009). Wyróżnia się obecnie dwie generacje lipidowych nanocząstek: stałe nanocząstki lipidowe (SLN) i nanostrukturalne nośniki lipidowe (NLC). Cząstki lipidowe otrzymuje się w postaci wodnej zawiesiny. Do ich powstania potrzebne są lipidy stałe w temperaturze pokojowej i ciała ludzkiego oraz emulgatory, które osadzają się na ich powierzchni zapewniając stabilność zawiesiny. Różnica między SLN a NLC dotyczy dodatkowej zawartości oleju (tłuszczu ciekłego w temperaturze pokojowej) w matrycy cząstek NLC. Cząstki SLN, zbudowane z samych stałych lipidów, mają strukturę krystaliczną, wysoce zorganizowaną,

co może stwarzać problem przy inkorporacji dużych ilości substancji czynnych. Nawet początkowy duży stopień inkorporacji, może z czasem ulegać zmniejszeniu, a substancja inkorporowana wypychaniu na zewnątrz cząstki. Przyspiesza to m.in. zmiana temperatury oraz wyparowywanie wody z preparatu. Lipidy tworzące matrycę cząstek przekształcają się wtedy w formy bardziej stabilne, o niższej energii, co wiąże się ze ścisłą organizacją ich struktury krystalicznej. W przypadku cząstek NLC, których matryca jest mieszaniną stałych lipidów i oleju, problem ścisłej organizacji struktury matrycy jest zminimalizowany. Dlatego można w tych cząstkach umieścić większe ilości substancji aktywnych z mniejszym prawdopodobieństwem ich późniejszej utraty (Muller *et al.*, 2002; Pardeike *et al.*, 2009).

Wiele metod otrzymywania nano- i mikrocząstek lipidowych jest dostępnych i opisanych w piśmiennictwie (tabela 3). Najczęściej wymieniana jest homogenizacja wysokociśnieniowa. Poza tym stosuje się też metodę emulgowania i odparowania rozpuszczalnika, podwójnego emulgowania z utworzeniem emulsji wielokrotnej oraz metodę z tworzeniem mikroemulsji (Parhi *et al.*, 2012). Rzadszą techniką jest użycie kontaktora membranowego (Charcosset *et al.*, 2005). Do mniej wymagających sprzętowo metod należy, zastosowana w opisywanej pracy, homogenizacja szybkoobrotowa z następczą sonikacją (Mehnert *et al.*, 2001; Casadei *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008; Puglia *et al.*, 2008; Abdelbary *et al.*, 2009; Hao *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2013; Aljuffali *et al.*, 2014). Niezaprzeczną jej zaletą jest brak udziału rozpuszczalników organicznych, wadą jest natomiast ewentualne zanieczyszczenie metalem z końcówki sonikatora. Zadaniem homogenizatora ultradźwiękowego jest zamiana energii elektrycznej na mechaniczną w postaci fal dźwiękowych. Powstałe fale rozchodzą się wewnątrz próbki rozbijając jej strukturę na drobne krople (zjawisko kawitacji – ryc.7).



Rycina 7. Otrzymywanie nanocząstek drogą sonikacji – proces kawitacji (Parhi *et al.*, 2012).

Tabela 3. Metody otrzymywania i charakterystyka cząstek lipidowych

Metoda otrzymywania cząstek lipidowych	Substancja aktywna	Lipidy	Emulgatory	Typ i średnica cząstek [nm] (indeks polidispersji)	Źródło
Wysokociśnieniowa homogenizacja na gorąco	koenzym Q10	palmitynian cetylu (6,5-14,5%), Miglyol 812 (0,4-1,15%)	TegoCare 450 (1,8%)	NLC: 195-238 (0,128-0,103)	(Teeranachai <i>et al.</i> , 2007b)
	izotretynoina	distearynian glicerolu (3%), lecytyna sojowa (4-8%)	Tween 80 (3-6%)	SLN: 31-50 (0,179-0,275)	(Liu <i>et al.</i> , 2007)
	oksybenzon	palmitynian cetylu (36-38%)	TegoCare 450 (5%)	SLN: 230 (0,13)	(Wissing <i>et al.</i> , 2002)
Wysokociśnieniowa homogenizacja na zimno	lizozym	Witepsol E85, alkohol cetylowy 75:25	Tween 80 lub Poloxamer 188 lub cholan sodu (3%)	SLN: 549	(Almeida <i>et al.</i> , 1997)
		Softisan 142, alkohol cetylowy 75:25		SLN: 644	
Emulgowanie i odparowanie rozpuszczalnika	tretynoina	monostearynian glicerolu (1-2%)	Tween 20, Tween 80, Epikuron 200	SLN: 317-520 (0,6-0,8)	(Shah <i>et al.</i> , 2007)
Metoda z tworzeniem mikroemulsji	celekoksyb	dilaurynian glicerolu, mono-dikaprynian glicerolu	Cremophor RH40 (23%), Transcutol (10%)	NLC: 160 (0,624)	(Joshi <i>et al.</i> , 2008)
	kurkuminoidy	kwasy stearynowy (5-12,5%), monostearynian glicerolu (4%)	Poloxamer 188 (5-15%), sodu dioktylu sulfobursztynian (5-15%)	SLN: 447-1420 (0,46-0,80)	(Tiyaboonchai <i>et al.</i> , 2007)
Kontaktor membranowy	witamina E	behenian glicerolu	Tween 20	SLN: 175	(Charcosset <i>et al.</i> , 2005)

Od ilości emulgatorów, użytych do stworzenia zawiesiny cząstek lipidowych, oraz od ich stężenia zależy wielkość i stopień polidispersji cząstek. W literaturze pojęciem nanocząstki lipidowe określa się cząstki wielkości od kilkudziesięciu nm do kilkuset nm, a nawet 1 μm (Muller *et al.*, 2002; Pardeike *et al.*, 2009). Lipidy, z których otrzymuje się cząstki lipidowe to m.in. behenian glicerolu (Compritol[®] 888 ATO), palmitynostearynian glicerolu (Precirol[®] ATO 5), monostearynian glicerolu i воск – palmitynian cetylu. Oleje używane do tworzenia matryc NLC to głównie triglicerydy o średniej długości łańcucha (np. Miglyol[®] 812 - trójgliceryd kaprylowo-kaprynowy) oraz oleje wykazujące korzystne działanie na skórę (olej z pestek czarnej porzeczki, oliwa z oliwek). Procentowa zawartość lipidów w wodnej zawieszynie waha się między 0,5%, a 40%. Im wyższy jest procent lipidów, tym bardziej gęsta zawieszyna powstaje. Zawartość emulgatorów natomiast wynosi zwykle 0,5-5%. Do produkcji cząstek przeznaczonych do stosowania na skórę używa się następujących emulgatorów: Poloxamer 188 (kopolimer blokowy tlenu etylenu i tlenu propylenu), Polisorbat 80 (monooleinian polioksyetylenosorbitolu), lecytyna, Tyloxapol (polimer 4-(1,1,3,3-tetrametylobutylo)fenolu z tlenkiem etylenu i formaldehydem), TegoCare[®] 450 (distearynian poliglicerylo-3 metyloglukozy), Miranol[®] Ultra C32 (kokoamfodioctan disodowy), estry kwasów tłuszczowych i sacharozy (Muller *et al.*, 2007; Schafer-Korting *et al.*, 2007; Pardeike *et al.*, 2009). W tabeli 4 przedstawiono przykłady cząstek lipidowych otrzymanych metodą homogenizacji szybkoobrotowej i ultradźwiękowej z różnych lipidów i przy użyciu różnych emulgatorów.

Lipidowe nanocząstki zastosowane na skórę tworzą nieciągłą warstwę okluzyjną, hamującą parowanie wody z górnych warstw naskórka. To z kolei, poza wzrostem nawilżenia, może zwiększać penetrację substancji aktywnych w głębsze warstwy skóry dzięki rozluźnieniu ścisłego upakowania korneocytów. Nanocząstki tworzą 15 razy bardziej skuteczną okluzję, niż cząstki wielkości kilku-kilkudziesięciu μm (Schafer-Korting *et al.*, 2007). Zwiększenie penetracji skórnej dzięki inkorporowaniu substancji czynnej do lipidowych nośników stwierdzono np. dla koenzymu Q10 (Muller *et al.*, 2002), retinolu (Jenning *et al.*, 2000a) i minoksydyli (Aljuffali *et al.*, 2014).

Tabela 4. Przykłady i charakterystyka cząstek lipidowych otrzymanych metodą homogenizacji szybkoobrotowej i ultradźwiękowej

Matryca lipidowa	Emulgatory	Metoda otrzymania	Średnica cząstek [nm] ± SD oraz ich typ	PdI	Źródło
distearynian glicerolu (10%)	Poloxamer 188 (2,5%) cholan sodu (1%)	homogenizacja szybkoobrotowa + sonikacja w 70°C	SLN: 131 ± 2	0,267 ± 0,005	(Casadei <i>et al.</i> , 2006)
palmitynian cetylu (10%) (SLN)	Tween 60 (2%)	homogenizacja szybkoobrotowa + sonikacja	SLN: 164,7 ± 15,7	0,209 ± 0,035	(Neves <i>et al.</i> , 2013)
palmitynian cetylu (7%) + Miglyol (3%) (NLC)			NLC: 168,5 ± 15,3	0,199 ± 0,035	
behenian glicerolu + Miglyol	Poloxamer 188 (1,35%)	homogenizacja szybkoobrotowa + sonikacja w ≈ 80°C	NLC: 335,1-380,0	-	(Puglia <i>et al.</i> , 2008)
behenian glicerolu: 4,75% 9,5%	Poloxamer 188: 2,5% 5%	homogenizacja szybkoobrotowa + sonikacja	SLN (4,75% + 2,5%): 1284 SLN (9,5% + 2,5%): 1717 SLN (4,75% + 5%): 1080 SLN (9,5% + 5%): 480	-	(Abdelbary <i>et al.</i> , 2009)
distearynian glicerolu (10%) (SLN)	Poloxamer 188 (3%) + monoglicerydy kwasu palmitynowego (Myverol 18-04K) (0,6%)	homogenizacja szybkoobrotowa + sonikacja	SLN: 302,9 ± 4,3	0,25 ± 0,03	(Hsu <i>et al.</i> , 2011)
distearynian glicerolu (5%) + skwalen (5%) (NLC)			NLC: 192,1 ± 1,9	0,21 ± 0,01	
distearynian glicerolu (12%) (SLN)	Poloxamer 188 (2,4%) + monoglicerydy kwasu palmitynowego (Myverol 18-04K) (0,2%)	homogenizacja szybkoobrotowa + sonikacja w 35°C	SLN: 296,6 ± 49,5	-	(Fang <i>et al.</i> , 2008)
distearynian glicerolu (6%) + skwalen (6%) (NLC)			NLC: 210,2 ± 14,3		

Mechanizm zwiększonej penetracji i skórnej akumulacji cząstek tłumaczy się:

- okluzją, zwiększaną przez silną adhezję cząstek do powierzchni skóry. Im mniejsza jest wielkość cząstek, tym silniejszą adhezję wykazują. Poza tym nanocząstki gromadzą się na dłuższy czas w załamaniach skóry między korneocytami, co powoduje skuteczniejszą okluzję;
- przekształceniami w strukturze lipidowych matryc. Po aplikacji na skórę zawiesiny cząstek lipidowych następuje parowanie wody z formułacji, co przyspiesza przekształcenie lipidów w formy krystaliczne. Powoduje to częściowy wyrzut (*burst release*) zainkorporowanej substancji czynnej z cząstek, skutkując jej wysokim stężeniem bezpośrednio na powierzchni skóry;
- wpływem surfaktantów użytych do tworzenia cząstek (Schafer-Korting *et al.*, 2007).

Substancja aktywna może być zawarta w lipidowej matrycy cząstek w formie rozpuszczonej lub rozproszonej. Zależy to od jej rozpuszczalności w tłuszczach. Najłatwiejsze do inkorporacji są substancje lipofilowe. Muller *et al.* (2002) wyróżnili trzy teoretyczne modele inkorporowania substancji aktywnej do SLN, tj.:

- homogenicznej matrycy,
- otoczki bogatej w substancję aktywną,
- rdzenia bogatego w substancję aktywną.

W pierwszym modelu, silnie lipofilowa substancja aktywna jest równomiernie rozproszona w lipidowej matrycy. Drugi zakłada, że zewnętrzna warstwa cząstki jest bogatsza w substancję czynną. Ten typ otrzymuje się podczas ochładzania nanoemulsji, przygotowanej w procesie homogenizacji na gorąco. Zachodzi wtedy rozdzielenie związku czynnego między fazę lipidową, a wodną. Lipidy zestalone w pierwszej kolejności, tworzą rdzeń cząstki pozbawiony związku aktywnego. Ten ostatni, krystalizując, tworzy otoczkę. Taka postać nośnika umożliwia szybkie początkowe uwalnianie API. Model, w którym rdzeń nośnika jest bogatszy w składnik czynny, powstaje w sytuacji odwrotnej - kiedy ten składnik zestala się jako pierwszy. W praktyce, oprócz wyżej opisanych, istnieją jeszcze modele mieszane. Istnieje także możliwość wiązania się związku czynnego z powierzchnią cząstki. Sposób inkorporowania substancji czynnej wpływa na jej

późniejsze uwalnianie (Muller *et al.*, 2002; Pardeike *et al.*, 2009). W tabeli 5 przedstawiono przykłady różnych cząstek lipidowych otrzymanych tą samą metodą wraz ze stopniem inkorporacji API (wyrażonym jako % całkowitej ilości użytego API).

Tabela 5. Przykłady cząstek lipidowych otrzymanych tą samą metodą (homogenizacja szybkobrotowa i ultradźwiękowa) wraz z procentowym stopniem inkorporacji API

Matryca lipidowa	Emulgatory	API	Średnica cząstek [nm] ± SD oraz ich typ	PdI	% inkorporacji	Źródło
distearynian glicerolu (10%)	Poloxamer 188 (2,5%) + cholan sodu (1%)	ibuprofen	SLN: 131 ± 2	0,267 ± 0,005	40 ± 3	(Casadei <i>et al.</i> , 2006)
palmitynian cetylu (10%) (SLN)	Tween 60 (2%)	resweratrol	SLN: 164,7 ± 15,7	0,209 ± 0,035	88,5 ± 5,1	(Neves <i>et al.</i> , 2013)
palmitynian cetylu (7%) + Miglyol (3%) (NLC)			NLC: 168,5 ± 15,3	0,199 ± 0,035	75,3 ± 6,4	
palmitynian cetylu (4%) + skwalen (4%)	Poloxamer 188 (3,5%) + sojowa fosfatydylocholina (1%)	difencypron	NLC: 207,8 ± 1,3	-	76,9 ± 1,0	(Lin <i>et al.</i> , 2013)
behenian glicerolu (SLN)	Poloxamer 188 (1,35%)	indometacyna	SLN: 215,6	-	76	(Castelli <i>et al.</i> , 2005)
behenian glicerolu, miglyol (NLC)			NLC: 80,4; 270,2		84,3	
behenian glicerolu: 4,75% (SLN ₁ ; SLN ₃) 9,5% (SLN ₂ ; SLN ₄)	Poloxamer 188: 2,5% (SLN ₁ ; SLN ₂) 5% (SLN ₃ ; SLN ₄)	diazepam	SLN ₁ : 1284 SLN ₂ : 1717 SLN ₃ : 1080 SLN ₄ : 480	-	SLN₁: 34,80 SLN₂: 67,02 SLN₃: 67,04 SLN₄: 22,13	(Abdelbary <i>et al.</i> , 2009)

Inkorporacja do nośników lipidowych chroni substancje aktywne przed degradacją. Zostało to potwierdzone na przykład dla palmitynianu askorbylu (Teeranachaideekul *et al.*, 2007a), dla retinoidów (Liu *et al.*, 2007), dla koenzymu Q10 (Teeranachaideekul *et al.*, 2007b) i dla kurkuminoidów (Tiyaboonthai *et al.*, 2007). Shah *et al.* (2007) dowiedli, że umieszczenie tretynoiny w SLN znacznie zmniejszyło jej fotodegradację. Inne badania wykazały, że po przechowywaniu przez 3 miesiące w 40°C wodnej zawiesiny nanocząstek z 0,5% retinolu, 60% leku pozostało w stanie niezmienionym. Dla porównania w emulsji o/w przechowywanej w takich samych warunkach i czasie, pozostało tylko 40% retinolu (Muller *et al.*, 2007).

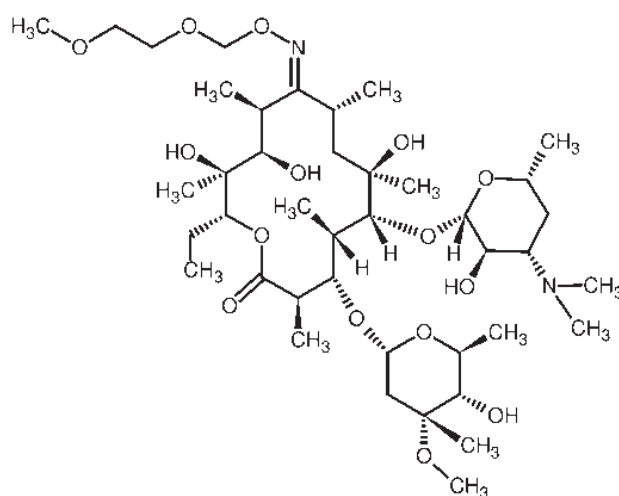
W większości przypadków uwalnianie związków aktywnych z cząstek lipidowych odbywa się w sposób przedłużony i nie obserwuje się przezskórnej penetracji do krwioobiegu. Jest to szczególnie ważne w przypadku substancji, które zastosowane na skórę w wysokich stężeniach wywołują działanie niepożądane, a powinny być stosowane przez długi czas bez ryzyka wchłaniania do krwioobiegu (Jenning *et al.*, 2000b). Chen *et al.* (2006) otrzymali nanocząstki lipidowe (73 nm) z podofilotoksyną, która stosowana jest miejscowo jako lek antymitotyczny. Ze względu na jej niekorzystne działanie po wchłonięciu do krwioobiegu, bardzo istotne jest zlokalizowanie jej aktywności tylko w naskórku. Jednak dostępne dotychczas preparaty podofilotoksyny – krem, roztwór – powodują nie tylko podrażnienie skóry, ale także w rezultacie ich stosowania obserwuje się wchłanianie systemowe. Chen *et al.* (2006) badali przenikanie cząstek lipidowych z podofilotoksyną oraz tego samego leku w roztworze etanolowym przez świnią skórę *ex vivo* używając komór Franza. Wykazali, że w ciągu 8 godzin od zastosowania leku w postaci inkorporowanej w nośniki, nie przenika on przez świnią skórę, tylko gromadzi się w naskórku. Natomiast lek w postaci roztworu był wykryty w płynie akceptorowym, co świadczy o możliwości jego przenikania do krwi *in vivo*. Liczbowo nanocząstki spowodowały 3,5 razy większe gromadzenie się podofilotoksyny w skórze, niż jej 0,15% etanolowy roztwór. Dzięki zdjęciom fluorescencyjnym przekrojów skóry, uwidoczniono gromadzenie się leku w warstwie rogowej naskórka oraz mieszkach włosowych (Chen *et al.*, 2006).

Munster *et al.* (2005) podjęli próbę opracowania stałych cząstek lipidowych z prolekiem wykazującym potencjalne działanie przeciwtrądzikowe oraz

antyandrogenowe. Wykazali, że cząstki wielkości < 500 nm nie przenikają ani przez świńską skórę, ani przez rekonstruowany ludzki naskórek (*Skin-Ethic*[®]) do płynu akceptorowego w ciągu 6 h. Takie same cząstki znakowane Czerwienią Nilu wykorzystano do sprawdzenia, czy docierają one do mieszków włosowych. Aplikowano je na ludzką skórę z głowy *ex vivo* i po 24-godzinnej inkubacji wykonano przekroje, które analizowano z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej. Dowiedziono w ten sposób, że cząstki wnikają selektywnie do mieszków włosowych, gromadząc się tam, a maksymalna głębokość na jakiej dostrzegalna była fluorescencja to $900 \mu\text{m}$ (Munster *et al.*, 2005).

6. ROKSYTROMYCYNA

Roksytromycyna ($\text{C}_{41}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{O}_{15}$), antybiotyk z grupy półsyntetycznych makrolidów, jest 10-oksynowo-eterową pochodną erytromycyny o zwiększonej odporności na działanie kwasów i lepszych parametrach farmakokinetycznych. Jej wzór strukturalny przedstawia rycina 8. Masa molowa ROX wynosi $837,0465$ g/mol, a logP równy $3,1$ (PubChem CID: 5480431) świadczy o lipofilowym charakterze leku. Monografia ROX, oprócz FP IX, znajduje się w aktualnym wydaniu Ph.Eur. oraz Japońskiej. ROX nie jest natomiast zarejestrowana w Stanach Zjednoczonych, nie jest więc uwzględniona w USP.



Rycina 8. Wzór strukturalny ROX.

Według FP IX tom II (Farmakopea Polska, 2011): roksytromycyna to półsyntetyczny produkt pochodzący z produktu fermentacji; biały lub prawie biały, krystaliczny proszek; substancja bardzo trudno rozpuszczalna w wodzie, trudno rozpuszczalna w rozcieńczonym kwasie solnym, łatwo rozpuszczalna w acetonie, etanolu (96%) i chlorku metylenu; wykazuje polimorfizm.

ROX, tak jak wszystkie antybiotyki makrolidowe, działa bakteriostatycznie na drobnoustroje tlenowe (np. streptokoki) oraz na Gram-dodatnie beztlenowce (np. *Propionibacterium*) i niektóre Gram-ujemne (*Legionella*, *Bordetella*, *Haemophilus*). Dodatkowo w wyższych stężeniach działa częściowo bakteriobójczo (Mutschler *et al.*, 2010). Mechanizm jej działania polega na blokowaniu biosyntezy białek bakteryjnych. Stosowana jest z dobrym skutkiem w doustnej terapii trądziku (Akamatsu *et al.*, 2002). Roksytromycyna, oprócz aktywności typowo przeciwbakteryjnej wobec *Propionibacterium acnes*, hamuje także wytwarzanie przez bakterie związków prozapalnych (lipazy bakteryjne, czynnik chemotaktyczny neutrofilów), które również przyczyniają się do rozwoju trądziku. Dzięki temu ROX charakteryzuje się bardzo silnym działaniem przeciwzapalnym (Akamatsu *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2009). Istnieją doniesienia o hamowaniu przez nią powstawania wolnych rodników w neutrofilach oraz hamowaniu apoptozy keratynocytów (Takahashi *et al.*, 2004).

Za podstawowe przyczyny rozwoju trądziku pospolitego uważa się nadmierną produkcję sebum, zwiększoną kolonizację ujścia przewodu gruczołu łojowego przez bakterie *Propionibacterium acnes*, nadmierną keratynizację tego przewodu oraz stan zapalny. Do powstania stanu zapalnego w głównej mierze przyczyniają się wspomniane bakterie, a dokładniej wolne kwasy tłuszczowe, które powstają w wyniku rozkładu triglicerydów sebum przez lipazy bakteryjne (Downie *et al.*, 2004; Zouboulis, 2004; Wang i Zane, 2008). Thielitz *et al.* (2001) przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej analizowali lipidy pobrane *in vivo* z mieszków włosowych pacjentów dotkniętych trądzikiem. Udowodnili, że zewnętrzne stosowanie antybiotyku (klindamycyna) znacząco zmniejsza zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w mieszkach, co potwierdza, że bakterie tam obecne odpowiadają za obecność wolnych kwasów tłuszczowych.

Roksytromycyna, ze względu na swoje działanie przeciwbakteryjne wobec *P. acnes* oraz aktywność przeciwzapalną wydaje się być właściwym antybiotykiem do miejscowej terapii trądziku.

W badaniach *in vitro* na kulturach ludzkich i mysich włosów w fazie anagenu zaobserwowano, że ROX hamuje przejście włosa w fazę katagenu dzięki inhibicji apoptozy keratynocytów i w efekcie powoduje zwiększenie długości włosa. W łysieniu androgenowym dihydrotestosteron powoduje apoptozę w odpowiednio wrażliwych komórkach brodawki włosa, przyspieszając jego przejście z fazy anagenu do katagenu. ROX, ze względu między innymi na antyapoptotyczne działanie, może hamować ten proces. W badaniach *in vivo* po miejscowym stosowaniu 0,5% lotionu z ROX przez 6 miesięcy, zanotowano przywrócenie wzrostu włosów u ponad połowy pacjentów dotkniętych łysieniem androgenowym. Zauważono także pogrubienie włosów z wyjściowej wartości $55,9 \mu\text{m} \pm 3,47$ do $86,8 \mu\text{m} \pm 10,5$. Nie odnotowano przy tym miejscowych ani ogólnoustrojowych działań niepożądanych. Przypuszcza się, że korzystne działanie ROX w łysieniu androgenowym może być łącznym efektem jej działania antyapoptotycznego oraz przeciwzapalnego (Ito *et al.*, 2009).

Roksytromycyna jako lek należący do IV klasy systemu BCS charakteryzuje się zarówno słabą rozpuszczalnością w wodzie, jak i słabą przenikalnością przez błony biologiczne (Biradar *et al.*, 2006). Cząstki lipidowe jako nośniki leku wydają się być odpowiednią matrycą do inkorporowania ROX ze względu na jej lipofilowy charakter. Z dostępnego piśmiennictwa wynika, że nie inkorporowano jeszcze ROX do mikro- i nanocząstek lipidowych. Nie badano także jej przenikania do skóry i przez skórę, w tym do mieszków włosowych, po podaniu miejscowym. Nie ma jeszcze zarejestrowanego na świecie żadnego preparatu z tym antybiotykiem do stosowania zewnętrznego.

7. TOKSYCZNOŚĆ LIPIDOWYCH NANO- I MIKROCZĄSTEK

Przy rozpatrywaniu możliwości przenikania nanomateriałów przez nieuszkodzoną skórę istnieje konieczność rozgraniczenia dwóch pojęć, co zostało zaproponowane przez Baroli (2010). Nanocząstki w ujęciu farmaceutycznym

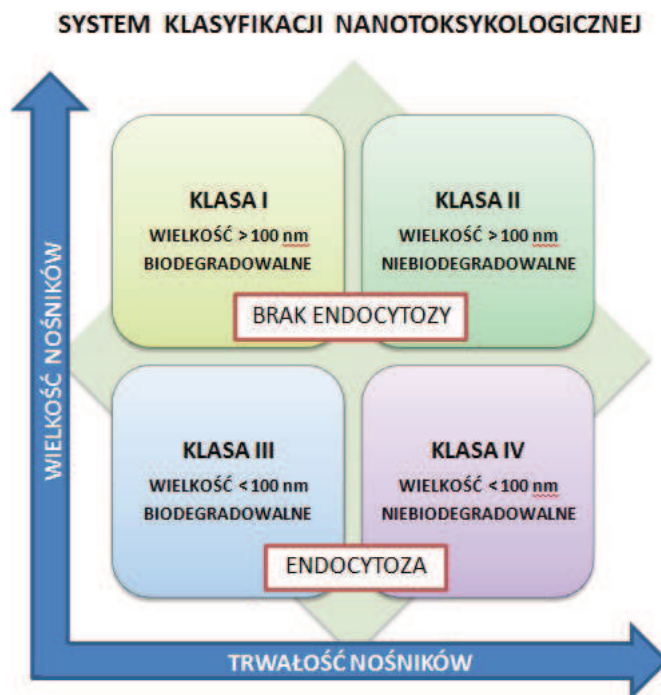
i kosmetycznym mają wielkość powyżej 100 nm i przez większość naukowców są uważane za bezpieczne, tzn. nie przenikają przez nienaruszoną skórę, ewentualnie wnikają i gromadzą się w mieszkach włosowych i zmarszczkach skórnych. Natomiast nanomateriały (wielkość 1-100 nm lub mniej) mogą zachowywać się zupełnie inaczej, wnikać w głąb nieuszkodzonej skóry i dostawać się do krążenia ogólnego (Baroli, 2010).

Toksyczność nano- i mikrocząstek aplikowanych na skórę można rozpatrywać w dwóch aspektach: toksyczności samych nośników oraz inkorporowanych do nich leków (Wosicka i Cal, 2010). Cząstki lipidowe zbudowane są z biodegradowalnych lipidów, które ulegają enzymatycznemu rozkładowi do związków występujących naturalnie w organizmie ludzkim, dlatego są wygodnym nośnikiem API (Olbrich i Muller, 1999). Jednak nie wszyscy są zgodni, że biodegradowalność nośnika jest niezbędna przy aplikacji do mieszków włosowych, ponieważ cząstki są po pewnym czasie eliminowane przez wypływ sebum, wzrost i wypadanie włosów oraz złuszczenie naskórka (Morgen *et al.*, 2011). Poza stopniem degradacji, kluczowa dla toksyczności cząstek jest ich wielkość. Uważa się, że cząstki większe niż 40 nm nie są w stanie dostać się do żywych komórek naskórka (Vogt *et al.*, 2006). Jednak wciąż brakuje badań obrazujących odległe skutki stosowania nośników do mieszków włosowych. Drugi aspekt toksyczności dotyczy inkorporowanej do nośników substancji aktywnej, która w zależności od właściwości fizykochemicznych oraz rodzaju nośnika może dostać się do krwioobiegu. Jeżeli jest to niezamierzone lub niekontrolowane, może stanowić poważny problem, a przykładem takiego efektu toksycznego mogą być reakcje anafilaktyczne po zastosowaniu farb do włosów (Wosicka i Cal, 2010).

Nośniki lipidowe w większości przypadków powodują lokalizację API w skórze i nie promują jego przenikania do krwi. W badaniach *in vitro* na kulturach komórkowych (makrofagi, keratynocyty i mysie fibroblasty) cząstki lipidowe (< 500 nm) z kwasu stearynowego wykazywały toksyczność w stosunku do wszystkich linii komórkowych. Półsyntetyczne glicerydy okazały się dużo mniej toksyczne. Surfaktanty użyte do wytworzenia nośników lipidowych mają również znaczenie dla ich toksyczności. Najmniejsze właściwości toksyczne wykazują surfaktanty niejonowe (Weyenberg *et al.*, 2007).

Badano wchłanianie/wychwytywanie SLN z resweratrolem (< 180 nm) przez ludzkie keratynocyty i wykazano, że cząstki łatwo przechodzą przez błonę komórkową do cytoplazmy. Gromadzą się w okolicy okołojądrowej, jednak nie wywołują efektów toksycznych: nie wpływają na morfologię komórek, ich aktywność metaboliczną, ani cykl życiowy. Wykazano większą aktywność cytostatyczną resweratrolu inkorporowanego do SLN niż wolnego (Teskac i Kristl, 2010).

Ostatnio zaproponowano system klasyfikacji nanotoksykologicznej oparty o 2 podstawowe kryteria: wielkość oraz biodegradowalność nośników (Keck i Muller, 2013). Za granicę wielkości cząstek, dzielącą je na mniej i bardziej niebezpieczne, uznano 100 nm. Wzięto przy tym pod uwagę możliwość endocytozy cząstek mniejszych niż 100 nm przez wszystkie rodzaje komórek w organizmie. Podczas gdy cząstki o wielkości przekraczającej ten limit (> 100 nm) mogą się dostać do komórek tylko na drodze fagocytozy przez makrofagi, więc ulegają internalizacji przez wąską populację komórek. W proponowanym systemie wyróżniono 4 klasy nanonośników (ryc. 9). Pierwsza, o najmniejszym stopniu potencjalnej toksyczności, to cząstki biodegradowalne o rozmiarach 100-1000 nm. Autorzy zaliczają tu nanoemulsje, liposomy oraz lipidowe nanocząstki (> 100 nm). Druga i trzecia klasa to nośniki o średniej toksyczności. Do drugiej zaliczono nośniki niebiodegradowalne i większe niż 100 nm, a do trzeciej – cząstki biodegradowalne, ale mniejsze niż 100 nm. Klasa czwarta, o największym ryzyku toksyczności zawiera nośniki mniejsze niż 100 nm i nie ulegające biodegradacji, np. nanocząstki dwutlenku tytanu oraz złota. Poza uwzględnianiem rozmiarów oraz materiału, z jakiego zbudowane są nanonośniki, autorzy sugerują również branie pod uwagę drogi ich podania do organizmu. Podanie na skórę, jako najmniej inwazyjne, uważane jest za najbezpieczniejsze z punktu widzenia nanotoksykologii. Według autorów, zaproponowany system powinien być jeszcze uzupełniony o informacje na temat biokompatybilności nanocząstek, czyli ich zdolności do wywoływania w organizmie reakcji immunologicznej. Zależy ona m.in. od fizykochemicznych właściwości powierzchni nośników. Uznawane są one za biokompatybilne, jeśli nie adsorbują się na ich powierzchni endogenne proteiny (np. opsoniny) (Keck i Muller, 2013).



Rycina 9. Propozycja systemu klasyfikacji nanotoksykologicznej (Keck i Muller, 2013), rycina zmodyfikowana.

III CEL PRACY

Nano- i mikrocząstki lipidowe stwarzają wiele możliwości celowanego dostarczania substancji leczniczych. Ze względu na lipidowy charakter są teoretycznie idealnymi nośnikami dla leków przeznaczonych do stosowania na skórę. Celem pracy było udowodnienie, że cząstki lipidowe są też odpowiednimi, skutecznymi i selektywnymi nośnikami leków do mieszków włosowych skóry ludzkiej. Praca miała też wykazać możliwość i zasadność inkorporacji roksytromycyny do nośników lipidowych i zastosowania takiego systemu dostarczania leku w potencjalnej terapii miejscowej.

Cel pracy realizowany był w następujących etapach:

- Opracowanie prostej i powtarzalnej metody otrzymywania cząstek lipidowych z ROX.
- Wybór optymalnego składu formułacji zapewniającego odpowiednią wielkość cząstek oraz procent inkorporacji ROX.
- Opracowanie i walidacja metody oznaczania ROX techniką HPLC.
- Scharakteryzowanie wybranej formułacji pod kątem uwalniania ROX, aktywności przeciw *Propionibacterium acnes* oraz potencjału drażniącego.
- Obrazowanie wnikania i rozmieszczenia cząstek lipidowych w skórze ludzkiej *ex vivo*.
- Oznaczenie ilości ROX obecnej w mieszkach włosowych po aplikacji w postaci opracowanej formułacji w warunkach *in vivo*.

Realizacja wszystkich etapów była możliwa dzięki przeprowadzeniu badań w: Katedrze i Zakładzie Technologii Postaci Leku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej oraz Katedrze Biofarmacji i Farmakodynamiki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, a także we współpracy z Centrum Naukowo-Badawczym Dr Irena Eris i Katedrą Technologii Farmaceutycznej Uniwersytetu w Lublanie (Słowenia).

Cel badań miał też aspekt innowacyjny, jako że wymieniony antybiotyk nie jest dostępny nigdzie na świecie w postaci preparatu farmaceutycznego

do stosowania zewnętrznego (w Japonii były jedynie prowadzone badania kliniczne lotionu z 0,5% roksytromycyny). Zewnętrzne stosowanie ROX mogłoby umożliwić zastąpienie doustnego przyjmowania tego antybiotyku w leczeniu trądziku pospolitego. W terapii łysienia androgenowego natomiast mogłoby stworzyć cenną alternatywę dla minoksydylu - jedyne, jak dotychczas, leku do stosowania miejscowego zaakceptowanego przez FDA jako skutecznie przeciwdziałającego łysieniu androgenowemu u mężczyzn i kobiet.

IV CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. ODCZYNNIKI

- Acetonitryl (HPLC Isocratic grade) - J.T. Baker (obecnie: Avantor Performance Materials, Center Valley, USA)
- Behenian glicerolu (Compritol ATO 888) - Gattefosse (Gennevilliers, Francja)
- Ester heksylowy nadchloranu rodaminy B - Invitrogen (Carlsbad, USA)
- Metanol (HPLC Isocratic grade) - J.T. Baker (obecnie: Avantor Performance Materials, Center Valley, USA)
- Olej z pestek winogron - Monini (Spoleto, Włochy)
- Poloxamer 188 (Lutrol F68; Pluronic PF68) - BASF SE (Ludwigshafen, Niemcy)
- Potasu diwodorofosforan (cz.d.a.) - POCh (Gliwice, Polska) (obecnie: Avantor Performance Materials, Center Valley, USA)
- Roksytromycyna (Roxithromycin Ph.Eur., MW = 837 g/mol) - Koprana Limited (Bombaj, Indie)
- Skwalen - Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- Sodu wodorotlenek (cz.d.a.) - POCh (Gliwice, Polska) (obecnie: Avantor Performance Materials, Center Valley, USA)
- Woda ultraczysta - Millipore® Simplicity UV Water Purification System; Merck Millipore (Billerica, USA).

2. SPRZĘT

- Aparat do oczyszczania wody Millipore® Simplicity UV Water Purification System (Merck Millipore, Billerica, USA)
- Aparat do pomiaru wielkości cząstek oraz potencjału zeta - Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Wielka Brytania)

- Chromatograf cieczowy HPLC z pompą LC-10AT VP, detektorem UV-VIS SPD-10A VP (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonia)
- Chromatograf cieczowy 1260 HPLC z detektorem UV, analizatorem typu potrójny kwadrupol 6430 TripleQuad-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- Homogenizator ultradźwiękowy (sonikator) VCX130 z końcówką o średnicy 13 mm (Sonics & Materials Inc., Newtown, USA)
- Kalorymetr DSC 820 (Mettler Toledo, Greifensee, Szwajcaria)
- Kolumna chromatograficzna Hyperchrome Prontosil 120-5-C18H o wymiarach 150 x 4,6 mm, 5 μ m (BISCHOFF Chromatography, Leonberg, Niemcy)
- Kolumna chromatograficzna POROSHEL 120 EC-C18 o wymiarach 3 x 50 mm, 2,7 μ m (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- Kriotom Cryotome E (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)
- Laserowy analizator wielkości cząstek Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Malvern, Wielka Brytania)
- Masażer Atom Massager (HoMedics Group, Tonbridge, Wielka Brytania)
- Miernik temperatury Testo 110 z wodoszczelną sondą zanurzeniowo-penetracyjną (Testo Sp. z o.o., Pruszków, Polska)
- Mikroskop fluorescencyjny Nikon Eclipse 50i z kamerą Nikon Digital Sight DS-5MC, lampą rtęciową Nikon C-SHG1 i oprogramowaniem Nis-Elements BR 3.0. (Nikon Corporation, Tokio, Japonia)
- Mikroskop sił atomowych Agilent 5500 (Agilent, Santa Clara, USA)
- pH-metr Schott (Schott AG, Moguncja, Niemcy)
- Prekolumna chromatograficzna Hyperchrome Prontosil 120-5-C18H o wymiarach 10 x 4,0 mm, 5 μ m (BISCHOFF Chromatography, Leonberg, Niemcy)
- Skaningowy mikroskop elektronowy Zeiss Evo 40 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Niemcy)
- Sondy z azotku krzemu PPP-FM, $k = 2,8$ N/m (Nanosensors, Neuchatel, Szwajcaria)
- Spektrofotometr UV-VIS Thermo Evolution 300 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)

- Szafa klimatyczna (Binder GmbH, Tuttlingen, Niemcy)
- Szybkoobrotowe mieszadło mechaniczne Polytron PT 1600E (Kinematica AG, Lucerna, Szwajcaria)
- Termostat kolumny - Eppendorf TC-50 (Eppendorf, Hamburg, Niemcy)
- Transmisyjny mikroskop elektronowy JEM-1200 EX II (JEOL, Tokio, Japonia)
- Wytrząsarka IKA KS 130 control (IKA[®]-Werke GmbH, Staufen, Niemcy)

3. MATERIAŁY

- Adaptery dializacyjne AD4 (Sotax, Allschwil, Szwajcaria)
- Filtry membranowe PORAFIL RC 0,45 µm i 0,2 µm (Macherey-Nagel, Düren, Niemcy)
- Klej cyjanoakrylowy Kropelka (Fenedur SA, Montevideo, Urugwaj)
- Ludzki model naskórka *EpiDerm*[®] (MatTek, Ashland, USA)
- Membrana dializacyjna Spectrapor 10 kDa MWCO (Spectrum Labs, Rancho Dominguez, USA)
- Skóra ludzka pobrana ze zwłok (Katedra i Zakład Patomorfologii GUMed)*
- Taśma Scotch Removable (3M, St. Paul, USA)

* Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej GUMed posiada zgodę nr TKEBN/120/96 Terenowej Komisji Etyki Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku na prowadzenie badań z użyciem skóry ludzkiej pobranej ze zwłok lub fragmentów skóry usuwanych podczas operacji chirurgicznych.

4. METODY

4.1. Otrzymywanie zawiesin cząstek lipidowych z roksytromycyną

Na podstawie przeglądu piśmiennictwa opracowano 4 różne formułacje. Przedstawiono je w tabeli 6.

Tabela 6. Skład formułacji

[% w/w]	FORMULACJA			
	A	B	C	PLACEBO
behenian glicerolu	10	5	6	5
skwalen	-	-	4	-
poloxamer 188	2,5	2,5	2,5	2,5
woda	86,5	91,5	86,5	92,5
ROX	1	1	1	-

Zawiesiny cząstek lipidowych z ROX zostały otrzymane metodami homogenizacji szybkoobrotowej i ultradźwiękowej oraz tylko homogenizacji ultradźwiękowej (sonikacji). Formułacja placebo została wykonana metodą sonikacji. Każdą formułację otrzymywano co najmniej trzykrotnie.

Faza lipidowa wraz z ROX oraz faza wodna (woda i emulgator) zostały podgrzane osobno do temperatury 75-80°C. Następnie faza wodna została dodana do lipidowej i powstała mieszanina natychmiast została poddana homogenizacji mieszadłem szybkoobrotowym przez 10 min przy szybkości 20000 rpm. Otrzymana emulsja została poddana sonikacji przez 10 min przy częstotliwości 20 kHz i 80% amplitudy znamionowej końcówki. Po homogenizacji ultradźwiękowej nanoemulsję ochłodzono w lodzie do temperatury 10-15°C, otrzymując wodną zawiesinę cząstek lipidowych. W metodzie wykorzystującej tylko ultradźwięki pominięto etap homogenizacji szybkoobrotowej, a dalej postępowano jak w metodzie pierwszej.

Ze względu na sposób otrzymywania formułacje odpowiednio oznaczono - tabela 7.

Tabela 7. Oznaczenie formułacji ze względu na metodę ich otrzymywania

METODA OTRZYMYWANIA	formułacja A	formułacja B	formułacja C
homogenizacja szybkoobrotowa i ultradźwiękowa	A MS	B MS	C MS
homogenizacja ultradźwiękowa	A S	B S	C S

4.2. Charakterystyka cząstek lipidowych z roksytromycyną

4.2.1. Różnicowa kalorymetria skaningowa

Temperatura oraz stała celi kalorymetru zostały skalibrowane przy pomocy indu (temperatura topnienia: 156,6°C, ciepło topnienia: 28,45 J/g). Do tygli aluminiowych (pojemność 40 µl) odważano ok. 5 mg każdej z badanych substancji/mieszanin. Pusty tygiel aluminiowy służył jako próba odniesienia dla każdego wykonywanego pomiaru. Szybkość grzania i chłodzenia wynosiła 10°C/min. Pomiary wykonano w atmosferze azotu przepływającego z prędkością 50 ml/min.

4.2.2. Morfologia cząstek

4.2.2.1. Skaningowa mikroskopia elektronowa

W celu wykonania zdjęć próbki zostały wysuszone i pokryte cienką warstwą złota, umieszczone w mikroskopie i poddane napięciu 19 kV w temperaturze pokojowej. W ten sposób zostały wykonane zdjęcia samej ROX oraz liofilizatów cząstek lipidowych z ROX (formulacja A) wykonanych z pominięciem homogenizacji ultradźwiękowej.

4.2.2.2. Transmisyjna mikroskopia elektronowa

Przy pomocy transmisyjnego mikroskopu elektronowego zrobiono zdjęcia próbek formulacji A MS, A S, B MS, B S, C MS, C S. Próbki negatywnie barwiono kwasem fosforowolframowym.

4.2.2.3. Mikroskopia sił atomowych

Wodę z badanych zawiesin odparowano przy pomocy sprężonego powietrza i następnie próbki poddano badaniu, zbierając informacje dotyczące topografii i amplitudy.

4.2.3. Wielkość cząstek, współczynnik polidispersji i potencjał Zeta

Wielkości cząstek (w tym Pdl) oraz ich potencjały Zeta zostały zmierzone odpowiednio technikami: dynamicznego rozproszenia światła oraz dopplerowskiej elektroforezy laserowej przy użyciu aparatu Zetasizer Nano ZS. Każda próbka przed

pomiarem została rozcieńczona w stosunku 1:1000 wodą ultraczystą. Dodatkowo, do wstępnej oceny wielkości cząstek użyto również aparatu Mastersizer 2000, który techniką dyfrakcji laserowej wyznaczył wartości: $d(0,5)$ (górną wartość wielkości cząstek dla 50% cząstek z danej próbki) oraz $d(0,9)$ (górną wartość wielkości cząstek dla 90% cząstek z danej próbki).

Do oceny krótko- i długoterminowej stabilności fizycznej wybrano formułację B S, którą wykonano w trzech seriach: X, Y, Z. Próbki każdej z tych serii przechowywano odpowiednio oznaczone (X4, X25, X40; Y4, Y25, Y40, Z4, Z25, Z40) w kontrolowanych warunkach w trzech różnych temperaturach: 4, 25 i 40°C (Mitri *et al.*, 2011). Pomiar potencjału Zeta metodą dopplerowskiej elektroforezy laserowej przeprowadzono w dniu wykonania formułacji oraz po 4 i 26 tygodniach przechowywania; natomiast pomiar wielkości i PDI - w dniu wykonania oraz po 1, 2, 4 i 26 tygodniach.

4.2.4. Zawartość roksytromycyny w cząstkach

4.2.4.1. Oznaczanie roksytromycyny metodą HPLC

Stosowano następujące warunki analizy chromatograficznej:

- detekcja przy $\lambda = 205$ nm (na podstawie widma UV),
- elucja izokratyczna,
- przepływ: 1 ml/min,
- objętość nastrzyku: 20 μ l,
- temperatura kolumny: 50°C.

W celu optymalizacji warunków analizy testowano fazy ruchome o składach wybranych na podstawie przeglądu piśmiennictwa (Macek *et al.*, 1999; Pappa-Louisi *et al.*, 2002; Ostrowski *et al.*, 2010) lub modyfikowanych:

- metanol : woda (90:10)
- metanol : bufor fosforanowy pH 5,8 (70:30)
- acetonitryl : woda (70:30)
- acetonitryl : woda (50:50)
- acetonitryl : bufor fosforanowy pH 5,8 (50:50)
- acetonitryl : bufor fosforanowy pH 5,8 (60:40)
- acetonitryl : bufor fosforanowy pH 6,8 (50:50).

Roztwory wzorcowe ROX przygotowywano *ex tempore* w następujący sposób:

- roztwór podstawowy o stężeniu 100 µg/ml: 10 mg ROX rozpuszczono w 5 ml metanolu i uzupełniono wodą ultraczystą do 100 ml;
- roztwór pomocniczy o stężeniu 1 µg/ml: 10 µl roztworu podstawowego i 990µl wody ultraczystej;
- roztwory wzorcowe o stężeniach od 0,1 do 100 µg/ml przygotowywano poprzez rozcieńczenie roztworu podstawowego/pomocniczego wodą ultraczystą (tabela 8).

Tabela 8. Schemat przygotowywania roztworów wzorcowych ROX do oznaczeń chromatograficznych

Stężenie ROX w roztworze wzorcowym [µg/ml]	0,1	1,0	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0
Objętość roztworu podstawowego (100 µg/ml) [µl]	-	10	50	100	250	500	1000
Objętość roztworu pomocniczego (1µg/ml) [µl]	100	-	-	-	-	-	-
Objętość wody ultraczystej [µl]	900	990	950	900	750	500	-

4.2.4.2. Oznaczanie procentowej zawartości roksytromycyny w cząstkach (% inkorporacji)

Oznaczanie procentowej zawartości ROX w cząstkach wykonane zostało metodą pośrednią, tzn. oznaczono techniką HPLC zawartość wolnej ROX (niezainkorporowanej) w wodnych zawiesinach cząstek. Do obliczenia ilości ROX użyto opracowanej wcześniej krzywej wzorcowej.

Odważono po ok. 500 mg każdej formułacji i rozcieńczono wodą ultraczystą do 100 ml w kolbie miarowej. Przed nastrzykiwaniem próbek na kolumnę przesączano każdą z nich przez filtr membranowy o średnicy porów 0,2 µm, w celu oddzielenia cząstek. Mimo, że średnica cząstek niektórych zawiesin była nieco mniejsza od średnicy porów filtra, nośniki zostały zatrzymane na filtrze, o czym świadczył brak dodatkowych pików na chromatogramie. W celu obliczenia % inkorporacji uwzględniono dokładną naważkę każdej formułacji, zakładając w niej 1% zawartość ROX i przyjmując to stężenie za 100%. Oznaczone techniką

chromatografii stężenie ROX uznano za stężenie niezainkorporowanej (wolnej) ROX, które odjęto od 100% stężenia ROX w naważce każdej z formułacji.

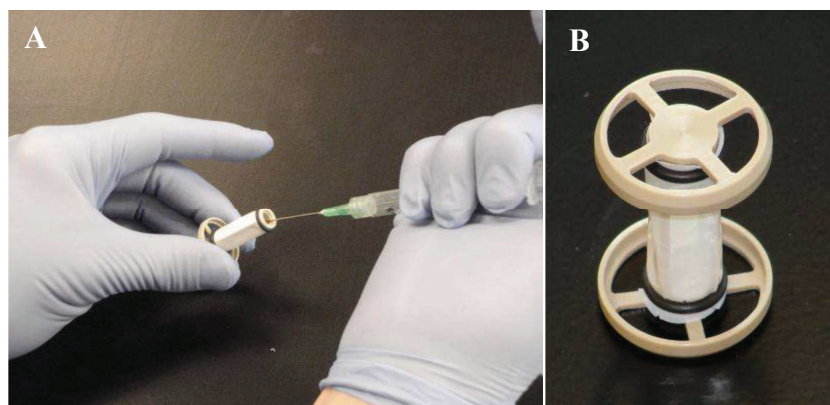
$$\% \text{ inkorporacji} = \frac{\text{wyjściowe stężenie ROX (100\%)} - \text{stężenie wolnej ROX}}{\text{wyjściowe stężenie ROX (100\%)}} \times 100\%$$

4.2.5. Wartość pH formułacji

Pomiar pH został wykonany na uprzednio skalibrowanym pH-metrze poprzez zanurzenie elektrody w zlewce z zawiesiną cząstek.

4.3. Uwalnianie *in vitro* roksytromycyny z formułacji B S

Do badania uwalniania ROX wybrano zawiesinę B S, uznaną za najlepszą spośród wszystkich formułacji po scharakteryzowaniu pod kątem wielkości cząstek oraz % inkorporacji. Jako płynu akceptorowego użyto wody dejonizowanej i odgazowanej o temperaturze $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Wykorzystano również wkłady (adaptery dializacyjne) do badania uwalniania substancji czynnych z liposomów i zawiesin metodą przepływową (ryc. 10).



Rycina 10. Adapter dializacyjny AD4 (B) i jego napełnianie (A) (www.sotax.com).

Na adapterach umieszczono, uprzednio przepłukaną wodą, błonę dializacyjną. Do tak przygotowanych adapterów odmierzone po 0,5 ml zawiesiny cząstek lipidowych z ROX i umieszczono je w naczyniu z płynem akceptorowym o objętości 49,5 ml, uwzględniając warunki „sink”. Uwalnianie przeprowadzono równocześnie w 7 naczyniach. Zbadano 5 prób ($n = 5$) formułacji B S, a jako „próby

kontrolnej” użyto formułacji placebo. Dodatkowo, w celu sprawdzenia czy błona dializacyjna nie uwalnia substancji absorbujących przy badanej długości fali (205 nm), do jednego adaptera odmierzone 0,5 ml samego płynu akceptorowego.

Przez cały czas badania próby były wytrząsane z prędkością 250/min na wytrząsarce w cieplarni utrzymującej temperaturę $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. W określonych odstępach czasu (po 15, 30 min, 1, 2, 4, 6 i 24 h) pobierano próbki o objętości 1 ml, uzupełniając równocześnie płyn akceptorowy w każdym naczyniu. W zebranych próbkach oznaczono absorbancję przy długości fali 205 nm, używając spektrofotometru. Na podstawie, przygotowanej wcześniej, krzywej wzorcowej dla stężeń: 10-200 $\mu\text{g/ml}$, obliczono stężenie uwolnionej z cząstek ROX.

Roztwory wzorcowe ROX przygotowywano *ex tempore* w następujący sposób:

- roztwór podstawowy o stężeniu 200 $\mu\text{g/ml}$: 20 mg ROX rozpuszczono w 5 ml metanolu i uzupełniono wodą ultraczystą do 100 ml;
- roztwory wzorcowe przygotowywano poprzez rozcieńczenie roztworu podstawowego wodą ultraczystą wg schematu przedstawionego w tabeli 9.

Tabela 9. Schemat przygotowywania roztworów wzorcowych ROX do oznaczeń spektrofotometrycznych

Stężenie ROX w roztworze wzorcowym [$\mu\text{g/ml}$]	10	25	50	100	150	200
Objętość roztworu podstawowego (200 $\mu\text{g/ml}$) [ml]	0,5	1,25	2,5	5	7,5	10
Objętość wody ultraczystej [ml]	9,5	8,75	7,5	5	2,5	-

4.4. Badanie aktywności formułacji B S przeciw *Propionibacterium acnes* (Ph. Eur. 7.0)

Badanie wykonane zostało zgodnie z wytycznymi Farmakopei Europejskiej 7.0 dla 3 formułacji:

- placebo,
- B S (1% ROX),
- B S ze zmniejszoną o połowę zawartością ROX (0,5%).

4.5. Ocena potencjału drażniącego formułacji B S *in vitro*

Ocena potencjału drażniącego oparta jest na badaniu właściwości cytotoksycznych preparatu przy pomocy ilościowego testu kolorymetrycznego polegającego na redukcji żółtej soli tetrazoliowej (MTT) przez komórki aktywne metabolicznie. Badanie to przeprowadzono w warunkach *in vitro* na ludzkim modelu naskórka *EpiDerm*[®]. Zbadano 3 formułacje:

- placebo,
- B S (1% ROX),
- B S ze zmniejszoną o połowę zawartością ROX (0,5%).

Model *EpiDerm*[®] składa się z naskórkowych keratynocytów ludzkiego pochodzenia, tworzących warstwę podstawną, kolczystą i ziarnistą. Na powierzchni naskórka jest *stratum corneum* złożona z wielu warstw korneocytów, otoczonych przez lipidy o profilu bardzo podobnym do naturalnego.

Naskórek miał powierzchniowy kontakt z badaną formułacją przez 1h. Dodatkowo użyto pozytywnej (5% wodny roztwór SDS) i negatywnej (sterylny bufor fosforanowy pH=7) próby kontrolnej, które aplikowano w ten sam sposób. Następnie, po dokładnym przemyciu komórek, przeprowadzono test ich żywotności. Przeniesiono komórki do medium zawierającego MTT i badano jego redukcję do niebieskiego formazanu przez dehydrogenazę obecną w mitochondriach żywych komórek. Barwny produkt tej reakcji jest nierozpuszczalny w wodzie, więc dopiero po jego rozpuszczeniu w izopropanolu oznaczono spektrofotometrycznie jego ilość.

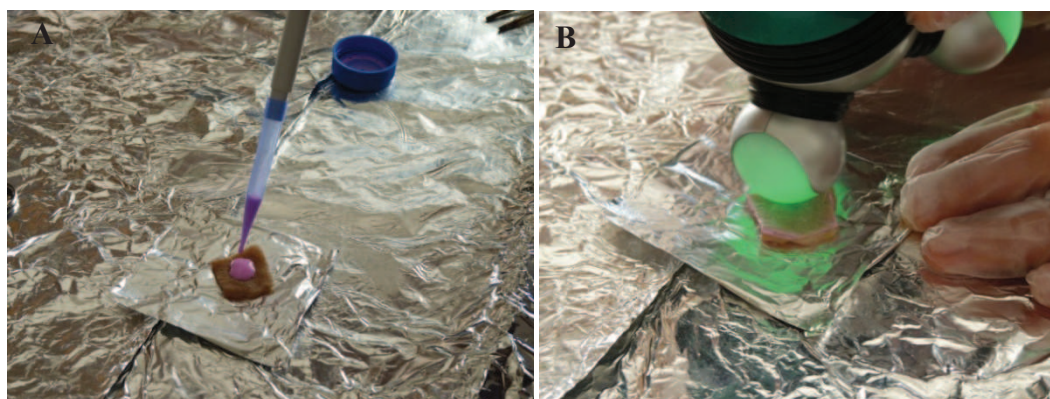
Badany uznawany jest za drażniący, według protokołu (Standard Operating Procedure, Version 7.0, 2007), jeśli przeżywalność komórek po kontakcie z nim wynosi 50% lub mniej.

4.6. Obrazowanie wnikania cząstek do mieszków włosowych skóry ludzkiej *ex vivo*

W celu zobrazowania wnikania cząstek lipidowych z ROX do mieszków włosowych, wykonano formułację B S z dodatkiem lipofilowego barwnika fluorescencyjnego – estru heksylowego nadchloranu rodaminy B.

4.6.1. Obrazowanie rozmieszczenia cząstek w skórze z okolicy klatki piersiowej

Użyto skóry ludzkiej *ex vivo* pobranej z okolicy klatki piersiowej. Tkanekę tłuszczową usunięto po pobraniu. Skóra była przechowywana w stanie zamrożonym (-20°C). Po jej rozmrożeniu delikatnie obcięto włosy nożyczkami. Na tak przygotowaną skórę nałożono 100 μ l formułacji B S i wmasowywano ją przez 5 min przy pomocy masażera, co pokazane jest na rycinach 11A i B.



Ryciny 11A, B. Aplikacja formułacji na skórę z okolicy klatki piersiowej.

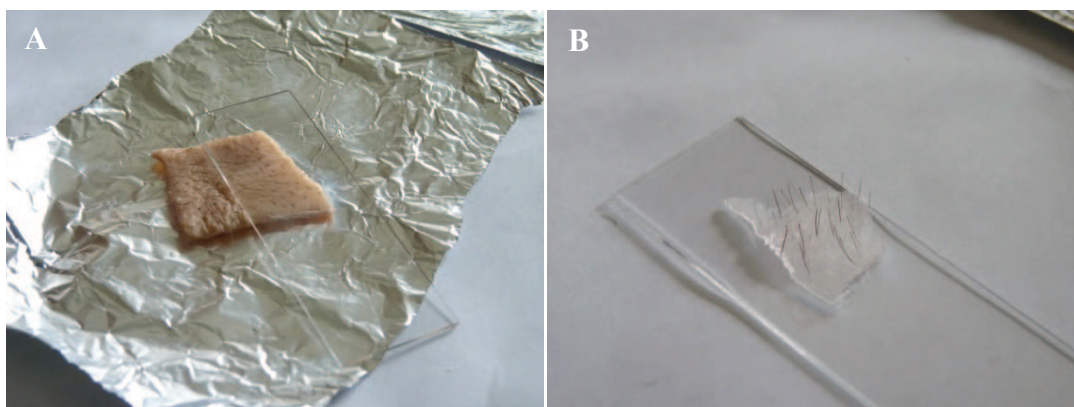


Rycina 12. Wykonywanie przekrojów zamrożonego fragmentu skóry.

Skórę odpowiednio zabezpieczono i inkubowano w temperaturze 37°C przez 1 h. Po tym czasie skórę podzielono na dwie części. Z powierzchni pierwszej części delikatnie usunięto nadmiar formułacji i wykonano poprzeczne oraz podłużne przekroje zamrożonego fragmentu skóry. Użyto w tym celu kriotomu, którym cięto fragmenty skóry o grubości ok. 100 μ m (ryc. 12), dzięki czemu można było

oszacować głębokość penetracji. Przekroje niezwłocznie oglądano i wykonywano zdjęcia przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego z kamerą.

Na drugim fragmencie skóry przeprowadzono procedurę *differential stripping* opisaną w części teoretycznej (rozdział 4.1.). Przy pomocy taśmy klejącej wykonano *tape stripping* „usuwając” 10 frakcji *stratum corneum*, następnie zaaplikowano kroplę cyjanoakrylowego kleju i przyłożono szkiełko nakrywkowe (ryc. 13A). Po 10 min polimeryzacji kleju, odklejono szkiełko, wyciągając przy jego pomocy zawartość mieszków włosowych (ryc. 13B), którą oglądano pod mikroskopem fluorescencyjnym i wykonywano zdjęcia.



Ryciny 13A, B. A – wykonywanie *differential stripping*, B - cyjanoakrylowa biopsja.

4.6.2. Obrazowanie rozmieszczenia cząstek w skórze głowy

Ludzką skórę głowy *ex vivo* przygotowano w ten sam sposób jak skórę z okolicy klatki piersiowej (rozdział 4.6.1.). Procedura aplikacji i późniejszego wykonywania przekrojów również była taka sama jak opisana wcześniej. W celu określenia wpływu nośnika na penetrację w skórze, oprócz aplikacji formułacji B S z RBHE użyto również, jako kontroli, roztworu RBHE w oleju z pestek winogron z „kroplą” etanolu (w celu ułatwienia rozpuszczenia barwnika). Skórę po aplikacji inkubowano w 37°C przez 5 min lub 1 h. Dodatkowo przy pomocy oprogramowania Nis-Elements BR 3.0. porównano intensywności fluorescencji na odpowiednich zdjęciach przekrojów skóry. Na każdym zdjęciu narysowano 2 linie (strzałki) tak, aby zbadać rozkład fluorescencji wzdłuż mieszków włosowych. Na obszarze wyznaczonym przez każdą strzałkę została komputerowo zliczona intensywność fluorescencji dla fali o długości światła czerwonego, zielonego i niebieskiego. Następnie przedstawiono ją na wykresie w zależności od obszaru zdjęcia.

4.7. Penetracja cząstek do mieszków włosowych *in vivo* i oznaczanie roksytromycyny w pobranych biopsjach cyjanoakrylowych

Badanie przeprowadzono *in vivo* na skórze przedramienia oraz łydki. Skórę w tych miejscach umyto, osuszono, a włosy przycięto nożyczkami. Na każdym z wymienionych obszarów wydzielono po 7 fragmentów o powierzchni 5 cm² każdy. Obrysowano ich brzegi i zabezpieczono taśmą. Na każde 5 cm² nałożono 100 µl formułacji B S (3 próby) lub 1% zawiesiny wodnej kryształów ROX (1 próba kontrolna). Zawiesiny wmasowywano w skórę przez 5 min przy pomocy masażera. Po odpowiednim czasie (30 min lub 12 h) przeprowadzono procedurę *differential stripping* zgodnie z opisem przedstawionym w części teoretycznej (rozdział 4.1.) i publikacjach (Lademann *et al.*, 2006; Lademann *et al.*, 2012). Na każde 5 cm² nałożono 4 krople kleju.

Otrzymane biopsje cyjanoakrylowe z zawartością mieszków włosowych poddano dalszej analizie w celu oznaczenia w nich ilości ROX. Każdą biopsję (5 cm²) ekstrahowano 5 ml metanolu. Ekstrakty następnie poddano analizie techniką wysokosprawnej chromatografii ciekowej sprzężonej ze spektrometrią mas z jonizacją przez elektrorozpylanie (HPLC-ESI-MS/MS).

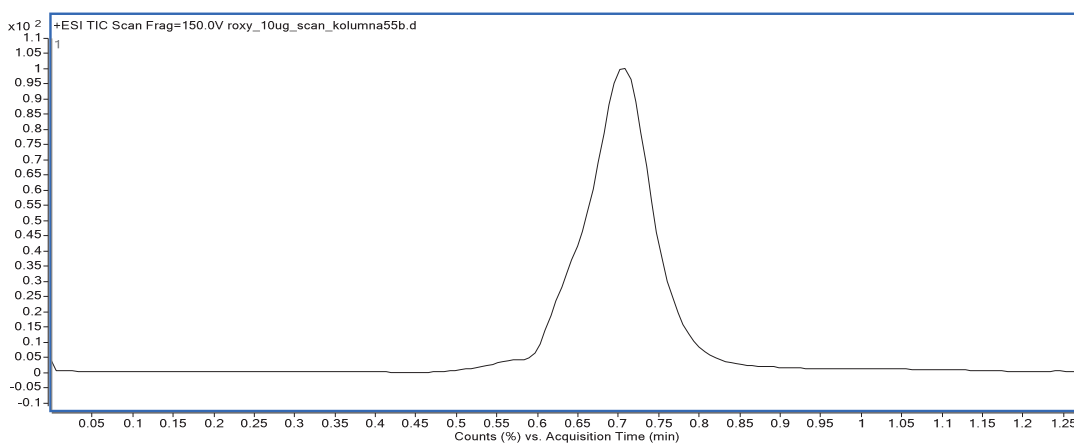
Zastosowano następujące parametry spektrometru mas (typ potrójny kwadrupol):

- temperatura gazu suszącego (azot): 300^oC
 - przepływ gazu suszącego (azot): 10 l/min
 - ciśnienie rozpylacza: 30 psi
 - polaryzacja: dodatnia
 - napięcie na kapilarze: 4000 kV
 - napięcie na fragmentorze: 150 V
 - napięcie w celi kolizyjnej: 22 V
 - „*dwell time*” (czas zbierania danych dla konkretnej masy): 20 ms;
- i parametry oznaczania:
- faza ruchoma: 0,1% kwas mrówkowy w wodzie pH 2,7 : acetonitryl (45:55) (v/v)
 - przepływ: 0,4 ml/min
 - elucja izokratyczna

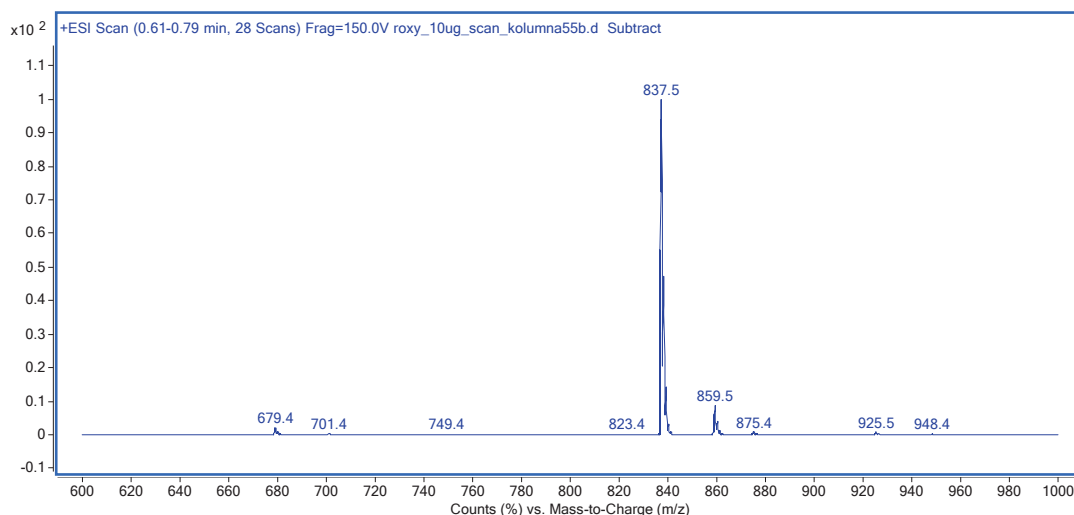
- czas analizy: 1,5 min
- temperatura kolumny: 30°C
- objętość dozowanej próbki: 2 µl
- długość fali: 254 nm.

Przebieg analizy techniką HPLC-ESI-MS/MS:

1. Oznaczanie próbki roztworu wzorcowego ROX (1 µg/ml) w trybie przemiatania (SCAN) (ryc. 14,15) w celu ustalenia wartości m/z (stosunek masy do ładunku) jonu prekursorowego.



Rycina 14. Widmo *total ion chromatogram* roztworu wzorcowego ROX w trybie przemiatania.

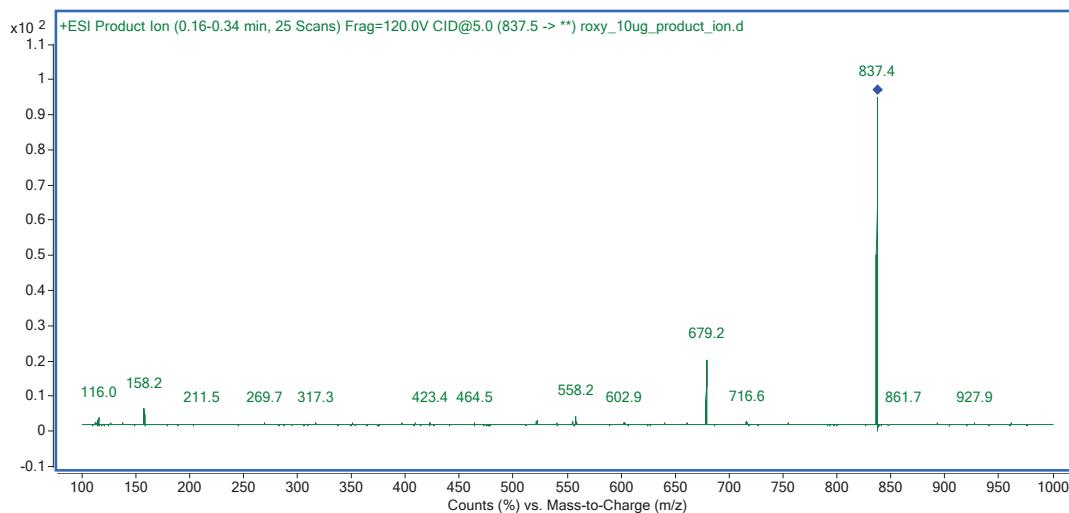


Rycina 15. Widmo *extracted ion chromatogram* roztworu wzorcowego ROX w trybie przemiatania.

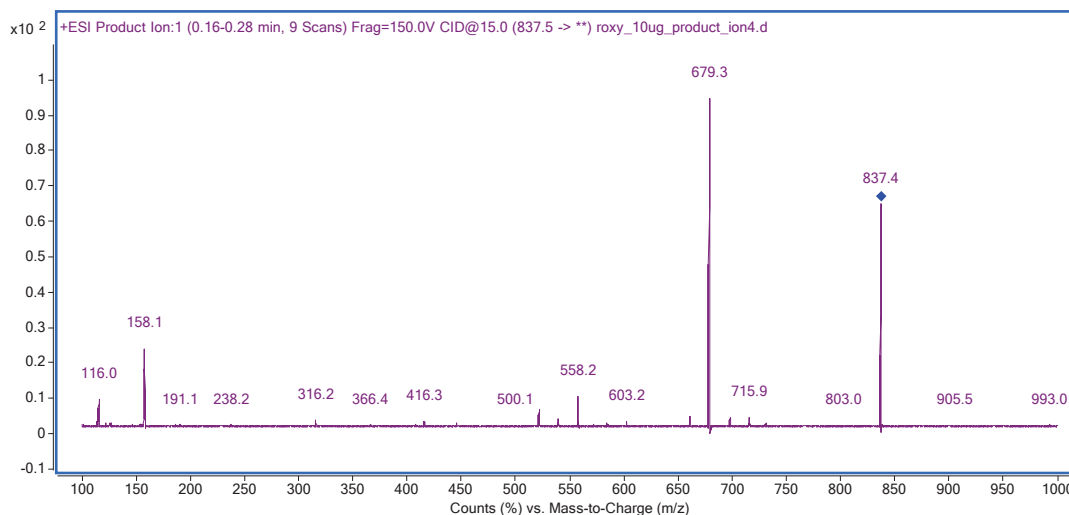
Wartość m/z dla jonu prekursorowego [ROX + H⁺] wyniosła 837,5.

2. Wyznaczanie jonów potomnych ROX (na podstawie uzyskanego wcześniej widma) przy różnych wartościach napięcia w celi kolizyjnej.

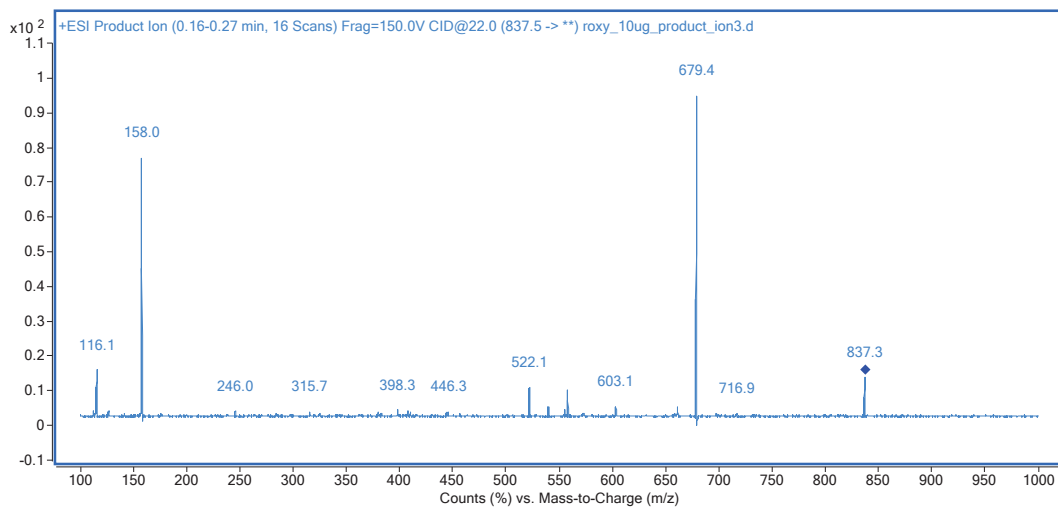
Ryciny 16-19 przedstawiają widma jonów potomnych przy różnych wartościach napięcia (niebieskim rombem zaznaczony jest jon prekursorowy).



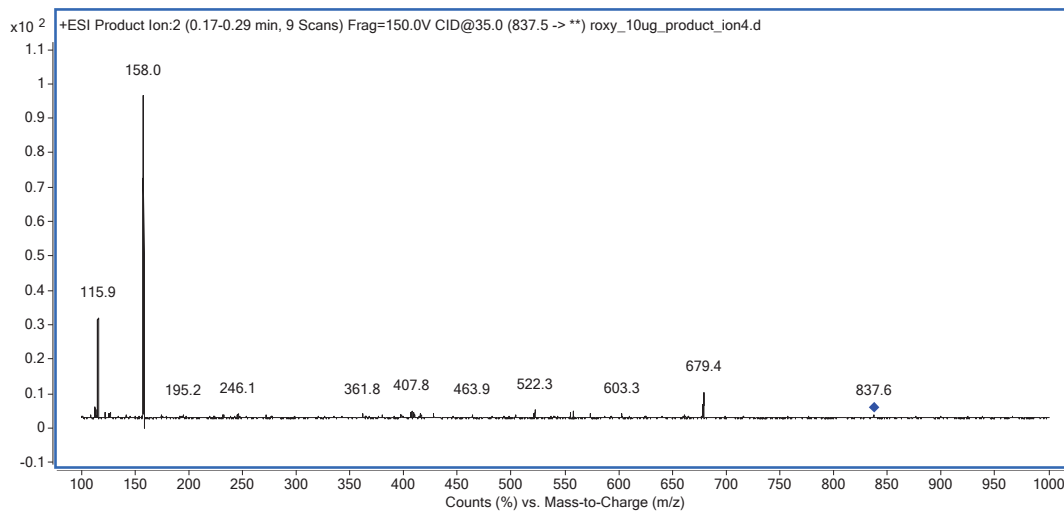
Rycina 16. Widmo jonów potomnych ROX przy napięciach: w celi kolizyjnej 5 V, na fragmentorze 150 V.



Rycina 17. Widmo jonów potomnych ROX przy napięciach: w celi kolizyjnej 15 V, na fragmentorze 150 V.



Rycina 18. Widmo jonów potomnych ROX przy napięciach: w celi kolizyjnej 22 V,
na fragmentorze 150 V.

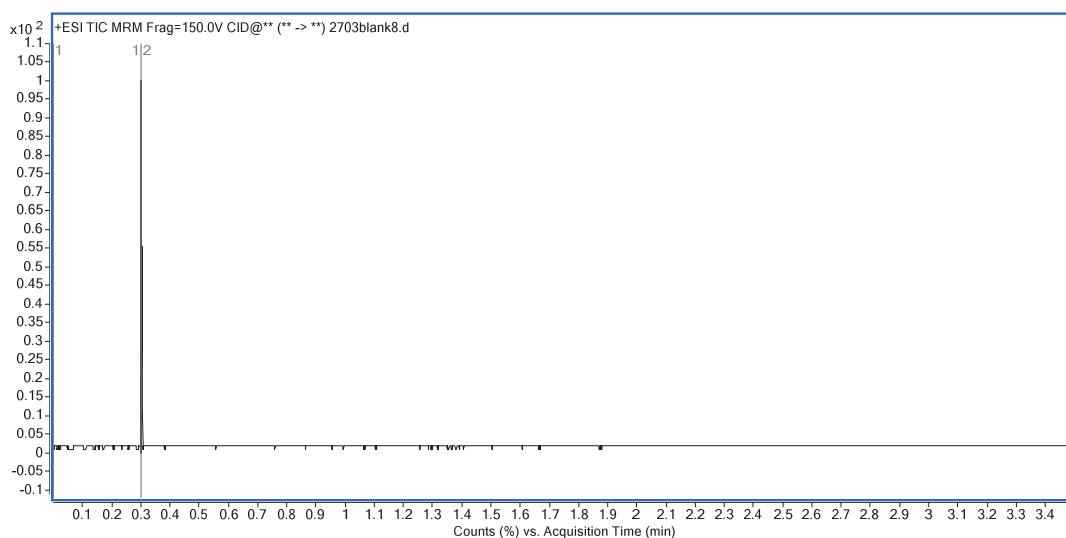


Rycina 19. Widmo jonów potomnych ROX przy napięciach: w celi kolizyjnej 35 V,
na fragmentorze 150 V.

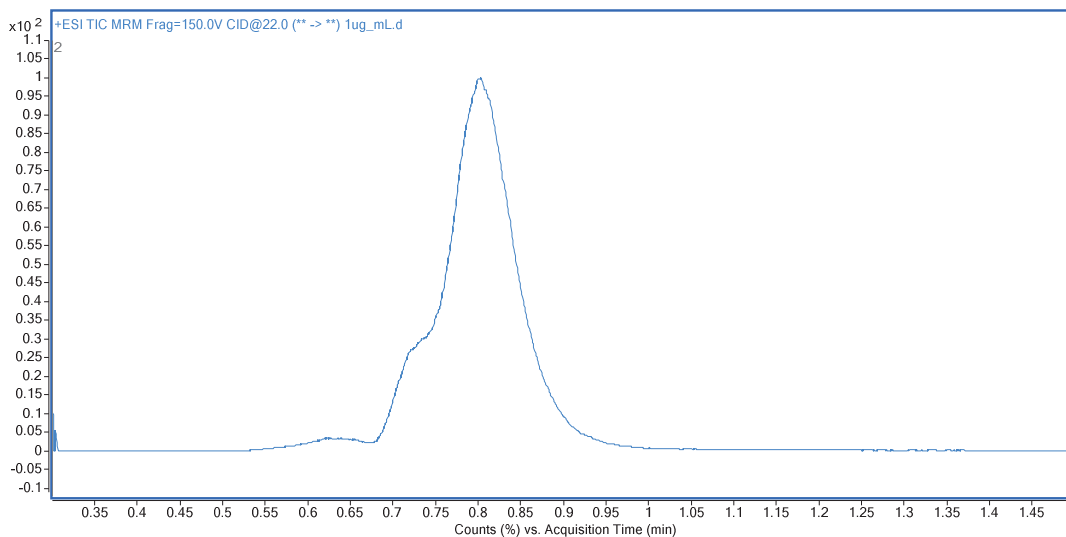
- Wybrano napięcie na fragmentorze 150 V, napięcie w celi kolizyjnej 22 V oraz następujące jony potomne: ilościowy (służący do oznaczeń ilościowych) 679,4 m/z i jakościowy (służący do potwierdzenia tożsamości ROX) 158 m/z.

- Oznaczanie próby kontrolnej oraz roztworu wzorcowego ROX (1 μ g/ml) w trybie monitorowania wielu reakcji (MRM).

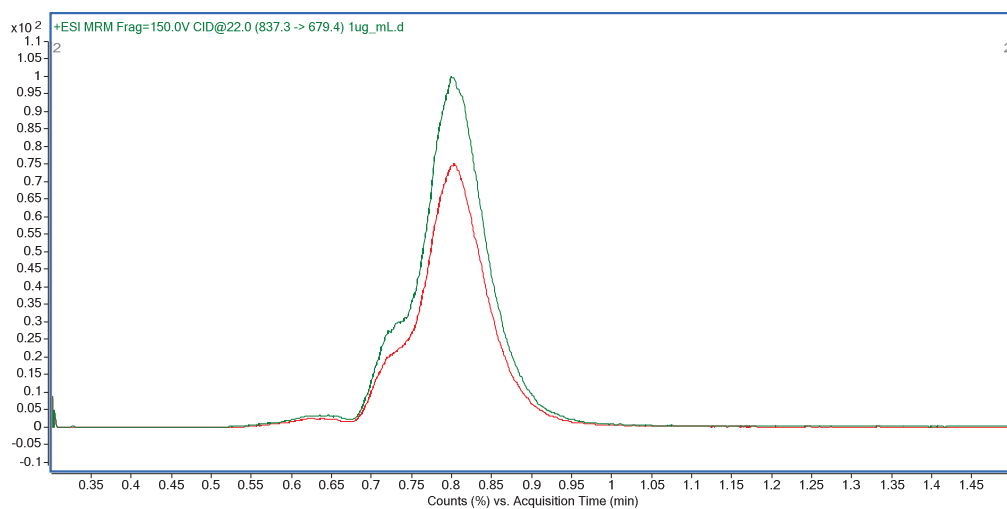
Ryciny 20-22 przedstawiają widma próby kontrolnej oraz roztworu wzorcowego ROX.



Rycina 20. Widmo próby kontrolnej (*total ion chromatogram*, tryb MRM).



Rycina 21. Widmo roztworu wzorcowego ROX (*total ion chromatogram*, tryb MRM).



Rycina 22. Widmo roztworu wzorcowego ROX, zielona linia - jon ilościowy, czerwona - jon jakościowy (*total ion chromatogram*, tryb MRM).

5. Wyznaczenie krzywej kalibracyjnej na podstawie roztworów wzorcowych ROX (zakres stężeń: 1 ng/ml - 1 μ g/ml) i obliczenie stężenia ROX w ekstraktach z biopsji cyjanoakrylowych.

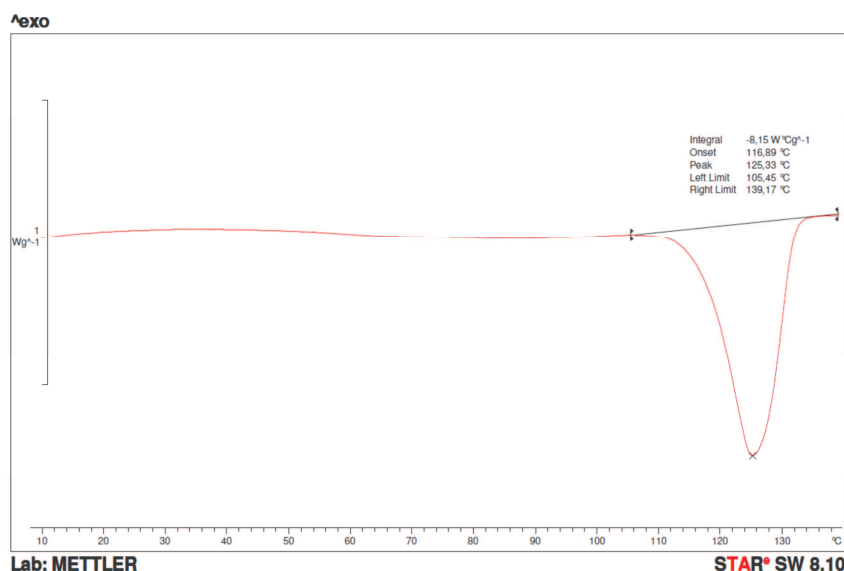
5. WYNIKI

5.1. Charakterystyka cząstek lipidowych z roksytromycyną

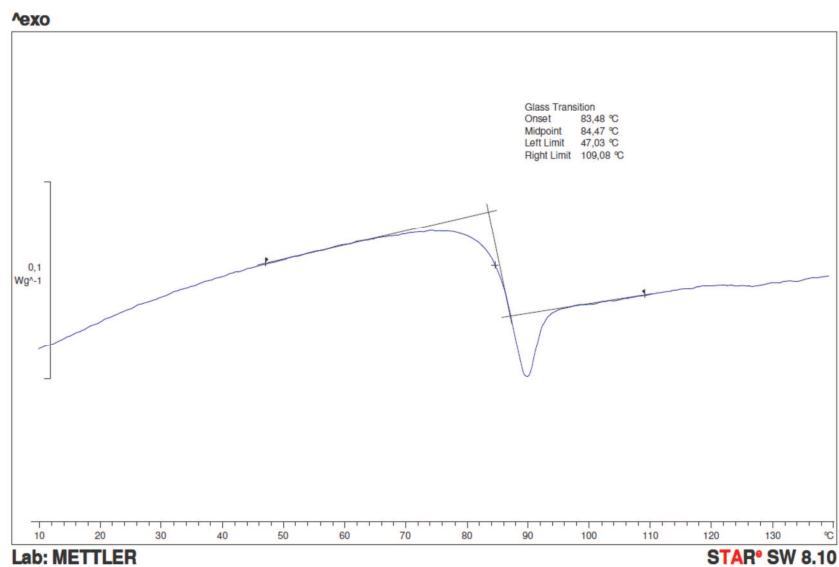
5.1.1. Różnicowa kalorymetria skaningowa

Podczas pierwszego cyklu ogrzewania ROX do 140°C, zaobserwowano endotermiczny pik topnienia przy temperaturze 125,3°C (ryc. 23). Pozwoliło to stwierdzić, że badana ROX ma formę krystaliczną. Po ogrzaniu natychmiast schłodzono próbkę do -20°C i ogrzano ponownie, uzyskując przejście szkliste przy 84,47°C (T_g) (ryc. 24). Ryciny 23-25 przedstawiają termogramy ROX.

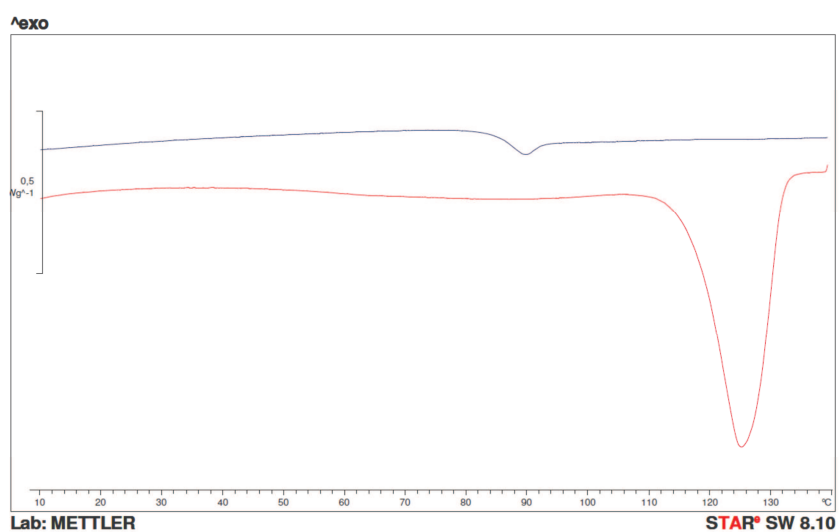
Podobnemu cyklowi ogrzewania poddano także behenian glicerolu (Compritol), tworzący matrycę cząstek lipidowych. Zaobserwowano wyraźny pik topnienia przy 74,48°C, co zgodne jest ze specyfikacją producenta (ryc. 26). Compritol, w odróżnieniu od ROX, po schłodzeniu i ponownym ogrzaniu nie wykazuje przejścia szklistego, tylko ponowny endotermiczny pik, świadczący o formie krystalicznej lipidu.



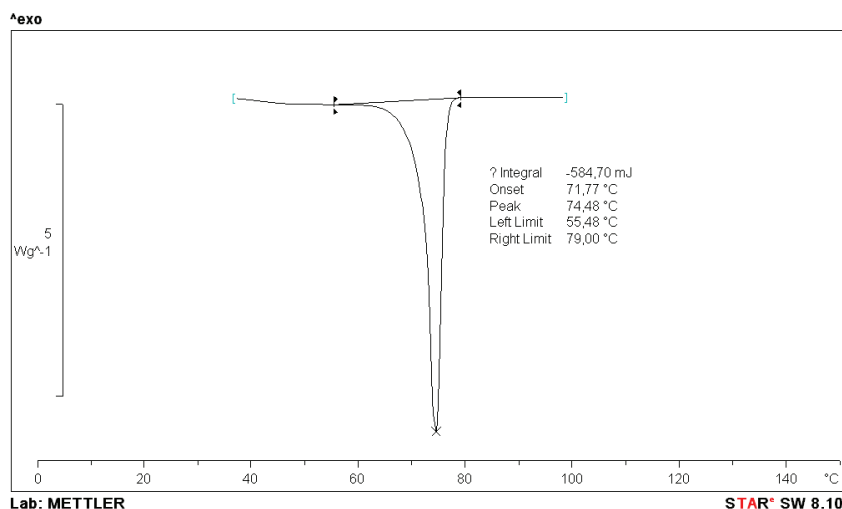
Rycina 23. Fragment termogramu przedstawiającego zależność przepływu ciepła od temperatury podczas ogrzewania ROX (widoczny endotermiczny pik topnienia).



Rycina 24. Fragment termogramu przedstawiającego zależność przepływu ciepła od temperatury podczas chłodzenia ROX (widoczne przejście szkliste).



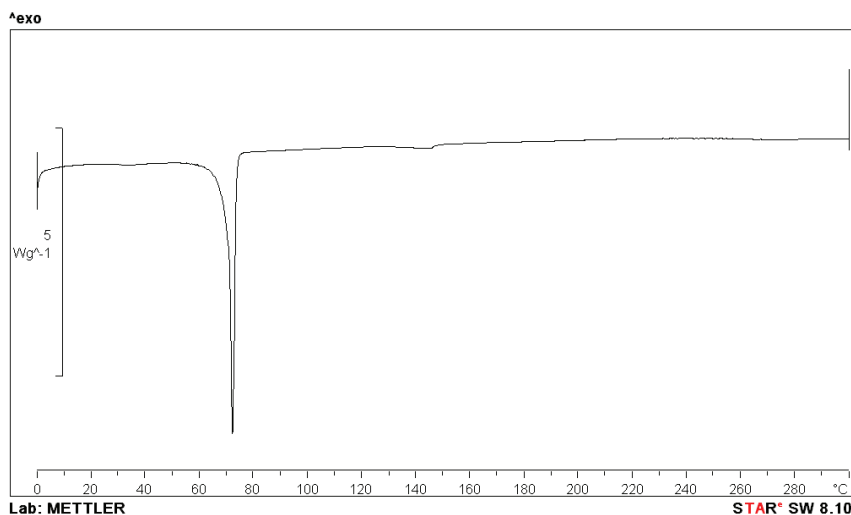
Rycina 25. Termogram przedstawiający zależność przepływu ciepła od temperatury podczas ogrzewania (czerwona linia) i chłodzenia (czarna linia) ROX. Widoczny pik topnienia (czerwona linia) i przejście szkliste (czarna linia).



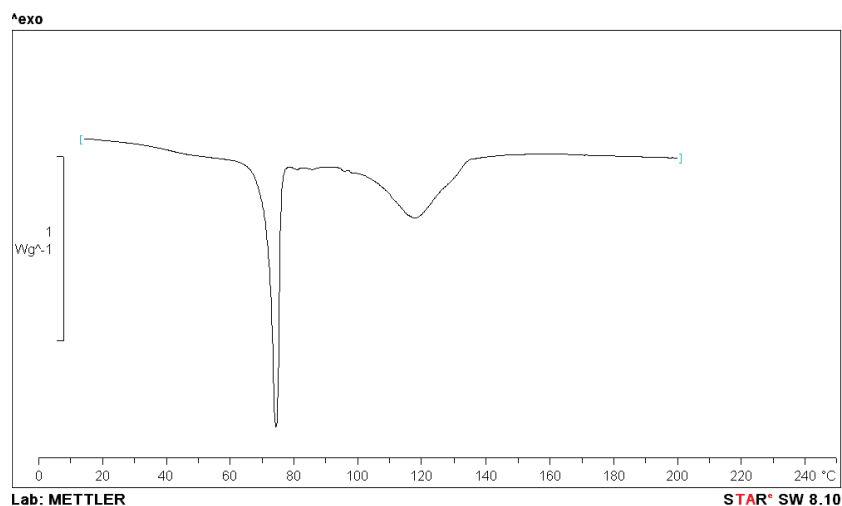
Rycina 26. Fragment termogramu przedstawiającego zależność przepływu ciepła od temperatury podczas ogrzewania Compritolu (widoczny pik topnienia).

Analiza termiczna cząstek lipidowych z inkorporowaną ROX (formulacja A) uwidacznia tylko jeden endotermiczny pik przy temperaturze ok. 74°C (ryc. 27). Brak jest natomiast pików przy 125°C, który wskazywałby na topnienie ROX.

Dla porównania przygotowano także mieszaninę fizyczną ROX i Compritolu przez mieszanie w moździerzu, bez stapiania. Analiza termiczna tej próbki uwidacznia pik topnienia lipidu przy ok. 74°C i szeroki pik przy ok. 120°C, który może wskazywać na topnienie ROX (ryc. 28).



Rycina 27. Fragment termogramu przedstawiającego zależność przepływu ciepła od temperatury podczas ogrzewania formulacji A (widoczny pik topnienia Compritolu).

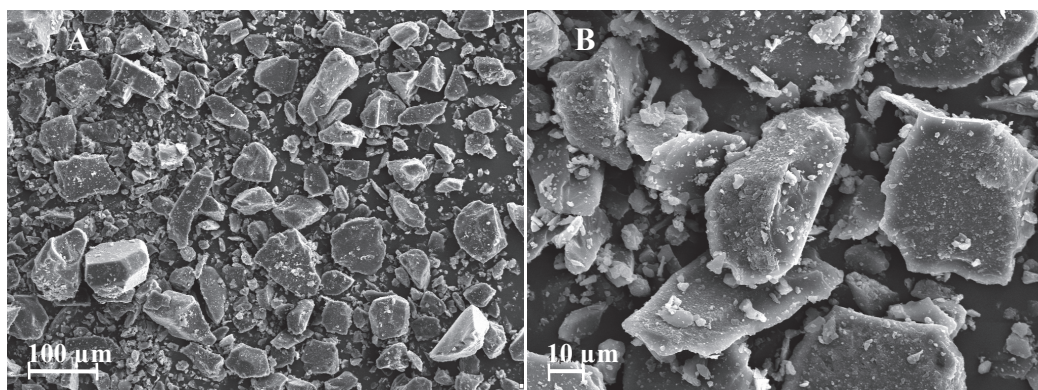


Rycina 28. Fragment termogramu przedstawiającego zależność przepływu ciepła od temperatury podczas ogrzewania mieszaniny fizycznej ROX i Compritolu.

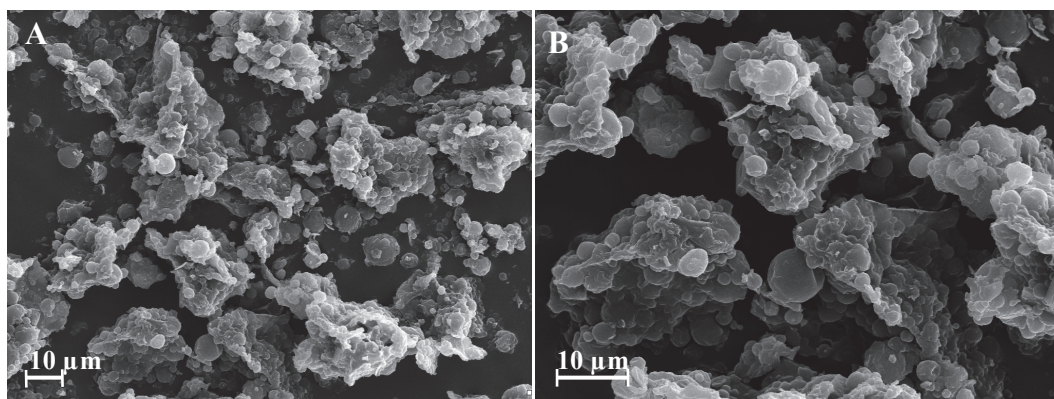
5.1.2. Morfologia cząstek

5.1.2.1. Skaningowa mikroskopia elektronowa

Zdjęcia SEM roksytromycyny uwidaczniają kryształy o nieregularnej powierzchni i różnej wielkości (ryc. 29A i B).



Ryciny 29A, B. Zdjęcia SEM roksytromycyny.

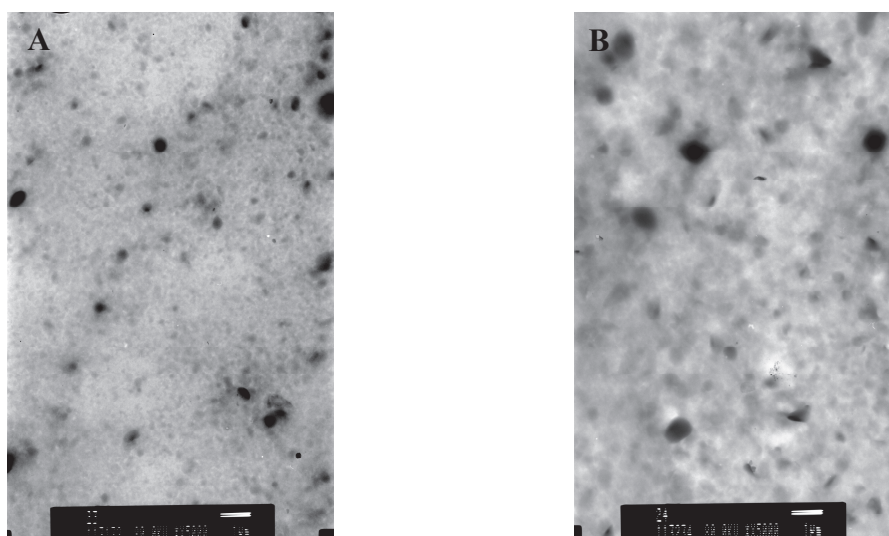


Ryciny 30A, B. Zdjęcia SEM liofilizatów cząstek lipidowych, otrzymanych w badaniach wstępnych.

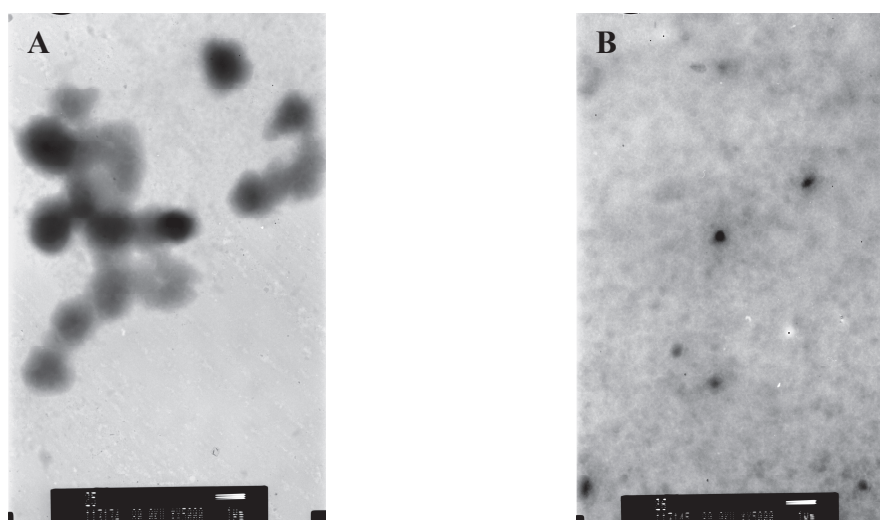
Z uwagi na ograniczoną dostępność skaningowego mikroskopu elektronowego, zdjęcia wykonano dla liofilizatów cząstek otrzymanych w badaniach wstępnych, tylko z użyciem homogenizatora szybkoobrotowego. Stąd wielkość cząstek widocznych na zdjęciach waha się w granicach kilku μm . Dodatkowo widoczna jest agregacja cząstek, która może wynikać m.in. z procesu liofilizacji, jakiemu zostały poddane (ryc. 30A, B).

5.1.2.2. Transmisyjna mikroskopia elektronowa

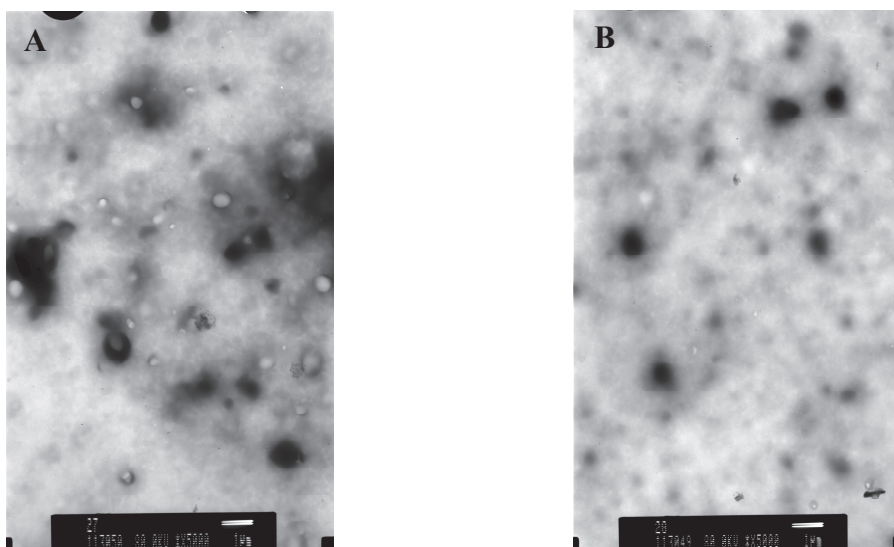
Zdjęcia TEM na rycinach 31–33 ukazują kuliste cząstki o różnej średnicy.



Ryciny 31A, B. Zdjęcia TEM formulacji A: A - A MS, B - A S.



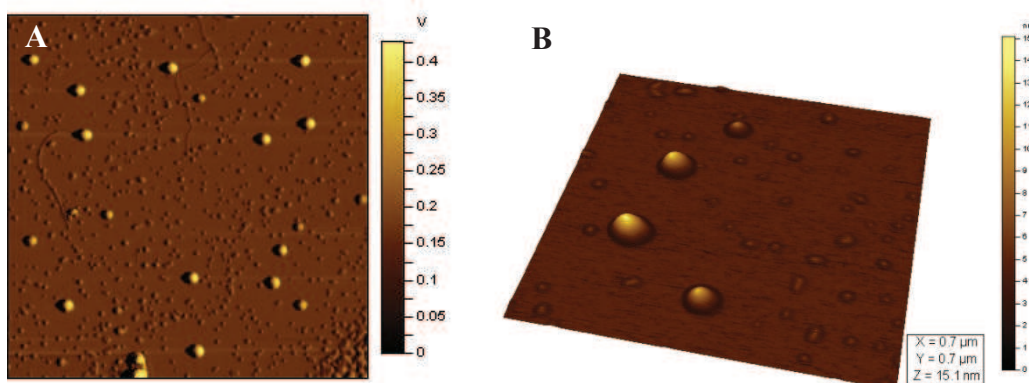
Ryciny 32A, B. Zdjęcia TEM formulacji B: A - B MS, B - B S.



Ryciny 33A, B. Zdjęcia TEM formułacji C: A - C MS, B - C S.

5.1.2.3. Mikroskopia sił atomowych

Z uwagi na ograniczoną dostępność do AFM, zdjęcia widoczne na rycinach 34 A i B wykonano dla zawiesin cząstek otrzymanych w badaniach wstępnych, tylko z użyciem homogenizatora szybkoobrotowego.



Ryciny 34A, B. Zdjęcia AFM cząstek lipidowych, otrzymanych w badaniach wstępnych.

5.1.3. Wielkość cząstek, współczynnik polidispersji i potencjał Zeta

Pomiar wielkości cząstek wykonano na dwóch odmiennych aparatach, ze względu na ich różne zakresy pomiarowe. Aparat Mastersizer mierzy cząstki w zakresie 0,1-1000 μm , natomiast Zetasizer charakteryzuje się niższym zakresem: 0,6 nm - 6 μm . We wstępnych badaniach wykorzystano wyniki pomiarów wielkości

z obu aparatów, aby wybrać formułację z możliwie najbardziej jednorodną (najmniejszy PdI) i optymalną średnicą cząstek (tabela 10).

Tabela 10. Średnie wartości wielkości cząstek oraz współczynnika polidispersji dla 6 formułacji

Aparat	MASTERSIZER		ZETASIZER	
	Średnia d(0,5) [*] [μm] ± RSD% n = 3	Średnia d(0,9) [#] [μm] ± RSD% n = 3	Średnia wielkość cząstek [nm] ± RSD% n = 3	Średni PdI ± RSD% n = 3
A MS	13,7 ± 13,5%	41,7 ± 3,0%	330,6 ± 15,8%	0,373 ± 38,8%
A S	25,7 ± 8,9%	102,3 ± 33,9%	1256,8 ± 33,1%	0,294 ± 47,9%
B MS	4,9 ± 26,0%	33,2 ± 19,8%	589,5 ± 38,0%	0,374 ± 47,3%
B S	0,1 ± 11,4%	0,3 ± 5,4%	172,7 ± 3,1%	0,246 ± 5,5%
C MS	16,2 ± 13,0%	41,9 ± 36,0%	375,0 ± 33,1%	0,422 ± 18,5%
C S	5,1 ± 33,3%	55,1 ± 3,6%	249,4 ± 1,3%	0,152 ± 19,3%

* d(0,5) - górna wartość wielkości cząstek dla 50% cząstek z danej próbki

d(0,9) - górna wartość wielkości cząstek dla 90% cząstek z danej próbki

Wyniki pomiarów aparatem Mastersizer wskazują, że wyraźnie mniejsze cząstki, w przypadku formułacji B i C, uzyskuje się przy pomocy homogenizacji ultradźwiękowej z pominięciem szybkoobrotowej. Porównanie wszystkich dyspersji pozwala stwierdzić, że cząstki o najmniejszej wielkości – tylko w zakresie nm, ma formułacja B S, zawierająca 5% stałych lipidów, natomiast formułacja A, z 10% zawartością stałych lipidów, charakteryzuje się największymi cząstkami.

Pomiary aparatem Zetasizer potwierdzają najmniejszą średnicę cząstek dla zawiesiny B S. Średnica ta nie przekracza 200 nm. Współczynnik polidispersji dla tej formułacji nie przekracza wartości 0,3. Średnica cząstek pozostałych dyspersji jest większa. Współczynnik PdI jest zawsze wysoki (> 0,3) dla cząstek otrzymywanych drogą homogenizacji szybkoobrotowej i ultradźwiękowej. Wszystkie zawiesiny otrzymywane tylko drogą sonikacji charakteryzuje niska wartość PdI – poniżej 0,3.

Na podstawie wyników powyższych pomiarów, do badań krótko- i długoterminowej stabilności fizycznej, z uwzględnieniem pomiaru wielkości cząstek oraz ich potencjału Zeta, wybrano formułację B S. Trzy serie (X, Y, Z) tej zawiesiny przechowywano w trzech różnych temperaturach: 4, 25, 40°C przez

26 tygodni i w określonych odstępach czasu dokonywano pomiarów. Wyniki zamieszczono w tabeli 11. W seriach przechowywanych w temperaturze 25 i 40°C cząstki zachowują wyjściową wielkość oraz Pdl nieprzekraczające wartości 0,3 przez cały czas badania. Dla serii przechowywanych w temperaturze 4°C już po pierwszym tygodniu obserwować można wzrost Pdl oraz wielkości cząstek (do ok. 230 nm). Tendencja wzrostowa utrzymuje się przez 26 tygodni.

Tabela 11. Wielkość cząstek oraz współczynnik polidispersji dla trzech serii formulacji B S przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych (4, 25, 40°C)

Seria formulacji	dzień 0		1 tydzień		2 tygodnie		4 tygodnie		26 tygodni	
	średnica cząstek [nm]	Pdl	średnica cząstek [nm]	Pdl	średnica cząstek [nm]	Pdl	średnica cząstek [nm]	Pdl	średnica cząstek [nm]	Pdl
X4			231,6	0,285	440,7	0,529	3366	0,425	2870	0,821
Y4			251,6	0,298	1141,9	0,857	2919	0,95	3597	0,857
Z4			212,6	0,243	303,9	0,494	1300,5	0,929	2348,5	0,883
X25	173,1	0,232	173,1	0,249	167	0,324	168,2	0,307	174,7	0,26
Y25	174	0,245	169,5	0,249	157,6	0,26	164,4	0,318	177,5	0,259
Z25	169,3	0,234	169,5	0,243	158,1	0,251	158,6	0,279	165,1	0,256
X40			162,1	0,273	158,5	0,261	165,9	0,333	167,5	0,278
Y40			160,3	0,277	155,4	0,27	158,3	0,275	167,5	0,307
Z40			158,2	0,257	157,1	0,256	157,4	0,296	159	0,268

Tabela 12. Potencjał Zeta dla trzech serii formulacji B S przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych (4, 25, 40°C)

	dzień 0	4 tygodnie	26 tygodni
Seria formulacji B S	potencjał Zeta [mV]	potencjał Zeta [mV]	potencjał Zeta [mV]
X 4		-12,985	-11,05
Y 4		-14,45	-14,10
Z 4		-13,30	-13,10
X 25	-34,05	-16,265	-14,75
Y 25	-32,80	-20,45	-11,15
Z 25	-28,20	-22,75	-16,45
X 40		-16,50	-17,60
Y 40		-16,455	-18,25
Z 40		-15,95	-17,75

Zmierzono także potencjał Zeta trzech serii formulacji B S (tabela 12). Wszystkie z badanych zawiesin cząstek wykazują ujemny potencjał Zeta, wynoszący w dniu ich otrzymania ok. -30mV. Pomiar potencjału po 4 tygodniach wykazał wzrost jego wartości w przypadku wszystkich prób (przechowywanych w trzech różnych temperaturach). Jednak dla prób przechowywanych w temperaturze 25°C, wzrost ten był wyraźnie najmniejszy – potencjał pozostał na poziomie ok. -20 mV. Po 26 tygodniach zwiększył się do ok. -14 mV. Dla prób przechowywanych w 4°C - podobnie, natomiast w przypadku prób przechowywanych w 40°C końcowy potencjał miał wartość ok. -17 mV.

5.1.4. Zawartość roksytromycyny w cząstkach

5.1.4.1. Walidacja metody HPLC oznaczania roksytromycyny

Faza ruchoma: acetonitryl:bufor fosforanowy pH 5,8 (50:50) uznana została za optymalną.

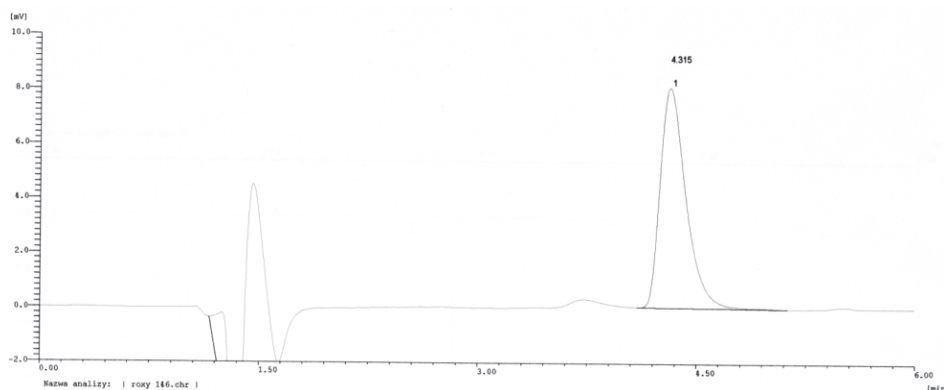
Uzyskane rezultaty są następujące:

- czas retencji $t_r \sim 4,5$ min
- liniowa zależność pomiędzy powierzchnią piku i stężeniem roksytromycyny w roztworach wzorcowych w zakresie stężeń 0,5-100 $\mu\text{g/ml}$ opisana równaniem regresji prostoliniowej:

$$A = 7418,01 c + 1000,8 \quad (A - \text{absorbancja, } c - \text{stężenie } [\mu\text{g/ml}])$$

- współczynnik determinacji $R^2 = 1$
- LOD = 0,1 $\mu\text{g/ml}$, LOQ = 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (S/N = 245 dla stężenia 0,1 $\mu\text{g/ml}$)
- metoda jest precyzyjna (na podstawie niskich wartości RSD% czasów retencji jak i pól powierzchni pików w ocenie jedno- i międzydniowej) (załącznik).

Przykładowy chromatogram roztworu wzorcowego ROX przedstawiony jest na rycinie 35.



Rycina 35. Przykładowy chromatogram roztworu wzorcowego ROX o stężeniu 25 µg/ml.

5.1.4.2. Oznaczenie procentowej zawartości roksytromycyny w cząstkach (% inkorporacji)

Stężenie ROX oznaczano przy pomocy opracowanej i zwalidowanej wcześniej metody HPLC. Procent inkorporacji ROX w cząstkach wyznaczono metodą pośrednią, często spotykaną w piśmiennictwie (Shah *et al.*, 2007; Elnaggar *et al.*, 2011; Gokce *et al.*, 2012) i przedstawiono w tabeli 13. Wartość ta była jednym z parametrów służących do selekcji najlepszej formulacji, użytej do dalszych badań (m.in. stabilności fizycznej). Po badaniu stopnia inkorporacji, odrzucono dyspersje A, które, w porównaniu z zawiesinami B, mają dwa razy więcej lipidów, a nieco mniejszą inkorporację. Odrzucono także formulacje C, które wykazują najniższą inkorporację oraz największy rozrzut wyników. Zauważono przy tym, że wszystkie cząstki otrzymane na drodze sonikacji mają nieco niższą inkorporację ROX niż cząstki przygotowane z użyciem homogenizacji szybkoobrotowej i ultradźwiękowej.

Tabela 13. Średnie wartości % inkorporacji ROX w cząstkach poszczególnych formułacji
(\pm RSD%, n = 3)

Formulacja	Średnia inkorporacja ROX w cząstkach [%] \pm RSD%
A MS	78,7 \pm 3,2%
A S	72,4 \pm 5,38%
B MS	86,2 \pm 0,89%
B S	82,1 \pm 3,56%
C MS	63,0 \pm 23,49%
C S	61,1 \pm 16,83%

5.1.5. Wartość pH formułacji

Wszystkie badane dyspersje charakteryzowały się lekko zasadowym odczynem pH (tabela 14).

Tabela 14. Wartości pH formułacji

Formulacja	A MS	A S	B MS	B S	C MS	C S
Wartość pH	7,80	7,95	8,10	7,95	8,00	8,05

5.2. Uwalnianie *in vitro* roksytromycyny z formułacji B S

Oznaczanie ilości ROX uwolnionej z dyspersji B S wykonano techniką spektrofotometryczną. Na podstawie wartości absorbancji roztworów wzorcowych ROX przy długości fali 205 nm wykreślono krzywą wzorcową w zakresie stężeń: 10-200 μ g/ml. Następnie wyznaczono równanie regresji prostoliniowej:

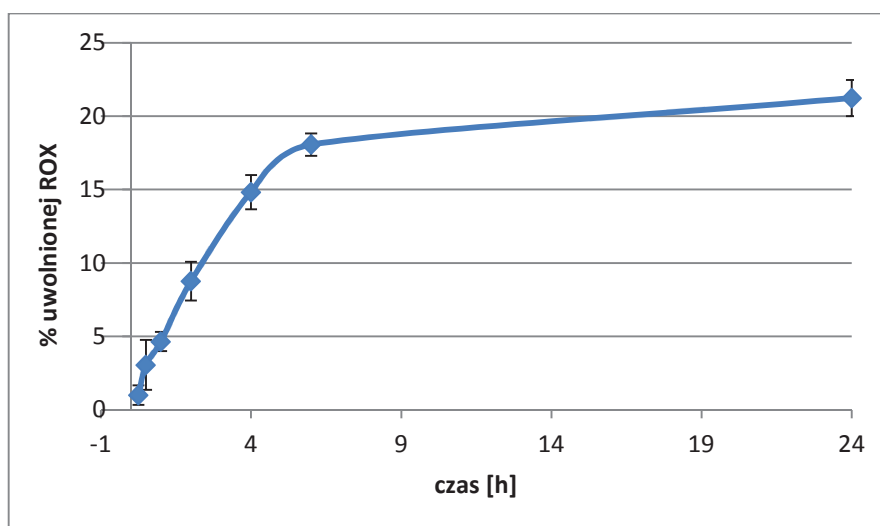
$$A = 0,006 c + 0,0424 \quad (A - \text{absorbancja}, c - \text{stężenie } [\mu\text{g/ml}])$$

Współczynnik determinacji R^2 wyniósł 0,9952.

Wyznaczonego równania użyto do obliczenia stężeń ROX uwolnionej z badanej formułacji.

Próbki pobierane z naczynia, w którym w adapterze był sam płyn akceptorowy, wykazywały przez cały czas badania absorbancję na poziomie 0,148, która była porównywalna z absorbancją próby placebo. Dlatego, aby uniknąć błędu, o taką wartość absorbancji pomniejszono absorbancję z prób, w których badana była formułacja B S.

W celu obliczenia ilości ROX uwolnionej z formułacji uwzględniono jej gęstość, która wynosi 0,99 g/ml. Zakładając 1% zawartość ROX w 0,5 ml zawiesiny B S poddawanej uwalnianiu, obliczono procent uwolnionej w określonych odstępach czasu ROX i przedstawiono tę zależność na rycinie 36.



Rycina 36. Uwalnianie ROX z formułacji B S (n = 5, średnia ± SD).

5.3. Badanie aktywności formułacji B S przeciw *Propionibacterium acnes* (Ph. Eur. 7.0)

W przypadku formułacji placebo zaobserwowano brak redukcji rozwoju drobnoustrojów, natomiast dla dwóch dyspersji B S z 1% i 0,5% zawartością ROX odnotowano 99,9% redukcji wzrostu *Propionibacterium acnes*.

5.4. Ocena potencjału drażniącego formułacji B S *in vitro*

Potencjał drażniący to powodowanie odwracalnych zmian zapalnych w skórze. Jego ocenę można wykonać w warunkach *in vitro*, ponieważ rola mechanizmów ogólnoustrojowych w powstawaniu lokalnej reakcji skórnej jest niewielka. Ludzki model naskórka *EpiDerm*®, jaki został użyty w tym celu, zachowuje funkcje barierowe naturalnej skóry, a jego profil lipidowy jest niemal identyczny jak *in vivo*. Przeżywalność jego komórek po zastosowaniu preparatu placebo wyniosła ok. 82%, natomiast po aplikacji formułacji z ROX – ok. 93%. W negatywnej próbie kontrolnej wynik przeżywalności wyniósł 100%, a w pozytywnej - 8%.

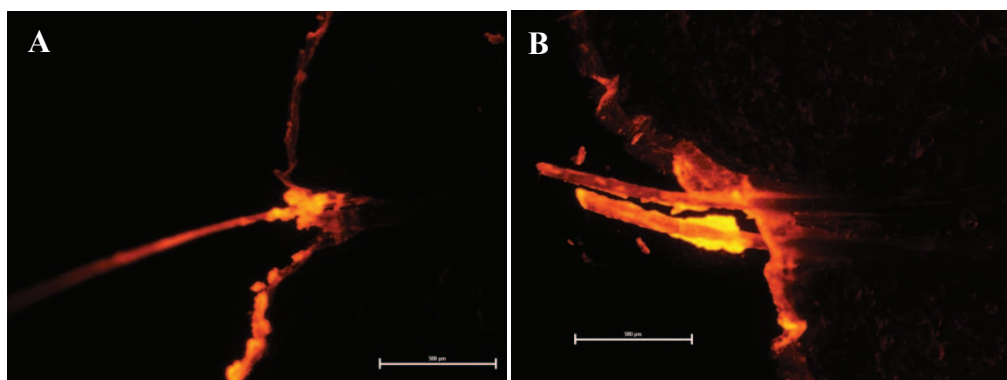
5.5. Obrazowanie wnikania cząstek do mieszków włosowych skóry ludzkiej *ex vivo*

5.5.1. Obrazowanie rozmieszczenia cząstek w skórze z okolicy klatki piersiowej

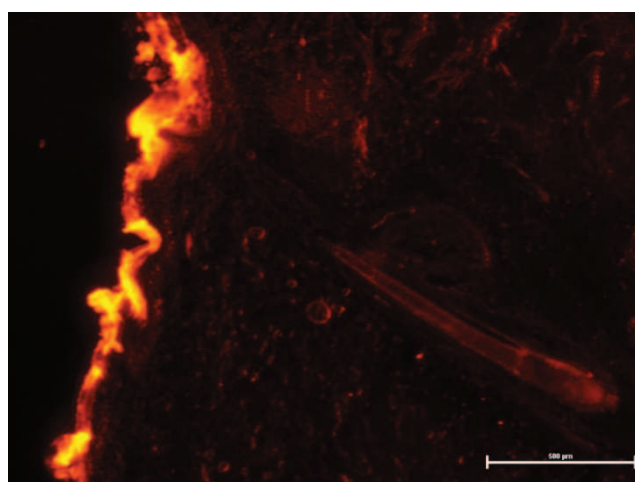
Ryciny 37A,B i 38 przedstawiają zdjęcia spod mikroskopu fluorescencyjnego przekrojów podłużnych skóry z okolicy klatki piersiowej. Przekroje wykonano po aplikacji dyspersji B S z uwzględnieniem masażu oraz godzinnej inkubacji w 37°C. Aplikowana formułacja gromadzi się wokół włókien włosowych. Na rycinie 38 widać fluorescencję w głębokiej części mieszka, aż do cebulki włosa.

Ryciny 39A,B przedstawiają zdjęcia przekrojów poprzecznych skóry *ex vivo* na różnej głębokości (po aplikacji formułacji B S z uwzględnieniem masażu oraz godzinnej inkubacji w 37°C). Fluorescencja jest widoczna nawet na głębokości > 1 mm.

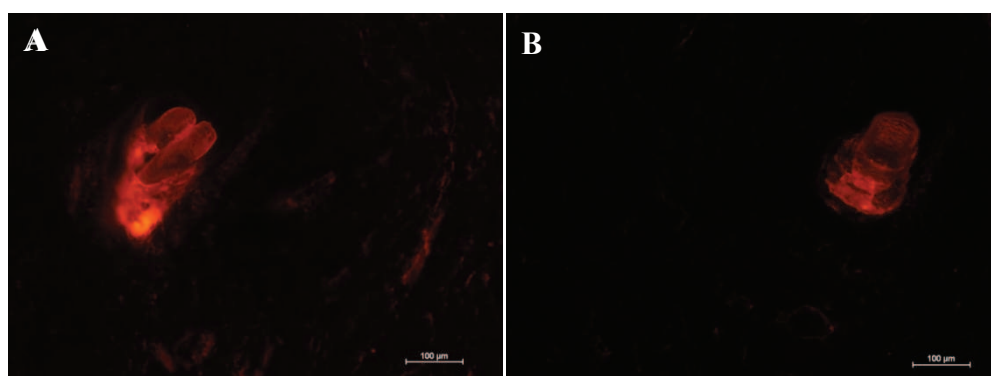
Kolejne ryciny (40A,B i 41A,B) przedstawiają zdjęcia cyjanoakrylowych biopsji zawartości mieszków włosowych. Uzyskano je ze skóry klatki piersiowej dzięki technice *differential stripping*. Na zdjęciach widoczna jest fluorescencja w załamaniach *stratum corneum* oraz wokół włókien włosowych.



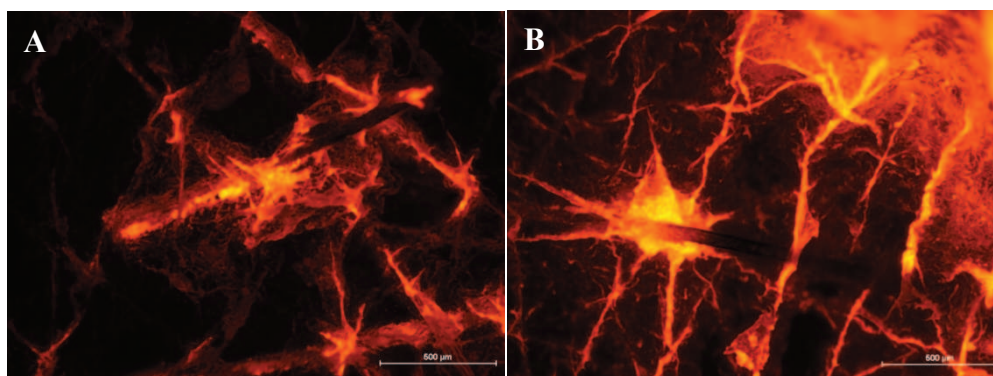
Ryciny 37A, B. Zdjęcia fluorescencyjne przekrojów podłużnych skóry z okolicy klatki piersiowej.



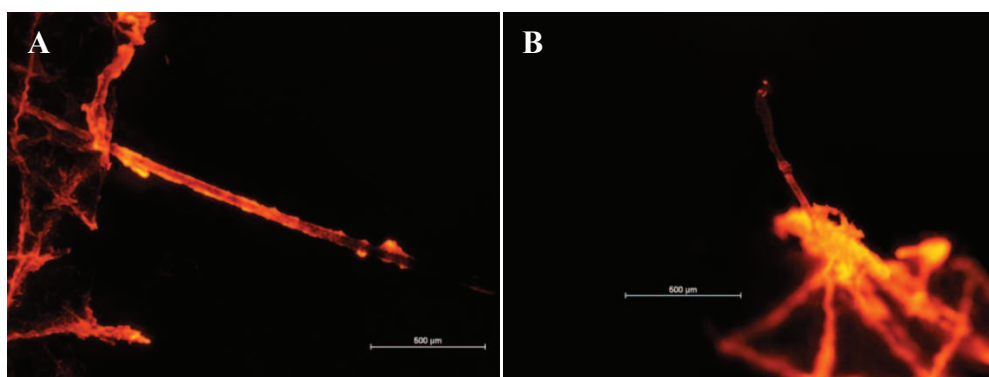
Rycina 38. Zdjęcie fluorescencyjne przekroju podłużnego skóry z okolicy klatki piersiowej.



Ryciny 39A, B. Zdjęcia fluorescencyjne przekrojów poprzecznych skóry z okolicy klatki piersiowej,
A - głębokość ok. 800 μm , B - głębokość ponad 1 mm.



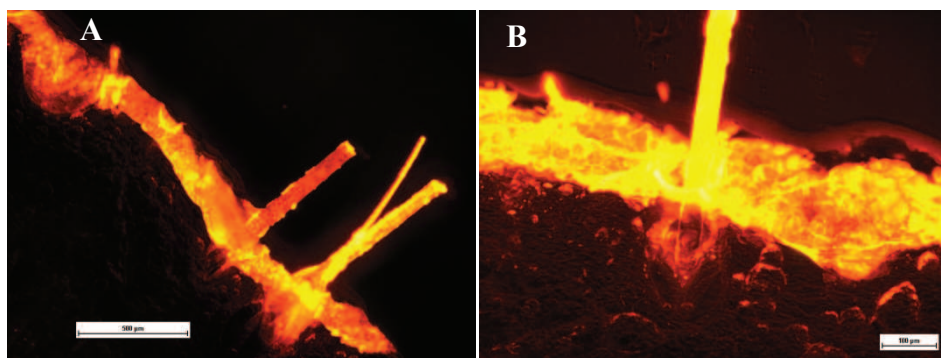
Ryciny 40A, B. Zdjęcia fluorescencyjne cyjanoakrylowych biopsji mieszków z okolicy klatki piersiowej.



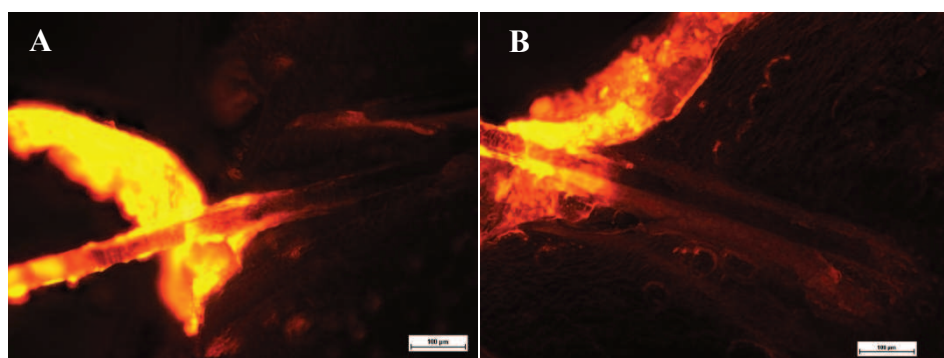
Ryciny 41A, B. Zdjęcia fluorescencyjne cyjanoakrylowych biopsji mieszków z okolicy klatki piersiowej.

5.5.2. Obrazowanie rozmieszczenia cząstek w skórze głowy

Ryciny 42 i 43 przedstawiają zdjęcia przekrojów podłużnych skóry owłosionej głowy wykonanych po 1 h od aplikacji preparatu (z uwzględnieniem masażu). Ryciny 42A,B ukazują przekroje po aplikacji olejowego roztworu RBHE, natomiast 43A,B – po aplikacji formułacji B S z RBHE.

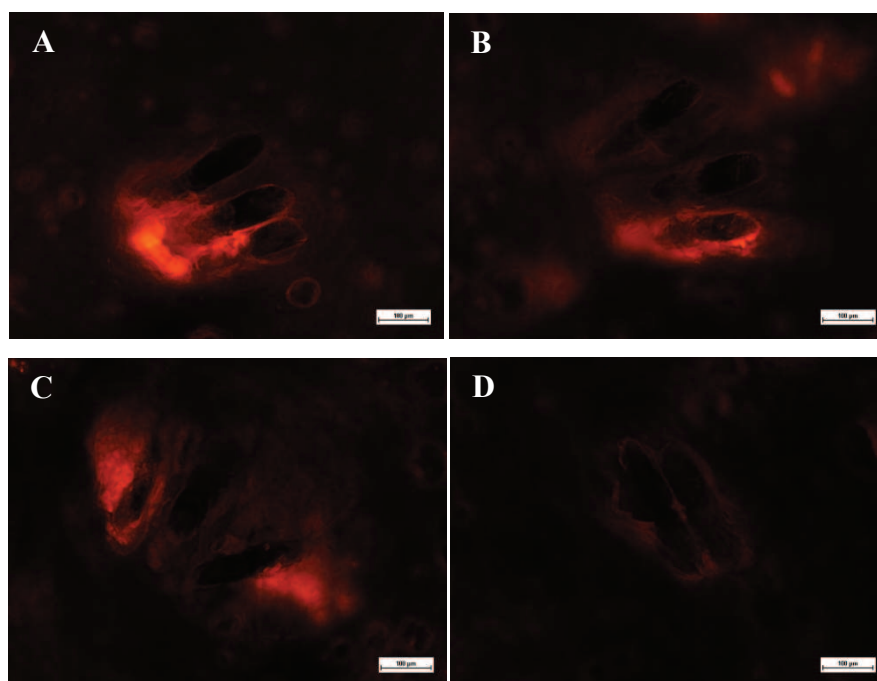


Ryciny 42A, B. Zdjęcia fluorescencyjne przekrojów podłużnych skóry głowy po aplikacji roztworu RBHE.

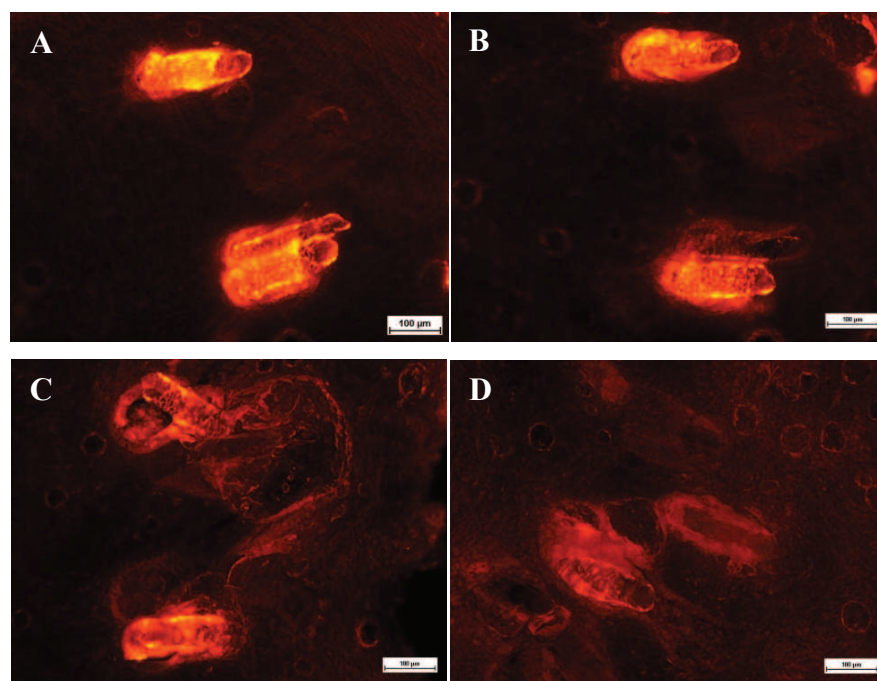


Ryciny 43A, B. Zdjęcia fluorescencyjne przekrojów podłużnych skóry głowy po aplikacji cząstek lipidowych z RBHE.

Ryciny 44 i 45 przedstawiają zdjęcia poprzecznych przekrojów skóry wykonanych po 5 min od aplikacji preparatu fluorescencyjnego. Zdjęcia umieszczone na rycinach 44A,B,C,D wykonano po aplikacji olejowego roztworu barwnika, natomiast kolejne (45A,B,C,D) - po aplikacji zawiesiny B S z RBHE. Wszystkie zdjęcia wykonano przy zbliżonym czasie naświetlania (600-800 ms) i oznaczono literami A-D w kierunku wzrastającej głębokości. Przedstawiają kolejne warstwy 100 µm w głąb skóry, poczynając od ok. 300 µm.

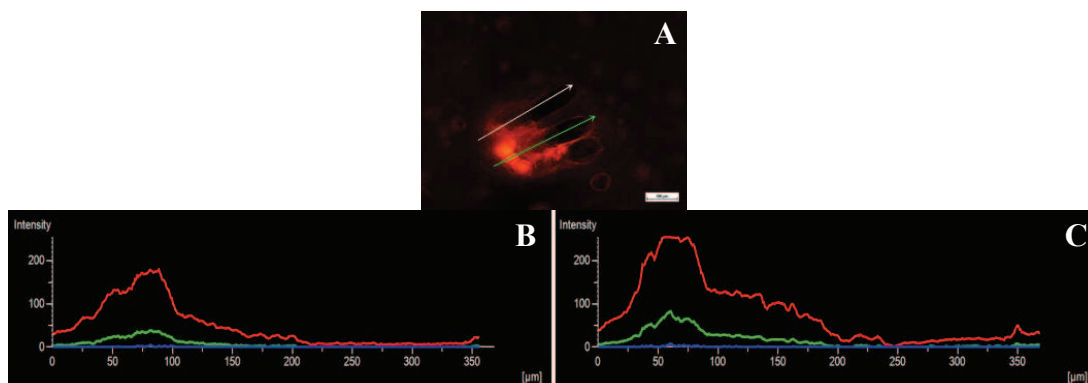


Ryciny 44A, B, C, D. Zdjęcia fluorescencyjne przekrojów poprzecznych skóry głowy po aplikacji roztworu RBHE.

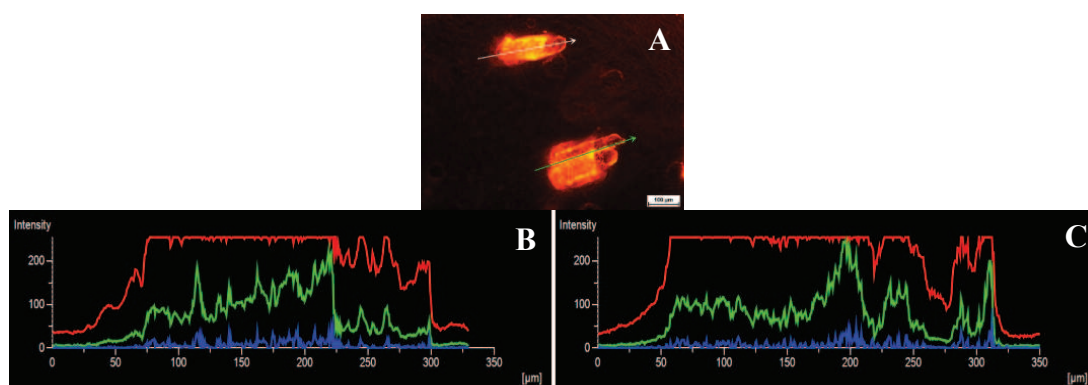


Ryciny 45A, B, C, D. Zdjęcia fluorescencyjne przekrojów poprzecznych skóry głowy po aplikacji formułacji B S z RBHE.

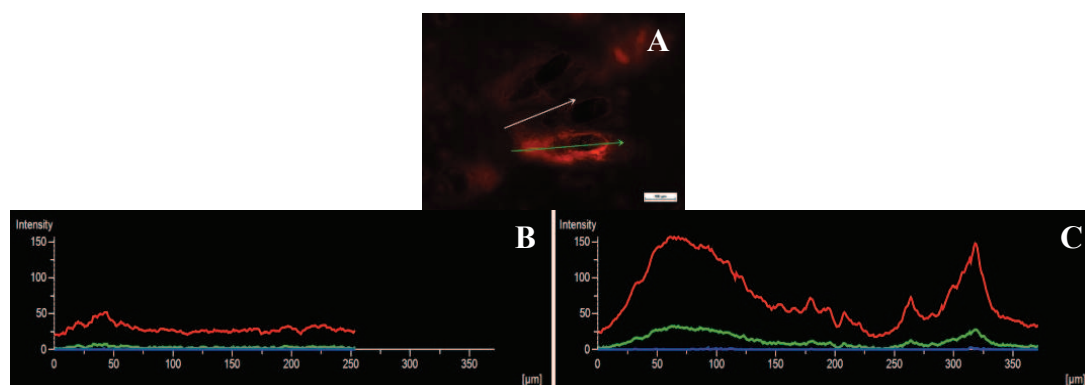
Zdjęcia przedstawione na rycinach 44 i 45 poddano komputerowej analizie intensywności fluorescencji w zależności od obszaru zdjęcia. Wyniki w postaci wykresów przedstawione są na rycinach 46-53. Analizowano fale o długości światła czerwonego, zielonego i niebieskiego, którym odpowiadają odpowiednie kolory na wykresach.



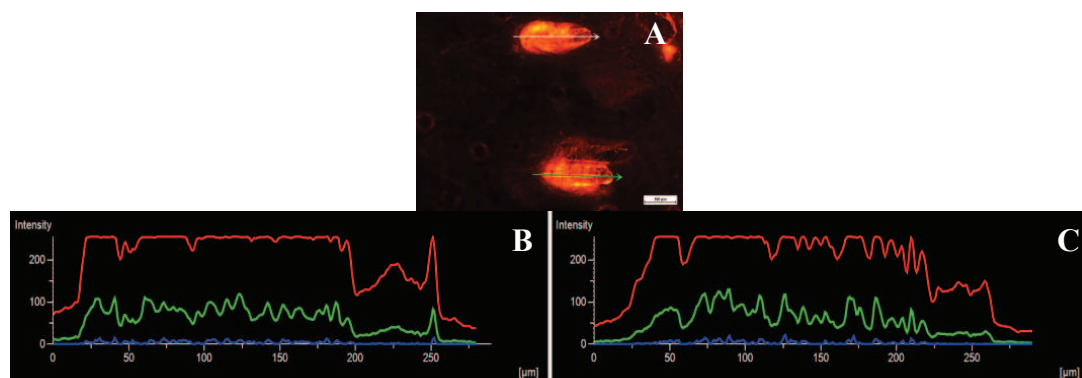
Ryciny 46A, B, C. Zdjęcie fluorescencyjne przekroju poprzecznego skóry głowy po aplikacji roztworu RBHE, warstwa pierwsza (A). Intensywność fluorescencji wzdłuż białej strzałki na rycinie A (B). Intensywność fluorescencji wzdłuż zielonej strzałki na rycinie A (C).



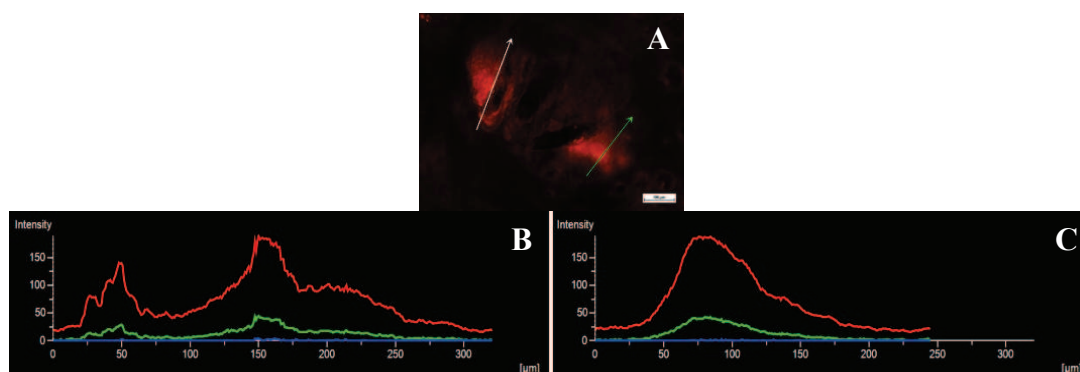
Ryciny 47A, B, C. Zdjęcie fluorescencyjne przekroju poprzecznego skóry głowy po aplikacji formułacji B S z RBHE, warstwa pierwsza (A). Intensywność fluorescencji wzdłuż białej strzałki na rycinie A (B). Intensywność fluorescencji wzdłuż zielonej strzałki na rycinie A (C).



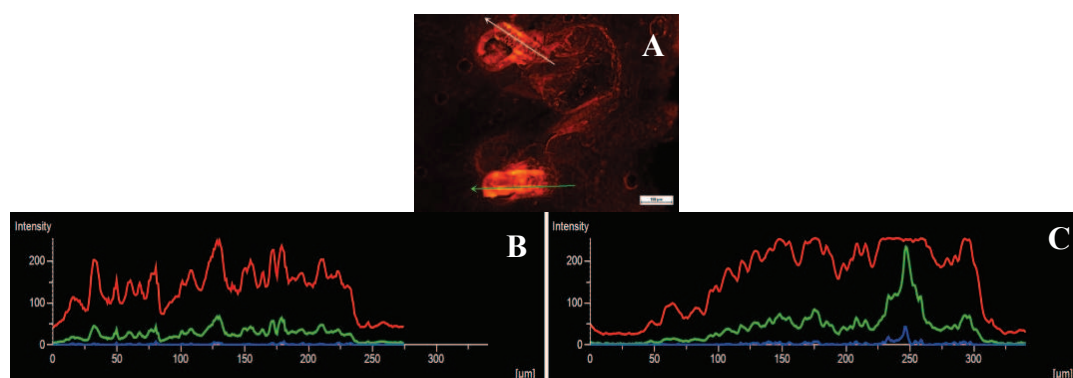
Ryciny 48A, B, C. Zdjęcie fluorescencyjne przekroju poprzecznego skóry głowy po aplikacji roztworu RBHE, warstwa druga (A). Intensywność fluorescencji wzdłuż białej strzałki na rycinie A (B). Intensywność fluorescencji wzdłuż zielonej strzałki na rycinie A (C).



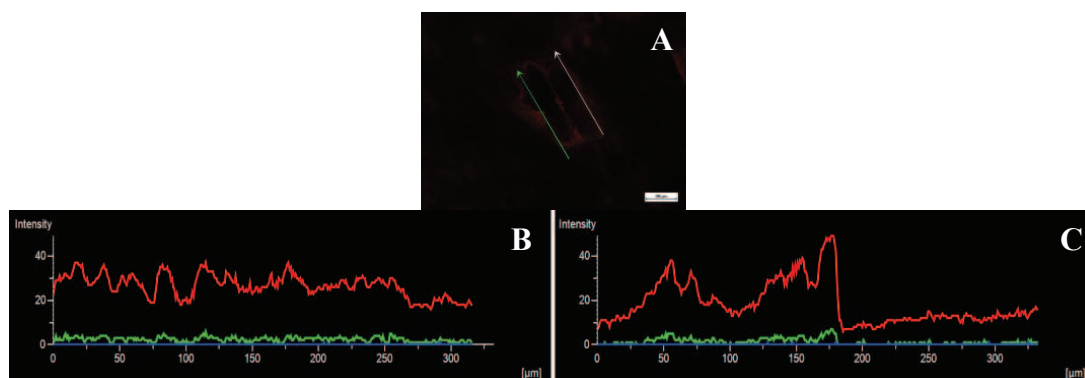
Ryciny 49A, B, C. Zdjęcie fluorescencyjne przekroju poprzecznego skóry głowy po aplikacji formułacji B S z RBHE, warstwa druga (A). Intensywność fluorescencji wzdłuż białej strzałki na rycinie A (B). Intensywność fluorescencji wzdłuż zielonej strzałki na rycinie A (C).



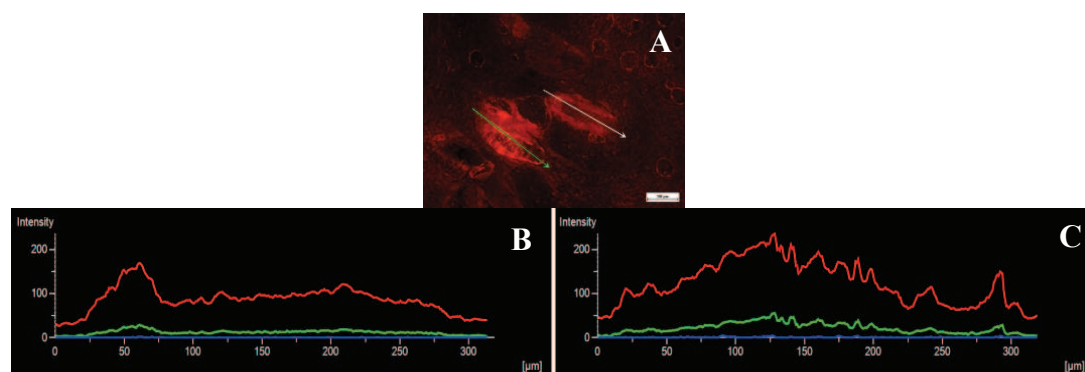
Ryciny 50A, B, C. Zdjęcie fluorescencyjne przekroju poprzecznego skóry głowy po aplikacji roztworu RBHE, warstwa trzecia (A). Intensywność fluorescencji wzdłuż białej strzałki na rycinie A (B). Intensywność fluorescencji wzdłuż zielonej strzałki na rycinie A (C).



Ryciny 51A, B, C. Zdjęcie fluorescencyjne przekroju poprzecznego skóry głowy po aplikacji formułacji B S z RBHE, warstwa trzecia (A). Intensywność fluorescencji wzdłuż białej strzałki na rycinie A (B). Intensywność fluorescencji wzdłuż zielonej strzałki na rycinie A (C).



Ryciny 52A, B, C. Zdjęcie fluorescencyjne przekroju poprzecznego skóry głowy po aplikacji roztworu RBHE, warstwa czwarta (A). Intensywność fluorescencji wzdłuż białej strzałki na rycinie A (B). Intensywność fluorescencji wzdłuż zielonej strzałki na rycinie A (C).



Ryciny 53A, B, C. Zdjęcie fluorescencyjne przekroju poprzecznego skóry głowy po aplikacji formułacji B S z RBHE, warstwa czwarta (A). Intensywność fluorescencji wzdłuż białej strzałki na rycinie A (B). Intensywność fluorescencji wzdłuż zielonej strzałki na rycinie A (C).

5.6. Penetracja cząstek do mieszków włosowych *in vivo* i oznaczanie roksytromycyny w pobranych biopsjach cyjanoakrylowych

Otrzymane w warunkach *in vivo* cyjanoakrylowe biopsje z obszarów przedramienia i łydki poddano ekstrakcji metanolem. W otrzymanych ekstraktach potwierdzono obecność oraz oznaczono zawartość ROX techniką HPLC-ESI-MS/MS.

Otrzymano krzywą kalibracyjną ROX o następującym równaniu:

$$y = -1795,50 x^2 + 5357,39 x + 46,61$$

i współczynnika determinacji: $R^2 = 0,9999$.

Tabela 15 przedstawia wyniki oznaczeń zawartości ROX w ekstraktach z pobranych biopsji. W przypadku 1% wodnej zawiesiny kryształów ROX, użytej jako próby kontrolnej, nie wykryto zawartości API w ekstraktach ani z biopsji pobranych z łydki, ani z przedramienia.

Tabela 15. Wyniki oznaczania zawartości ROX w poszczególnych biopsjach (n=3)

Obszar z którego pobrano biopsję	Czas penetracji (czas od wmasowania formułacji do przeprowadzenia <i>differential stripping</i>)	Średnia zawartość ROX w pojedynczej biopsji [μg] ± RSD% (n=3)	Średnia ilość ROX na powierzchnię 1cm² [μg/ cm²]
przedramię	30 min	15,2 ± 1,6%	3,041
przedramię	12 h	23,7 ± 2,1%	4,742
łydka	30 min	19,3 ± 2,4%	3,860
łydka	12 h	2,3 ± 0,3%	0,471

V OMÓWIENIE I Dyskusja Wyników

Nano- i mikrocząstki lipidowe zaliczane są do koloidalnych nośników substancji leczniczych (Mehnert *et al.*, 2001). Wykazują potencjalne zastosowanie jako systemy dostarczania leków drogą doustną, parenteralną, rektalną, także do oczu oraz zewnętrznie na skórę i błony śluzowe (Sznitowska *et al.*, 2001; Uner *et al.*, 2007). Jako matrycy do tworzenia cząstek używa się zarówno stałych lipidów (tri-, di- i monoglicerydów, wosków, kwasów tłuszczowych) jak i olejów (skwalen, oliwa z oliwek, Miglyol[®] 812) (Mehnert *et al.*, 2001; Gokce *et al.*, 2012). Na podstawie przeglądu piśmiennictwa oraz badań wstępnych z użyciem różnych lipidów, ostatecznie do wykonania formułacji wybrano behenian glicerolu (Compritol[®] 888 ATO) jako stały lipid oraz skwalen - olej naturalnie występujący w ludzkim sebum (Downie *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2008; Aljuffali *et al.*, 2014).

Aby otrzymać zawiesinę cząstek lipidowych o odpowiedniej wielkości i stabilności niezbędny jest emulgator. Używa się lecytynę, Tween 20, 40, 80 (Mehnert *et al.*, 2001; Gokce *et al.*, 2012). Jednak do najczęściej używanych związków powierzchniowo czynnych należą Poloxamery - niejonowe blokowe kopolimery tlenku etylenu i propylenu. W wykonywanych zawiesinach użyto Poloxameru 188 o średniej masie cząsteczkowej 7680–9510 i liczbie HLB > 24 (Rowe *et al.*, 2012). Stężenie lipidów w zawiesinach, zgodnie z danymi literaturowymi, mieści się w granicach 5-40%, natomiast stężenie surfaktantów: 0,5-5% (Schafer-Korting *et al.*, 2007; Abdelbary *et al.*, 2009). W celu wykonania opisywanych zawiesin użyto 5% i 10% lipidów matrycowych oraz 2,5% emulgatora (tabela 6).

Piśmiennictwo, poza jednym wyjątkiem (Ito *et al.*, 2009), nie dostarcza informacji na temat zewnętrznego stosowania ROX. Dlatego przy ustalaniu jej stężenia w opracowywanych zawiesinach wzięto pod uwagę dostępne na rynku farmaceutycznym preparaty do stosowania na skórę, zawierające erytromycynę (np. Davercin, Aknemycin), której pochodną jest ROX. Zawierają one średnio 2-2,5% erytromycyny i stosowane są w leczeniu trądziku. W danych literaturowych można spotkać bardzo odmienne wartości MIC erytromycyny wobec *Propionibacterium acnes*. Poza tym bardzo dużo szczepów *P. acnes* jest opornych

na ten antybiotyk. Ross *et al.* (2001) uznali stężenie 0,5 µg/ml za graniczne MIC erytromycyny między opornymi, a wrażliwymi szczepami *P. acnes*. ROX stosowana jest do tej pory tylko wewnętrznie w terapii trądziku. Akamatsu *et al.* (2002) wyznaczyli jej MIC dla *P. acnes* - wyniosło ono 0,1 µg/ml. Dodatkowo ROX, stosowana zewnętrznie w badaniu *in vivo* w stężeniu 0,5%, okazała się skuteczna w hamowaniu wypadania włosów (Ito *et al.*, 2009). Biorąc pod uwagę to nowe zastosowanie oraz niższe MIC roksytromycyny niż erytromycyny wobec *P. acnes*, w opracowywanych formułacjach użyto 1% stężenia ROX.

Cząstki lipidowe otrzymano techniką homogenizacji szybkoobrotowej w połączeniu z ultradźwiękową, a jako drugą metodę w opisywanym projekcie zastosowano, dotychczas niespotykaną w publikacjach naukowych, samą sonikację. Jest to metoda mniej skomplikowana i dużo szybsza, ponieważ pomija jeden etap homogenizacji. W piśmiennictwie spotkać można różne warunki sonikacji: od kilku do 30 min przy zróżnicowanej temperaturze oraz częstotliwości i amplitudzie fal ultradźwiękowych. Homogenizacja szybkoobrotowa natomiast najczęściej przeprowadzana jest przez 5-10 min przy prędkości 8000-20000 rpm (Casadei *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2008; Gokce *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2008; Puglia *et al.*, 2008; Abdelbary *et al.*, 2009; Ali *et al.*, 2010; Hsu *et al.*, 2011). Biorąc pod uwagę wyniki własnych wstępnych badań oraz cytowane piśmiennictwo przyjęto następujące warunki homogenizacji szybkoobrotowej: 10 min, 20000 rpm; i ultradźwiękowej: 10 min, częstotliwość 20 kHz, 80% amplitudy znamionowej końcówki. Niektórzy autorzy dodatkowo ogrzewają próbkę w trakcie jej sonikacji, aby utrzymać temperaturę o kilka stopni wyższą od temperatury topnienia lipidów (Casadei *et al.*, 2006; Puglia *et al.*, 2008). W zastosowanej procedurze tak jednak nie postąpiono, ponieważ pomiary temperatury podczas wstępnych badań udowodniły, że po sonikacji w przyjętych warunkach (dźwiękoszczelna komora) temperatura emulsji wynosi $80 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Analiza termiczna jest obecnie rutynowo stosowana w technologii farmaceutycznej, szczególnie na etapie preformulacji postaci leku. Powala mierzyć zmiany energii, jakie zachodzą w badanym materiale podczas jego ogrzewania i schładzania. Dzięki takiej analizie można obserwować zmiany stanu skupienia, zidentyfikować formę krystaliczną lub amorficzną analizowanej substancji, czy zbadać jej czystość. Analizie DSC poddano najpierw samą ROX, uzyskując

endotermiczny pik (charakterystyczny dla procesów topnienia) przy temperaturze 125,3°C (ryc. 23). Zbliżona temperatura topnienia ROX jest już odnotowana w literaturze (Biradar *et al.*, 2006). Po ochłodzeniu i ponownym ogrzaniu tej samej próbki ROX otrzymano tzw. przejście szkliste przy 84,47°C (ryc. 24). Proces ten jest charakterystyczny dla form amorficznych i dowodzi, że ROX po stopieniu przechodzi w taką właśnie formę (o mniejszym stopniu i zasięgu uporządkowania, niż forma krystaliczna). Podczas ogrzewania behenianu glicerolu zaobserwowano także wyraźny pik topnienia przy temperaturze 74,48°C (ryc. 26). Jest ona zgodna ze specyfikacją producenta i pozwala potwierdzić tożsamość oraz czystość Compritolu. Lipid, w odróżnieniu od ROX, po schłodzeniu i ponownym ogrzaniu nie wykazuje przejścia szklistego, tylko ponowny endotermiczny pik, potwierdzający zachowanie przez behenian glicerolu formy krystalicznej. DSC cząstek lipidowych z ROX uwidacznia tylko jeden endotermiczny pik przy temperaturze ok. 74°C, co wskazuje że odpowiada on topnieniu lipidowej matrycy (ryc. 27). Brak jest natomiast pików przy 125°C, który odpowiadałby topnieniu ROX. Można na tej podstawie przypuszczać, że ROX inkorporowana do matrycy lipidowej jest w niej rozpuszczona, co może świadczyć o skutecznej inkorporacji lub znajduje się w formie amorficznej (Das *et al.*, 2012; Gokce *et al.*, 2012). Przygotowana dla porównania mieszanina fizyczna ROX i Compritolu (przez wymieszanie w moździerz, bez stapiania) w analizie DSC wykazuje pik topnienia lipidu przy ok. 74°C i szeroki pik przy ok. 120°C, który może wskazywać na topnienie ROX (ryc. 28). Jego przesunięcie i poszerzenie może być też efektem częściowej amorfizacji ROX pod wpływem mieszania w moździerz. Ostateczne wyjaśnienie tego zachowania wymagałoby dalszych badań.

Zdjęcia TEM (ryc. 31-33) wykonane dla wszystkich formułacji pokazują cząstki o kulistym kształcie, lecz różniące się wielkością. Formułacje A MS i B S wydają się mieć najbardziej jednorodne i najmniejsze cząstki, jednak trudno jednoznacznie stwierdzić na podstawie zdjęć, który skład formułacji jest najlepszy i która metoda otrzymywania cząstek jest najkorzystniejsza. Zdjęcia AFM (ryc. 34A, B), choć obrazujące cząstki otrzymane w badaniach wstępnych, potwierdzają ich kulisty kształt.

Biorąc pod uwagę wyniki pomiarów wielkości cząstek (tabela 10), można stwierdzić, że najbardziej homogeniczna jest formułacja B S – wszystkie jej cząstki

mają wielkość nieprzekraczającą 300 nm i są jednocześnie najmniejsze. Jest to formuacja z najmniejszą zawartością lipidów. Wynik ten jest zgodny z wnioskami z innych prac, w których zwiększenie stężenia lipidów, skutkowało większą średnicą uzyskiwanych cząstek (Mehnert *et al.*, 2001; Tiyaboonchai *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2012). W rozcieńczonych zawiesinach ultradźwięki rozprzestrzeniają się bardziej równomiernie i skuteczniej rozbijają zawieszony lipidy. Dla dwóch z trzech formuacji (B i C) mniejszą średnicę cząstek uzyskuje się wykorzystując tylko ultradźwięki. Jest to widoczne zarówno w rezultatach pomiarów aparatem Mastersizer, który obejmuje swoim zakresem pomiarowym wielkości rzędu μm , jak i w wynikach z Zetasizera, który mierzy wielkości w zakresie nm. Średnice cząstek w zawiesinach A MS i C MS są bardzo zbliżone. Obie dyspersje zawierają 10% lipidów, jednak formuacja C MS ma 4% oleju, natomiast A MS ma tylko lipidy stałe w temperaturze pokojowej (tabela 6). Może być to przyczyną faktu, że zawiesina A S ma największe cząstki (prawie 100 μm) (tabela 10). W przypadku formuacji A, zastosowanie samych ultradźwięków jako metody otrzymywania (A S), nie skutkuje mniejszymi cząstkami niż te, otrzymane drugą metodą (A MS). Wydaje się, że same ultradźwięki nie są w tym przypadku wystarczające do rozbicia tak dużej objętości lipidów. Oceniając wielkość cząstek tylko na podstawie wyników pomiarów aparatem Zetasizer, można by wyciągnąć fałszywy wniosek, że wszystkie zawiesiny (poza A S) mają cząstki o średnicy < 600 nm. Tymczasem widać wyraźnie, że cząstki wszystkich dyspersji (poza B S) mają nawet kilkadziesiąt μm średnicy. Dlatego pomiary w obu zakresach wielkości są konieczne do obiektywnej oceny średnicy otrzymywanych cząstek. Niektórzy autorzy wykonują pomiary w obu zakresach i zamieszczają ich wyniki (Mitri *et al.*, 2011). Jednak w wielu publikacjach charakteryzujących nanocząstki (Chen *et al.*, 2006; Teeranachaideekul *et al.*, 2007a; Tiyaboonchai *et al.*, 2007; Farboud *et al.*, 2011; Gokce *et al.*, 2012), pomiary w zakresie μm są pomijane. Wydaje się, że autorzy z góry przyjmują, iż powstające cząstki są tylko wielkości „nano”. Może być to poważnym brakiem w charakterystyce formuacji. Wyniki pomiarów aparatem Zetasizer potwierdzają, że mniejszą średnicę cząstek dyspersji B i C pozwala uzyskać sama sonikacja. Cząstki otrzymane tylko drogą homogenizacji ultradźwiękowej mają w każdym przypadku niższy PDI niż te, otrzymane alternatywną metodą. Najniższą wartością współczynnika charakteryzuje się zawiesina C S. Formuacja B S ma nieco wyższy

PdI, ale nieprzekraczający wartości 0,3, którą przyjmuje się za umowną granicę przy określaniu jednorodności zawiesin. Polidispersja dyspersji nie pozostaje także bez wpływu na ich trwałość.

Das *et al.* (2012) wykorzystali Compritol wraz z olejem (Labrafac CC) do wytworzenia zawiesin NLC. Stosunek stałego do ciekłego lipidu wynosił kolejno: 4:1; 3:2; 2,5:2,5; 2:3 i 1:4 przy 3% emulgatora. Zaobserwowano wzrost średnicy cząstek wraz ze wzrostem stężenia oleju. Docelowo autorzy wybrali 5% Compritolu do stworzenia matrycy lipidowej, 3% surfaktantu - Cremophore EL oraz 10 min sonikacji. Są to parametry częściowo zbliżone do zastosowanych w opisywanym projekcie.

Casadei *et al.* (2006) nie zaobserwowali pozytywnego wpływu sonikacji przy otrzymywaniu cząstek lipidowych. Wprawdzie PdI cząstek po sonikacji w większości przypadków był nieco niższy, ale ich wielkość była większa w porównaniu z cząstkami otrzymanymi tylko drogą homogenizacji szybkoobrotowej. Używali oni jednak innego lipidu (distearynian glicerolu) oraz dodatkowego emulgatora (cholan sodu) w celu otrzymania dyspersji. Z kolei Esposito *et al.* (2008) porównywali cząstki przygotowane metodą samej homogenizacji szybkoobrotowej oraz homogenizacji szybkoobrotowej z następczą sonikacją. Doszli do wniosku, że druga metoda pozwala otrzymać bardziej stabilne i homogeniczne dyspersje.

Na podstawie wyników pomiarów wielkości cząstek i polidispersji wybrano jedną, najbardziej jednorodną formuację – **B S**, którą poddano badaniu krótko- i długoterminowej stabilności fizycznej (tabela 11). Po trzy serie (X, Y, Z) zawiesiny przechowywano w każdej z trzech różnych temperatur: 4, 25, 40°C przez 26 tygodni. W próbkach przechowywanych w temperaturze 25 i 40°C cząstki zachowują wyjściową wielkość (poniżej 180 nm) przez cały czas badania, czyli przez ponad pół roku. Wzrasta jedynie w niewielkim stopniu ich PdI, jednak w końcowym etapie nie przekracza wartości 0,3 dla zawiesin przechowywanych w 25°C. W temperaturze 40°C po 6 miesiącach wartości PdI również są zadowalające, tylko dla jednej serii współczynnik ten wynosi nieco ponad 0,3. W przypadku serii przechowywanych w najniższej temperaturze (4°C) już po pierwszym tygodniu obserwować można wzrost wielkości cząstek do ok. 230 nm i PdI do ok. 0,275. Wzrost ten następuje dalej w czasie, przy czym zauważalny jest duży rozrzut wyników. Po 4 tygodniach

(krótkoterminowa stabilność fizyczna) PdI wynosi średnio 0,768, natomiast średnia wielkość cząstek powyżej 2,5 μm . Po 26 tygodniach (długoterminowa stabilność fizyczna) współczynnik wzrasta jeszcze do ok. 0,854, a średnica cząstek do prawie 3 μm . Zaobserwowano przy tym wizualnie znaczny wzrost gęstości zawiesin w 4°C już po drugim tygodniu przechowywania, co znacząco utrudniało przygotowanie próbek do pomiarów. W związku z tym ich wyniki mogą być niewiarygodne, mogą dotyczyć aglomeratów, a nie pojedynczych cząstek. Dla próbek przechowywanych w 25 i 40°C nie zaobserwowano ani zmiany gęstości ani sedymentacji. Jest to niezgodne z niektórymi danymi z piśmiennictwa. W większości przypadków niska temperatura sprzyja stabilności zawiesin (Mitri *et al.*, 2011). Freitas *et al.* (1998) odnotowali zadowalającą stabilność dyspersji z 10% Compritolu i 1,2% Poloxameru 188 przez 3 lata w 8°C. Zaobserwowano, że wzrost energii dostarczanej do układu (np. w postaci światła lub wzrostu temperatury) powoduje destabilizację zawiesiny. Dyspersje behenianu glicerolu stabilizowane Poloxamerem są bardzo podatne na proces żelowania. Badania potwierdzają ich szybką destabilizację po dodaniu roztworów elektrolitów. Obserwowano wtedy znaczny spadek wartości potencjału Zeta, a w konsekwencji silną agregację cząstek oraz zamiast rozdziału faz - zmianę konsystencji zawiesin na półstałą, kremową. Autorzy wiążą zmianę konsystencji/gęstości dyspersji z przemianami polimorficznymi lipidów. Forma β' - bardziej stabilna energetycznie, o większych kryształach, jest odpowiedzialna za tworzenie żelowej sieci. Jednym z czynników wywołujących te przemiany może być zbyt mała ilość surfaktantu. Cząstki są niedokładnie pokryte jego warstwą, agregują wtedy łatwiej i szybciej (Freitas *et al.*, 1999a; Freitas *et al.*, 1999b).

Wielkość potencjału Zeta, który uzależniony jest od ładunku powierzchniowego cząstek (dokładniej elektrycznej warstwy podwójnej na ich powierzchni) wskazuje jaka jest potencjalna stabilność układów koloidalnych. Cząstki o dużych wartościach potencjału odpychają się wzajemnie i tworzą stabilną dyspersję, natomiast cząstki o niskich wartościach potencjału wykazują tendencje do agregacji destabilizującej zawiesinę. Za umowną granicę wartości korzystnego potencjału przyjmuje się ok. $|30|$ mV (Hao *et al.*, 2011; Gokce *et al.*, 2012). Wyznacza się go poprzez pomiar mobilności elektroforetycznej cząstek w polu elektrycznym. Wszystkie z badanych dyspersji wykazują ujemny potencjał Zeta (tabela 12), który może wynikać z uwalniania, w wyniku hydrolizy, wolnych

kwasów tłuszczowych z lipidów tworzących matrycę cząstek (Hao *et al.*, 2011). Zawiesiny badane w dniu wytworzenia charakteryzuje potencjał ok. -30 mV. W przypadku wszystkich badanych prób, przechowywanych w trzech różnych temperaturach, obserwuje się spadek bezwzględnych wartości potencjału z czasem. W przypadku zawiesin przechowywanych w najniższej temperaturze jest on największy, natomiast dla prób przechowywanych w temperaturze 40°C - najmniejszy – po 26 tygodniach pozostaje na poziomie ok. -18 mV. Zawiesiny przechowywane w 25°C charakteryzują się potencjałem ok. -14 mV po 26 tygodniach, co przy stabilizacji sterycznej (uzyskiwanej dzięki zastosowaniu Poloxameru jako surfaktanta) może być wartością wystarczającą (Freitas *et al.*, 1998; Mitri *et al.*, 2011). Potwierdzają to średnice cząstek oraz wartości PDI, które zmieniają się w bardzo niewielkim stopniu po ponad 6 miesiącach przechowywania w 25 i 40°C.

Wyniki zamieszczone w tabelach 11 i 12 pozwalają stwierdzić, że zarówno temperatura 25°C jak i 40°C jest odpowiednia do przechowywania badanych zawiesin. Pozwala im zachować zadowalającą krótko- i długoterminową stabilność fizyczną.

W piśmiennictwie opisanych jest niewiele procedur analitycznych służących do oceny stopnia inkorporacji API w cząstkach lipidowych. Ze względu na trudność w odseparowaniu lipofilowego API od lipidowej matrycy, większość metod polega na oznaczeniu tej części substancji leczniczej, która nie jest zainkorporowana w cząstkach (Hu *et al.*, 2004a; Souto *et al.*, 2004; Abdelbary *et al.*, 2009; Gokce *et al.*, 2012). Są to metody pośrednie. Taką posłużono się również w niniejszej pracy. W tym celu opracowano i zwalidowano nową metodę oznaczania roksytromycyny techniką HPLC z detekcją spektrofotometryczną. Metody opisane w piśmiennictwie wykorzystują detekcję fluorescencyjną (Głowka *et al.*, 2007), elektrochemiczną (Pappa-Louisi *et al.*, 2002) lub spektrofotometryczną (Macek *et al.*, 1999; Ostrowski *et al.*, 2010). Rozpuszczalnikiem organicznym w fazie ruchomej jest najczęściej metanol (Macek *et al.*, 1999; Pappa-Louisi *et al.*, 2002) lub acetonitryl (Pappa-Louisi *et al.*, 2002; Ostrowski *et al.*, 2010). W opracowanej metodzie użyto acetonitrylu oraz buforu fosforanowego (pH 5,8) w stosunku 1:1. FP IX proponuje chromatografię cieczową z elucją gradientową i czasem retencji ROX wynoszącym ok. 12 min (Farmakopea Polska, 2011). Jednak opracowaną metodę charakteryzuje

dużo krótszy czas retencji ROX (ok. 4,5 min) oraz mniejsze zużycie rozpuszczalnika organicznego.

Procent inkorporacji ROX w cząstkach uznano za ważny parametr, świadczący o jakości formulacji. Posłużono się nim, tak jak i wielkością cząstek, do selekcji najlepszej formulacji, użytej do dalszych badań. Formułacje A i C z 10% zawartością lipidów charakteryzuje mniejsza inkorporacja niż formułacje B z 5% lipidów matrycowych (tabela 13). Dyspersje C, z mieszaną matrycą lipidową, zawierają najmniej ROX (nieco powyżej 60%) i mają największe względne odchylenia standardowe. Można domniemywać, że dodatek skwalenu nie sprzyja inkorporacji ROX. Biorąc pod uwagę sposób otrzymywania zawiesin, można zauważyć, że w przypadku każdej z 3 formułacji, inkorporacja jest o kilka % mniejsza w dyspersjach otrzymanych drogą sonikacji w porównaniu z analogicznymi zawiesinami przygotowanymi alternatywną metodą. Homogenizacja szybkoobrotowa najwyraźniej korzystnie wpływa na inkorporowanie API. Prawdopodobnie duża część ROX podczas tego procesu jest już wiązana w zestalających się lipidach. Następca sonikacja jedynie zmniejsza wielkość cząstek i/lub ich polidyspersję. Za najkorzystniejsze uznano dyspersje B, które przy najmniejszej zawartości lipidów charakteryzują się największą ilością ROX zainkorporowanej w lipidowych matrycach (82-86%).

W badaniach Abdelbary *et al.* (2009) otrzymano cząstki lipidowe metodą bardzo zbliżoną do zastosowanej w opisywanym projekcie: homogenizacja szybkoobrotowa (21000 rpm) - 10 min; sonikacja - 10 min; schładzanie do temperatury pokojowej. Wykorzystano 2 różne lipidy (behenian glicerolu, monostearynian glicerolu) w stężeniach 4,75% lub 9,5%; oraz 2 różne emulgatory (Poloxamer 188, Tween 80) w stężeniach 2,5% lub 5%. Zaobserwowano, że zwiększenie stężenia matrycy lipidowej skutkuje mniejszą inkorporacją leku (diazepam). Inkorporacja jest również niższa w przypadku zastosowania dwóch surfaktantów jednocześnie (w stosunku 1:1).

Chawla *et al.* (2011) przygotowali z wykorzystaniem ultradźwięków cząstki z Compritolu z 2,5% Poloxameru 188. Zweryfikowali czy zmienia się inkorporacja leku (aceklofenak) po 6 miesiącach przechowywania w 4, 40°C i temperaturze pokojowej. Okazało się, że % inkorporacji zmniejszył się bardzo nieznacznie - o mniej niż 1% we wszystkich przypadkach.

Biorąc pod uwagę potencjalne zastosowanie opracowanej formułacji – jako nośnika ROX do jednostki włosowo-łojowej, czyli środowiska zdecydowanie lipidowego, idealnie byłoby sprawdzić jak ROX uwalniana jest z cząstek do sebum. Symulowałyby to warunki fizjologiczne. Poza jednym przykładem (Rolland *et al.*, 1993) nie ma informacji w piśmiennictwie na temat takiego modelu uwalniania API. Musiał i Kubis (2003) mierzyli jedynie głębokość penetracji trietanolaminy do modelowego łożu skórniego, natomiast Rolland *et al.* (1993) przeprowadzili uwalnianie API z mikrosfer polimerowych w warunkach *in vitro* do sztucznego sebum. Autorzy nie podali jednak, ani jego pochodzenia, ani składu. W ciągu 24 h uwolniło się do niego prawie 90% API. Niestety, ludzkie sebum nie jest dostępne jako medium do uwalniania, a skomponowanie go samodzielnie i wykonanie takiego badania byłoby niezmiernie trudne. Dlatego próbowano użyć wodnego roztworu surfaktanta (0,5% laurylosiarczan sodu) który jest spotykany w piśmiennictwie jako płyn akceptorowy. Jednak przy takim medium zaobserwowano niekorzystne zmiany w błonie dializacyjnej, która po kilku godzinach prowadzenia doświadczenia pękała. Wybrano więc dejonizowaną i odgazowaną wodę, która także bywa używana jako płyn do uwalniania API z zawiesin cząstek lipidowych (Mitri *et al.*, 2011). Badaniu poddano formułację B S, która w świetle przedstawionych wcześniej wyników, uznana została za najlepszą. Aby mieć pewność, że cząstki lipidowe nie przedostaną się do płynu akceptorowego, użyto błony dializacyjnej 10 kDa MWCO (zatrzymuje ona 90% cząstek/cząsteczek o masie molowej większej niż 10 kDa). Wyniki tego badania w formie wykresu przedstawia rycina 36. Przez całą długość badania – 24 h – do płynu akceptorowego uwolniło się ok. 21% ROX. Lipidy tworzące matrycę cząstek nie rozpuszczają się w wodzie, dlatego można przyjąć, że nie uległy one degradacji podczas tego badania i nie uwolniły całej ilości zawartej w nich ROX. Została prawdopodobnie uwolniona ROX z powierzchni nośników. Znając % inkorporacji ROX w cząstkach formułacji B S – 82%, można obliczyć, że ok. 18% ROX to API „wolne”- niezainkorporowane w nośnikach. Ta frakcja na pewno przechodzi do płynu akceptorowego w pierwszej kolejności. Pozostałe 3% uwolnionej ROX może stanowić lek uwolniony z powierzchni cząstek. W podobnym doświadczeniu, gdzie badano uwalnianie luteiny z zawiesiny cząstek lipidowych do wody, autorzy po 24 h uzyskali ok. 10% luteiny w płynie akceptorowym. Nie podano tam jednak stopnia inkorporacji API. Autorzy testowali

również 3% roztwory surfaktantów (Tween 80 i Plantacare 810) jako media akceptorowe. W ciągu doby uwolniło się do nich mniej niż 5% API (Mitri *et al.*, 2011).

Teskac *et al.* (2010) charakteryzowali cząstki lipidowe z Compritolu o wielkości podobnej do nośników otrzymanych w opisywanych badaniach (~180 nm, PDI < 0,3). Jako surfaktantów użyli 1% lecytyny sojowej oraz 0,1% Poloxameru 188. Inkorporowanym API był resweratrol. Zbadano jego uwalnianie do wody przez błonę dializacyjną 12 kDa MWCO. W czasie 4 h uwolniło się prawie 90% resweratrolu, więcej niż dyfundowało z samego roztworu tego API (~ 70%), który stanowił próbę kontrolną. Jest to zastanawiające na tle wyników wykonanych badań, zwłaszcza że resweratrol (logP=3,3) jest jeszcze bardziej lipofilowy niż ROX. Autorzy wyjaśniają wyniki tego eksperymentu obecnością dwóch różnych surfaktantów i ewentualnym tworzeniem miceli przez fosfolipidy lecytyny. Przewidują oni nawet % inkorporacji API na podstawie wyników uwalniania. Porównując jego uwalnianie z cząstek z dyfuzją z roztworu, autorzy zauważają, że w ciągu pierwszych 15 min oznaczona ilość wolnego API jest taka sama (~ 15%) w obu próbach. Uznają to za API niezainkorporowane w nośnikach lipidowych. Ze względu na budowę cząsteczki resweratrolu Teskac *et al.* (2010) sugerują, że jest on umiejscowiony głównie na powierzchni cząstek lipidowych. Następne 60% API (uwolnione w ciągu kolejnych 160 min) według autorów pochodzi właśnie z powierzchni nośników. Ostatnie 15% resweratrolu, uwolnionego przez kolejne 100 min, pochodzi prawdopodobnie z wnętrza („jądra”) cząstek.

Jednostka włosowo-łojowa to miejsce powstawania trądziku, powszechnego schorzenia dermatologicznego. Z wykwitów trądzikowych izolowane są bakterie *Propionibacterium acnes* i to one uważane są za jedną z przyczyn powstawania tej choroby (Downie *et al.*, 2004; Zouboulis, 2004). Wpływają w szczególności na rozwój stanu zapalnego, uwalniając czynnik chemotaktyczny. Powoduje on gromadzenie się neutrofilów, które wytwarzają reaktywne formy tlenu. Dodatkowo bakteryjne lipazy, hydrolizując triglicerydy zawarte w sebum, tworzą wolne kwasy tłuszczowe. Te ostatnie wraz z reaktywnymi formami tlenu powodują powstawanie stanu zapalnego oraz degradację ścian mieszka włosowego oraz gruczołu łojowego. Dowiedziono, że ROX ma zdolność hamowania wytwarzania przez bakterie lipaz oraz czynnika chemotaktycznego dla neutrofilów (Akamatsu

et al., 2002; Chen *et al.*, 2002). Używana jest z dobrym skutkiem w doustnej terapii trądziku (Hayashi *et al.*, 2011). Nie ma jednak do tej pory żadnego preparatu ROX przeznaczonego do stosowania zewnętrznego. Badanie aktywności formułacji B S przeciw *P. acnes* zostało wykonane, aby potwierdzić zasadność ewentualnego zastosowania preparatu do miejscowego leczenia trądziku. Wyniki tego badania, wykonanego zgodnie z wytycznymi Ph. Eur. 7.0, są pozytywne. Zawiesina B S zarówno z 0,5%, jak i 1% ROX prawie w 100% hamuje rozwój badanego szczepu bakterii.

ROX, tak jak pozostałe antybiotyki makrolidowe, wiąże się z lipidami komórkowymi. Istnieją również doniesienia na temat jej przenikania i gromadzenia się w komórkach (Munic *et al.*, 2011). Dlatego w projekcie, będącym przedmiotem rozprawy, uwzględniono badanie cytotoksyczności wybranej formułacji. Pozwoliło to ocenić jej potencjał drażniący. Ewaluację dyspersji B S przeprowadzono w warunkach *in vitro* na ludzkim modelu naskórka *EpiDerm*[®]. Zarówno formułacja zawierająca 1% ROX, jak i ta z 0,5% ROX, nie wykazały właściwości drażniących. Przeżywalność komórek naskórka po ich zastosowaniu była wysoka (93%).

Inkorporacja API może zmniejszać jego właściwości drażniące. Piśmiennictwo dostarcza wielu przykładów pozytywnego wpływu inkorporacji API do nośników lipidowych na obniżenie potencjału drażniącego substancji inkorporowanej (Shah *et al.*, 2007). Mandawgade *et al.* (2008) zaobserwowali znaczne jego zmniejszenie w przypadku tretinoiny umieszczonej w lipidowych nanocząstkach w porównaniu do komercyjnego preparatu zawierającego jej wolną formę. Na tej podstawie można przypuszczać, że, choć wolna ROX może wykazywać pewne działanie cytotoksyczne, jej inkorporacja do nośników lipidowych znacząco zmniejsza ten efekt. Można sądzić, że stosowanie miejscowe opracowanej formułacji nie będzie wywoływać efektów drażniących skórę.

Autorzy przytoczonej już pracy (Teskac *et al.*, 2010) odnotowali skuteczniejszą aktywność cytostatyczną resweratrolu po jego inkorporacji do nośników lipidowych, co tłumaczą zwiększonym wnikaniem API w nośnikach do komórek. Sprawdzili również cytotoksyczność samych nośników. Śledzili losy nanocząstek z Compritolu (~180 nm) podczas inkubacji z ludzkimi keratynocytami. Już po 15 min zaobserwowali wniknięcie cząstek do komórek. Po 3 dniach obserwacji przemieszczania się nośników w keratynocytach, te ostatnie zachowały

swą wyjściową żywotność, nie zmieniła się także ich morfologia ani aktywność metaboliczna. Wyniki te również mogą potwierdzać brak cytotoksyczności opracowanych w tej pracy cząstek.

Aby wizualnie ocenić penetrację nośników lipidowych w skórze, ze szczególnym uwzględnieniem mieszków włosowych, wykonano formułację B S z lipofilowym barwnikiem fluorescencyjnym - estrem heksylovym nadchloranu rodaminy B. Oprócz różnych pochodnych rodaminy (Gokce *et al.*, 2008; Kuechler *et al.*, 2009) w podobnym celu używane są też inne barwniki, np. czerwień Nilu (Munster *et al.*, 2005; Rancan *et al.*, 2009; Morgen *et al.*, 2011), 5-izotiocyjanian fluoresceiny (Alvarez-Roman *et al.*, 2004), 5-aminofluoresceina (Patzelt *et al.*, 2011), fluoresceina sodowa (Lademann *et al.*, 2007), kumaryna-6 (Rancan *et al.*, 2009). Do badań użyto skóry ludzkiej *ex vivo*, podobnie jak w zbliżonych doświadczeniach (Rolland *et al.*, 1993; Toll *et al.*, 2004; Vogt *et al.*, 2006; Rancan *et al.*, 2009). Jednak niektórzy autorzy używają skóry pochodzącej od królików (Morgen *et al.*, 2011), chomików (Morgen *et al.*, 2011), szczurów (Rolland *et al.*, 1993), czy świńskiej (Alvarez-Roman *et al.*, 2004; Munster *et al.*, 2005; Lademann *et al.*, 2007; Patzelt *et al.*, 2011). Funkcjonuje opinia, że świńska skóra jest bardzo podobna do ludzkiej i w związku z tym jest odpowiednim materiałem do przeprowadzania eksperymentów przenikania (Lademann *et al.*, 2007; Lademann *et al.*, 2010). Co więcej, niektórzy badacze twierdzą, że świńskie mieszki włosowe mają zbliżoną wielkość do mieszków ludzkich włosów terminalnych i to uzasadnia zastosowanie takiej skóry w podobnych doświadczeniach (Patzelt *et al.*, 2011). Jednak bezdyskusyjnie najbardziej wartościowych wyników dostarczają badania z wykorzystaniem skóry ludzkiej.

W procedurę aplikacji preparatu włączono masaż, który jak wynika z wielu badań (Toll *et al.*, 2004; Lademann *et al.*, 2008; Knorr *et al.*, 2009), znacznie poprawia penetrację nośników do mieszków. Niektórzy badacze są zdania, że masaż stosowany w badaniach *in vitro* może naśladować poruszanie się włosów w mieszkach, jakie ma miejsce w warunkach *in vivo* (Patzelt *et al.*, 2011). Jednak brak jest jednolitej procedury przeprowadzania takiego masażu, aby wyniki różnych badań były porównywalne (Wosicka i Cal, 2010). W przeprowadzonym eksperymencie do wykonania 5-min masażu użyto masażera Atom Massager. Na zdjęciach przekrojów podłużnych skóry *ex vivo* z okolicy klatki piersiowej widać

wyraźnie, że aplikowana formuacja gromadzi się wokół włókien włosowych (ryc. 37A,B). Można obserwować fluorescencję w głębokiej części mieszk, aż do cebulki włosa (ryc. 38). Zdjęcia przekrojów poprzecznych, wykonanych na głębokości > 1 mm ukazują fluorescencję tylko dookoła włókien włosowych (ryc. 39A, B). Dowodzi to, że aplikacja nośnika lipidowego poparta masażem jest w stanie dostarczyć lek głęboko do mieszk włosowego i, co ważne, w sposób selektywny. Widać wyraźnie, że cząstki drogą foliularną docierają na tyle głęboko, aby osiągnąć nie tylko ujście gruczołów łojowych, ale także rejonu zawierającego komórki macierzyste, określanego jako *bulge*.

Münster *et al.* (2005) użyli ludzkiej skóry z głowy w celu zbadania przenikania cząstek lipidowych z barwnikiem fluorescencyjnym (czerwień Nilu). Nośniki miały średnicę < 500 nm, a matrycą był behenian glicerolu. Zaobserwowali silną fluorescencję w mieszkach włosowych na głębokości do 200 μm oraz głębiej w gruczołach łojowych (do 900 μm). W innym badaniu (Chen *et al.*, 2006) użyto świnińskiej skóry aby sprawdzić penetrację cząstek lipidowych (< 100 nm średnicy) z API wykazującym fluorescencję. Zaobserwowano ją tylko w naskórku i mieszkach włosowych. Oglądając przekroje poprzeczne skóry zauważono spadek fluorescencji w głębszych obszarach skóry aż do ok. 275 μm głębokości. Zarówno w jednym, jak i drugim doświadczeniu nie zastosowano masażu podczas aplikacji badanych formuacji.

Uzyskane w badaniu zdjęcia przekrojów podłużnych skóry głowy pozwalają wykazać różnicę w rozmieszczeniu barwnika aplikowanego w postaci olejowego roztworu oraz nośników lipidowych. Po aplikacji roztworu RBHE (ryc. 42A,B) widać bardzo silną fluorescencję na powierzchni skóry, brak jej natomiast w kanale włosa. Zdjęcia po zastosowaniu barwnika w nośniku lipidowym (ryc. 43A,B) uwidaczniają fluorescencję także w głębi mieszk włosowego. W celu zobrazowania penetracji RBHE w skórze, wykonano przekroje poprzeczne o grubości 100 μm , poczynając od ok. 300 μm w głąb skóry. Ryciny 44 i 45 pozwalają skonfrontować penetrację barwnika w postaci nośnika i roztworu na porównywalnych głębokościach. Na wszystkich zdjęciach widać selektywną fluorescencję wokół włókien włosowych, lecz na rycinach 45A–D intensywność tej fluorescencji jest znacznie większa, co pozwala sądzić, że barwnik w nośniku lipidowym skuteczniej penetruje do mieszków. Aby ilościowo porównać fluorescencję na zdjęciach

poddano je komputerowej analizie. Na podstawie otrzymanych wykresów można jednoznacznie stwierdzić, że intensywność fluorescencji w przypadku RBHE aplikowanego w nośniku jest wyraźnie większa. Dotyczy to szczególnie pierwszych dwóch warstw (ryc. 46 i 47 oraz 48 i 49).

W podobnym doświadczeniu, ale z użyciem świńskiej skóry *ex vivo*, Lademann *et al.* (2007) porównali penetrację barwnika fluorescencyjnego inkorporowanego do nośników polimerowych o wielkości 320 nm oraz w postaci roztworu. Badanie wykonali dwa razy: włączając masaż w procedurę aplikacji preparatów oraz aplikując formułację bez masażu. Zauważyli wyraźnie głębszą fluorescencję w mieszkach w przypadku użycia barwnika w nośnikach (~ 1500 μm), niż w roztworze (~ 500 μm), lecz tylko w wypadku fragmentów skóry na których zastosowano masaż. Próbki skóry, w które preparaty z barwnikiem nie były wmasowane, wykazały fluorescencję na porównywalnej, płytkiej głębokości (~ 300 μm).

Zdjęcia fluorescencyjne cyjanoakrylowych biopsji mieszków *ex vivo* ze skóry klatki piersiowej (ryc. 40A,B i 41A,B), uzyskane dzięki procedurze *differential stripping*, potwierdzają gromadzenie się barwnika wokół włókien włosowych. Biopsje, na których widać włos „wyjęty” wraz z zawartością z mieszka, uwidaczniają fluorescencję na powierzchni włosa. Ukazuje to drogę penetracji nośników lipidowych w mieszkach i dowodzi wnikania formułacji głęboko do kanałów włosowych.

Patzelt *et al.* (2008) przeprowadzili procedurę *differential stripping* dwukrotnie na tych samych fragmentach skóry pacjentów poddawanych zabiegom chirurgii plastycznej. Celem było ilościowe porównanie objętości mieszków włosowych w skórze w warunkach *in vivo* oraz *ex vivo*. Okazało się, że *ex vivo* ta objętość wynosi zaledwie ok. 10% objętości *in vivo*. Potwierdziło to przypuszczenia autorów, którzy twierdzą, że po wycięciu skóry włókna elastynowe otaczające mieszki kurczą się, zmniejszając jednocześnie objętość mieszków włosowych. Dlatego ilościowe wnioski na temat penetracji folikularnej *ex vivo* powinny być traktowane krytycznie, ponieważ mogą być zaniżone.

Mając na uwadze powyższe, przeprowadzono procedurę *differential stripping* także w warunkach *in vivo*, w taki sam sposób w jaki wykonano ją *ex vivo*. Po jednorazowej aplikacji, czas pozostawiania formułacji na skórze (przed pobraniem

biopsji) wyznaczono ze względów praktycznych na 30 min i 12 h (w czasie 12h skóra była raz myta). Po ekstrakcji biopsji metanolem podjęto próbę oznaczenia zawartości ROX. Ze względu na spodziewane niskie stężenia API oraz duże „zanieczyszczenie” biopsji fizjologiczną zawartością mieszków włosowych, użyto techniki HPLC-ESI-MS/MS. Uzyskane rezultaty (tabela 15) nie są jednoznaczne ze względu na to, iż badanie *in vivo* miało charakter wstępny. Ilości ROX wyekstrahowanej z biopsji wykonanych na przedramieniu są dość zbliżone: ok. 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ po 30 min penetracji i 4,7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ po 12 h. Zastanawia jednak fakt, że po dłuższym czasie zostało w mieszkach nieco więcej ROX, która teoretycznie mogła zostać np. częściowo wypłukana przy myciu skóry. W przypadku biopsji z obszaru łydki wyniki są odmienne: po 30 min penetracji - 3,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, a po 12 h - 0,47 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Prawie dziesięciokrotnie mniejsza zawartość ROX po dłuższym czasie od aplikacji może wynikać właśnie z wymycia leku. Biorąc pod uwagę ilość ROX aplikowanej na powierzchnię skóry: 100 μl formułacji B S/5 cm^2 , co przy gęstości 0,99 g/ml daje 198 μg ROX/ cm^2 , ilości API wyekstrahowane z mieszków włosowych mieszczą się w granicach 0,24-2,4% aplikowanej ilości. Nie bez znaczenia dla omawianych wyników są różnice w średnicach otworów mieszków włosowych na różnych obszarach ludzkiego ciała przedstawione w pracy Otberg *et al.* (2004). Wykazali oni, że średnice te są dużo mniejsze w przypadku skóry przedramion (ok. 75 μm) niż na obszarze łydek (ok. 170 μm). Fakt ten był brany pod uwagę przy wyborze obszarów poddawanych procedurze *differential stripping*. Gęstość występowania mieszków na porównywanych obszarach ciała jest bardzo zbliżona, natomiast objętość mieszków (pomniejszona o włókno włosa) w przeliczeniu na cm^2 jest dużo większa na łydkach, niż na przedramionach. Wskazane różnice mogą niewątpliwie wpływać na efekt opisywanego etapu badań. Do większych otworów mieszkowych na łydkach łatwiej jest wprowadzić zewnętrznie lek w nośnikach i to w większej ilości, natomiast można przypuszczać, że również łatwiej i szybciej będzie on stamtąd eliminowany.

Niewiele jest prac, w których autorzy podejmują się ilościowego oznaczenia substancji penetrujących do mieszków włosowych w warunkach *in vivo*. Lademann *et al.* (2012) przeprowadzili jednak podobną procedurę na przedramionach (*differential stripping in vivo*) po 14 dniach codziennej aplikacji (2 razy dziennie) komercyjnego kremu z azotanem izokonazolu. Po 6 h od ostatniej aplikacji pobrali

cyjanoakrylowe biopsje, z których wyekstrahowali i oznaczyli techniką HPLC-ESI-MS/MS ilość API. Wyniosła ona średnio $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, co przy $20 \mu\text{g}$ API aplikowanych na każdy cm^2 stanowi 7,5%. Jest to wartość nieco większa niż otrzymana w badaniu, stanowiącym przedmiot rozprawy, jednak należy wziąć pod uwagę, że Lademann *et al.* wykonali biopsje po 28 aplikacjach preparatu. Udowodniono wcześniej, że mieszki włosowe stanowią długoterminowy zbiornik aplikowanych substancji (Lademann *et al.*, 2006), należy więc się spodziewać, że wielokrotne stosowanie spowoduje nagromadzenie się API w mieszkach. Jednocześnie taka właśnie aplikacja preparatu - co 12 h przez kilkanaście/kilkadziesiąt dni – jest bliska prawdziwym warunkom stosowania preparatów leczniczych na skórę.

VI WNIOSKI

1. Opracowano nową metodę otrzymywania cząstek lipidowych, wykorzystującą tylko ultradźwięki. Cząstki otrzymane tą metodą są mniejsze i bardziej jednorodne pod względem wielkości, niż te otrzymane przy wykorzystaniu homogenizacji szybkoobrotowej i ultradźwięków.
2. Otrzymano zawiesiny cząstek lipidowych o następującym składzie jakościowym: woda, behenian glicerolu, skwalen, poloxamer 188, roksytromycyna.
3. Formulacja uznana za najkorzystniejszą charakteryzuje się wielkością cząstek w zakresie: 169-174 nm; współczynnikiem polidispersji w granicach: 0,23-0,24 i potencjałem Zeta w zakresie: (-28)-(-34) mV.
4. Opracowano i zwalidowano nową metodę oznaczania roksytromycyny techniką HPLC z detekcją spektrofotometryczną i posłużono się nią do oceny % inkorporacji leku w nośnikach lipidowych. Wyniósł on 61-86%.
5. Wykazano, że aplikacja barwnika fluorescencyjnego (estru heksylowego nadchloranu rodaminy B) w cząstkach lipidowych powoduje jego głębszą penetrację do mieszków włosowych niż aplikacja tego samego barwnika w postaci roztworu.
6. Udowodniono, że cząstki lipidowe z roksytromycyną znakowane fluorescencyjnie docierają do ludzkich mieszków włosowych *ex vivo* nawet na głębokość > 1 mm.
7. Zawiesina cząstek lipidowych otrzymana metodą homogenizacji ultradźwiękowej wykazuje stabilność fizyczną przez ponad 6 miesięcy przechowywania w temperaturze 25 i 40°C.
8. Opracowane cząstki lipidowe z roksytromycyną hamują namnażanie *Propionibacterium acnes* w warunkach *in vitro*.

VII PIŚMIENICTWO

- Abdelbary, G., R. H. Fahmy (2009). Diazepam-Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Design and Characterization. *AAPS PharmSci* 10 (1): 211-219
- Abdulmajed, K., C. M. Heard (2008). Topical delivery of retinyl ascorbate. *Skin Pharmacol. Physiol.* 21 (1): 46-49
- Akamatsu, H., T. Tomita, T. Horio (2002). Effects of Roxithromycin on the production of lipase and neutrophil chemotactic factor by *Propionibacterium acnes*. *Dermatology (Basel, Switz.)* 204 (4): 277-280
- Ali, H., A. B. Shirode, P. W. Sylvester, S. Nazzal (2010). Preparation and in vitro antiproliferative effect of tocotrienol loaded lipid nanoparticles. *Colloids Surf., A* 353 (1): 43-51
- Aljuffali, I. A., C. T. Sung, F. M. Shen, C. T. Huang, J. Y. Fang (2014). Squarticles as a lipid nanocarrier for delivering diphencyprone and minoxidil to hair follicles and human dermal papilla cells. *AAPS J.* 16 (1): 140-150
- Almeida, A. J., S. Runge, R. H. Muller (1997). Peptide-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of production parameters. *Int. J. Pharm.* 149 (2): 255-265
- Alvarez-Roman, R., A. Naik, Y. Kalia, R. H. Guy, H. Fessi (2004). Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J. Controlled Release* 99 (1): 53-62
- Baroli, B. (2010). Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? *J. Pharm. Sci.* 99 (1): 21-50
- Barry, B. W. (2002). Drug delivery routes in skin: a novel approach. *Adv. Drug Delivery Rev.* 54: S31-S40
- Belton, A. L., T. Chira (1997). Fatal anaphylactic reaction to hair dye. *Am. J. Foren. Med. Path.* 18 (3): 290-292
- Biradar, S. V., A. R. Patil, G. V. Sudarsan, V. B. Pokharkar (2006). A comparative study of approaches used to improve solubility of roxithromycin. *Powder Technol.* 169 (1): 22-32
- Blume-Peytavi, U., A. Vogt (2011). Human hair follicle: reservoir function and selective targeting. *Br. J. Dermatol.* 165: 13-17
- Campbell, C. S. J., L. R. Contreras-Rojas, M. B. Delgado-Charro, R. H. Guy (2012). Objective assessment of nanoparticle disposition in mammalian skin after topical exposure. *J. Controlled Release* 162 (1): 201-207
- Casadei, M. A., F. Cerreto, S. Cesa, M. Giannuzzo, M. Feeney, C. Marianecchi, P. Paolicelli (2006). Solid lipid nanoparticles incorporated in dextran hydrogels: A new drug delivery system for oral formulations. *Int. J. Pharm.* 325 (1-2): 140-146
- Castelli, F., C. Puglia, M. G. Sarpietro, L. Rizza, F. Bonina (2005). Characterization of indomethacin-loaded lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry. *Int. J. Pharm.* 304 (1-2): 231-238

- Charcosset, C., A. El-Harati, H. Fessi (2005). Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contactor. *J. Controlled Release* 108 (1): 112-120
- Chawla, V., S. A. Saraf (2011). Glyceryl Behenate and Its Suitability for Production of Aceclofenac Solid Lipid Nanoparticles. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88 (1): 119-126
- Chen, H. B., X. L. Chang, D. R. Du, W. Liu, J. Liu, T. Weng, Y. J. Yang, H. B. Xu, X. L. Yang (2006). Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. *J. Controlled Release* 110 (2): 296-306
- Chen, Q. J., T. Koga, H. Uchi, H. Hara, H. Terao, Y. Moroi, K. Urabe, M. Furue (2002). Propionibacterium acnes-induced IL-8 production may be mediated by NF-kappa B activation in human monocytes. *J. Dermatol. Sci.* 29 (2): 97-103
- Das, S., W. K. Ng, R. B. H. Tan (2012). Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? *Eur. J. Pharm. Sci.* 47 (1): 139-151
- Desai, P. R., P. P. Shah, P. Hayden, M. Singh (2013). Investigation of Follicular and Non-follicular Pathways for Polyarginine and Oleic Acid-Modified Nanoparticles. *Pharm. Res.* 30 (4): 1037-1049
- Devalapally, H., A. Chakilam, M. M. Amiji (2007). Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. *J. Pharm. Sci.* 96 (10): 2547-2565
- Domingo, C., J. Saurina (2012). An overview of the analytical characterization of nanostructured drug delivery systems: Towards green and sustainable pharmaceuticals: A review. *Anal. Chim. Acta* 744: 8-22
- Downie, M. M., R. Guy, T. Kealey (2004). Advances in sebaceous gland research: potential new approaches to acne management. *Int. J. Cosmet. Sci.* 26 (6): 291-311
- Elnaggar, Y. S., M. A. El-Massik, O. Y. Abdallah (2011). Fabrication, appraisal, and transdermal permeation of sildenafil citrate-loaded nanostructured lipid carriers versus solid lipid nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* 6: 3195-3205
- Esposito, E., M. Fantin, M. Marti, M. Drechsler, L. Paccamiccio, P. Mariani, E. Sivieri, F. Lain, E. Menegatti, M. Morari, R. Cortesi (2008). Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bromocriptine. *Pharm. Res.* 25 (7): 1521-1530
- Fang, J.-Y., C.-L. Fang, C.-H. Liu, Y.-H. Su (2008). Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 (2): 633-640
- Farboud, E. S., S. A. Nasrollahi, Z. Tabbakhi (2011). Novel formulation and evaluation of a Q10-loaded solid lipid nanoparticle cream: in vitro and in vivo studies. *Int. J. Nanomed.* 6: 611-617
- Farmakopea Polska, Wydanie IX (2011). Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych. Tom II, 3204-3206

- Freitas, C., R. H. Muller (1998). Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN (TM)) dispersions. *Int. J. Pharm.* 168 (2): 221-229
- Freitas, C., R. H. Muller (1999a). Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN (TM)) and crystallinity of the lipid phase. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 47 (2): 125-132
- Freitas, C., R. H. Muller (1999b). Stability determination of solid lipid nanoparticles (SLN (TM)) in aqueous dispersion after addition of electrolyte. *J. Microencapsulation* 16 (1): 59-71
- Glowka, F. K., M. Karazniewicz-Lada (2007). Determination of roxithromycin in human plasma by HPLC with fluorescence and UV absorbance detection: Application to a pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 852 (1-2): 669-673
- Gokce, E. H., E. Korkmaz, E. Deller, G. Sandri, M. C. Bonferoni, O. Ozer (2012). Resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles versus nanostructured lipid carriers: evaluation of antioxidant potential for dermal applications. *Int. J. Nanomed.* 7: 1841-1850
- Gokce, E. H., G. Sandri, M. C. Bonferoni, S. Rossi, F. Ferrari, T. Guneri, C. Caramella (2008). Cyclosporine A loaded SLNs: Evaluation of cellular uptake and corneal cytotoxicity. *Int. J. Pharm.* 364 (1): 76-86
- Guarrera, M., A. Rebora (2005). Kenogen in female androgenetic alopecia - A longitudinal study. *Dermatology (Basel, Switz.)* 210 (1): 18-20
- Hao, J., X. Fang, Y. Zhou, J. Wang, F. Guo, F. Li, X. Peng (2011). Development and optimization of solid lipid nanoparticle formulation for ophthalmic delivery of chloramphenicol using a Box-Behnken design. *Int. J. Nanomed.* 6: 683-692
- Hayashi, N., M. Kawashima (2011). Efficacy of oral antibiotics on acne vulgaris and their effects on quality of life: a multicenter randomized controlled trial using minocycline, roxithromycin and faropenem. *J. Dermatol.* 38 (2): 111-119
- Hsu, S. H., S. A. Al-Suwayeh, C. F. Hung, C. Y. Tsai, J. Y. Fang (2011). Mechanistic Studies of the Skin Delivery of Lipid Colloid Systems with Different Oil/Fatty Ester Ratios for Both Lipophilic and Hydrophilic Drugs. *Curr. Nanosci.* 7 (2): 200-209
- Hu, F. Q., Y. Hong, H. Yuan (2004a). Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing peptide. *Int. J. Pharm.* 273 (1-2): 29-35
- Hu, L., X. Tang, F. Cui (2004b). Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* 56 (12): 1527-1535
- Huang, Z. R., S. C. Hua, Y. L. Yang, J. Y. Fang (2008). Development and evaluation of lipid nanoparticles for camptothecin delivery: a comparison of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, and lipid emulsion. *Acta Pharmacol. Sin.* 29 (9): 1094-1102
- Ito, T., H. Fukamizu, N. Ito, N. Seo, H. Yagi, M. Takigawa, H. Hashizume (2009). Roxithromycin antagonizes catagen induction in murine and human hair

- follicles: implication of topical roxithromycin as hair restoration reagent. *Arch. Dermatol. Res.* 301 (5): 347-355
- Jenning, V., A. Gysler, M. Schafer-Korting, S. H. Gohla (2000a). Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 49 (3): 211-218
- Jenning, V., M. Schafer-Korting, S. Gohla (2000b). Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use drug release properties. *J. Controlled Release* 66 (2-3): 115-126
- Joshi, M., V. Patravale (2008). Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib. *Int. J. Pharm.* 346 (1-2): 124-132
- Jung, S., N. Otberg, G. Thiede, H. Richter, W. Sterry, S. Panzner, J. Lademann (2006). Innovative liposomes as a transfollicular drug delivery system: Penetration into porcine hair follicles. *J. Invest. Dermatol.* 126 (8): 1728-1732
- Keck, C., R. H. Muller (2013). Nanotoxicological classification system (NCS) – A guide for the risk-benefit assessment of nanoparticulate drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 84:445-448
- Knorr, F., J. Lademann, A. Patzelt, W. Sterry, U. Blume-Peytavi, A. Vogt (2009). Follicular transport route - Research progress and future perspectives. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71 (2): 173-180
- Kobayashi, M., K. Kabashima, M. Nakamura, Y. Tokura (2009). Effects of oral antibiotic roxithromycin on quality of life in acne patients. *J. Dermatol.* 36 (7): 383-391
- Komisja Europejska (2011). Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial (Text with EEA relevance) *Official Journal of the European Union* (2011/696/EU)
- Krause, K., K. Foitzik (2006). Biology of the hair follicle: The basics. *Semin. Cutaneous Med. Surg.* 25 (1): 2-10
- Kuechler, S., M. Abdel-Mottaleb, A. Lamprecht, M. R. Radowski, R. Haag, M. Schaefer-Korting (2009). Influence of nanocarrier type and size on skin delivery of hydrophilic agents. *Int. J. Pharm.* 377 (1-2): 169-172
- Lademann, J., F. Knorr, H. Richter, U. Blume-Peytavi, A. Vogt, C. Antoniou, W. Sterry, A. Patzelt (2008). Hair follicles - An efficient storage and penetration pathway for topically applied substances. *Skin Pharmacol. Physiol.* 21 (3): 150-155
- Lademann, J., A. Patzelt, S. Schanzer, H. Richter, G. Thiede, B. Havlickova, C. Gunther, M. Friedrich, W. Sterry, J. W. Fluhr, S. Seifert (2012). Non-invasive analysis of penetration and storage of Isoconazole nitrate in the stratum corneum and the hair follicles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 80 (3): 615-620
- Lademann, J., H. Richter, M. Meinke, W. Sterry, A. Patzelt (2010). Which Skin Model Is the Most Appropriate for the Investigation of Topically Applied Substances into the Hair Follicles? *Skin Pharmacol. Physiol.* 23 (1): 47-52

- Lademann, J., H. Richter, U. F. Schaefer, U. Blume-Peytavi, A. Teichmann, N. Otberg, W. Sterry (2006). Hair follicles - A long-term reservoir for drug delivery. *Skin Pharmacol. Physiol.* 19 (4): 232-236
- Lademann, J., H. Richter, A. Teichmann, N. Otberg, U. Blume-Peytavi, J. Luengo, B. Weiss, U. F. Schaefer, C. M. Lehr, R. Wepf, W. Sterry (2007). Nanoparticles - An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66 (2): 159-164
- Lekki, J., Z. Stachura, W. Dabros, J. Stachura, F. Menzel, T. Reinert, T. Butz, J. Pallon, E. Gontier, M. D. Ynsa, P. Moretto, Z. Kertesz, Z. Szikszai, A. Z. Kiss (2007). On the follicular pathway of percutaneous uptake of nanoparticles: Ion microscopy and autoradiography studies. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* 260 (1): 174-177
- Lin, Y. K., S. A. Al-Suwayeh, Y. L. Leu, F. M. Shen, J. Y. Fang (2013). Squalene-Containing Nanostructured Lipid Carriers Promote Percutaneous Absorption and Hair Follicle Targeting of Diphencyprone for Treating Alopecia Areata. *Pharm. Res.* 30 (2): 435-446
- Liu, J., W. Hu, H. Chen, Q. Ni, H. Xu, X. Yang (2007). Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. *Int. J. Pharm.* 328 (2): 191-195
- Lu, G. W., S. Valiveti, J. Spence, C. Zhuang, L. Robosky, K. Wade, A. Love, L. Y. Hu, D. Pole, M. Mollan (2009). Comparison of artificial sebum with human and hamster sebum samples. *Int. J. Pharm.* 367 (1-2): 37-43
- Luther, N., M. E. Darvin, W. Sterry, J. Lademann, A. Patzelt (2012). Ethnic Differences in Skin Physiology, Hair Follicle Morphology and Follicular Penetration. *Skin Pharmacol. Physiol.* 25 (4): 182-191
- Macek, J., P. Ptacek, J. Klima (1999). Determination of roxithromycin in human plasma by high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection. *J. Chromatogr. B* 723 (1-2): 233-238
- Mandawgade, S. D., V. B. Patravale (2008). Development of SLNs from natural lipids: Application to topical delivery of tretinoin. *Int. J. Pharm.* 363 (1-2): 132-138
- Martini, M.-C. (2007). Kosmetologia i farmakologia skóry, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 37-47; 53-56
- Mehnert, W., K. Mader (2001). Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47 (2-3): 165-196
- Meidan, V. M., M. C. Bonner, B. B. Michniak (2005). Transfollicular drug delivery - Is it a reality? *Int. J. Pharm.* 306 (1-2): 1-14
- Mitragotri, S. (2003). Modeling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways. *J. Controlled Release* 86 (1): 69-92
- Mitri, K., R. Shegokar, S. Gohla, C. Anselmi, R. H. Muller (2011). Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: preparation, characterization, stability and performance. *Int. J. Pharm.* 414 (1-2): 267-275

- Morgan, A. J., G. Lewis, W. E. Vandenhoven, P. J. Akkerboom (1993). The effect of zinc in the form of erythromycin zinc complex (zineryt(r) lotion) and zinc acetate on metallothionein expression and distribution in hamster skin. *Br. J. Dermatol.* 129 (5): 563-570
- Morgen, M., G. W. Lu, D. Du, R. Stehle, F. Lembke, J. Cervantes, S. Ciotti, R. Haskell, D. Smithey, K. Haley, C. L. Fan (2011). Targeted delivery of a poorly water-soluble compound to hair follicles using polymeric nanoparticle suspensions. *Int. J. Pharm.* 416 (1): 314-322
- Muller, R. H., R. D. Petersen, A. Hommoss, J. Pardeike (2007). Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (6): 522-530
- Muller, R. H., M. Radtke, S. A. Wissing (2002). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 Suppl 1: S131-155
- Munic, V., M. Banjanac, S. Kostrun, K. Nujic, M. Bosnar, N. Marjanovic, J. Ralic, M. Matijasic, M. Hlevnjak, V. E. Haber (2011). Intensity of macrolide anti-inflammatory activity in J774A.1 cells positively correlates with cellular accumulation and phospholipidosis. *Pharm. Res.* 64 (3): 298-307
- Munster, U., C. Nakamura, A. Haberland, K. Jores, W. Mehnert, S. Rummel, M. Schaller, H. C. Korting, C. C. Zouboulis, U. Blume-Peytavi, M. Schafer-Korting (2005). RU 58841-myristate - prodrug development for topical treatment of acne and androgenetic alopecia. *Pharmazie* 60 (1): 8-12.
- Musial, W., A. Kubis (2003). Preliminary assessment of alginic acid as a factor buffering triethanolamine interacting with artificial skin sebum. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 55 (2): 237-240
- Mutschler, E., G. Geisslinger, H. Kroemer, P. Ruth, M. Schafer-Korting (2010). *Farmakologia i Toksykologia, MedPharm, Polska*, 761-763; 862-865
- Neves, A. R., M. Lucio, S. Martins, J. L. C. Lima, S. Reis (2013). Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. *Int. J. Nanomed.* 8: 177-187
- Nystrom, A. M., B. Fadeel (2012). Safety assessment of nanomaterials: Implications for nanomedicine. *J. Controlled Release* 161: 403-408
- Ohyama, M. (2007). Hair follicle bulge: A fascinating reservoir of epithelial stem cells. *J. Dermatol. Sci.* 46 (2): 81-89
- Olbrich, C., R. H. Muller (1999). Enzymatic degradation of SLN - effect of surfactant and surfactant mixtures. *Int. J. Pharm.* 180 (1): 31-39
- Ossadnik, M., V. Czaika, A. Teichmann, W. Sterry, H. J. Tietz, J. Lademann, S. Koch (2007). Differential stripping: introduction of a method to show the penetration of topically applied antifungal substances into the hair follicles. *Mycoses* 50 (6): 457-462
- Ostrowski, M., E. Wilkowska, T. Baczek (2010). Impact of pharmaceutical dosage form on stability and dissolution of roxithromycin. *Cent. Eur. J. Med.* 5 (1): 83-90

- Otberg, N., H. Richter, H. Schaefer, U. Blume-Peytavi, W. Sterry, J. Lademann (2004). Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. *J. Invest. Dermatol.* 122 (1): 14-19
- Otberg, N., A. Teichmann, U. Rasuljev, R. Sinkgraven, W. Sterry, J. Lademann (2007). Follicular penetration of topically applied caffeine via a shampoo formulation. *Skin Pharmacol. Physiol.* 20 (4): 195-198
- Papakostas, D., F. Rancan, W. Sterry, U. Blume-Peytavi, A. Vogt (2011). Nanoparticles in dermatology. *Arch. Dermatol. Res.* 303 (8): 533-550
- Pappa-Louisi, A., P. Agrafiotou (2002). Reversed-phase liquid chromatographic behavior of the macrolide antibiotics clarithromycin and roxithromycin. *Chromatographia* 55 (9-10): 541-547
- Pardeike, J., A. Hommos, R. H. Muller (2009). Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int. J. Pharm.* 366 (1-2): 170-184
- Parhi, R., P. Suresh (2012). Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles-a review. *Curr. Drug Discovery Technol.* 9 (1): 2-16
- Patzelt, A., H. Richter, R. Buettemeyer, H. J. R. Huber, U. Blume-Peytavi, W. Sterry, J. Lademann (2008). Differential stripping demonstrates a significant reduction of the hair follicle reservoir in vitro compared to in vivo. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 (1): 234-238
- Patzelt, A., H. Richter, F. Knorr, U. Schaefer, C. M. Lehr, L. Dahne, W. Sterry, J. Lademann (2011). Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. *J. Controlled Release* 150 (1): 45-48
- Prow, T. W., J. E. Grice, L. L. Lin, R. Faye, M. Butler, W. Becker, E. M. T. Wurm, C. Yoong, T. A. Robertson, H. P. Soyer, M. S. Roberts (2011). Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* 63 (6): 470-491
- PubChem CID: 5480431(data wejścia: 04.12.2013)
- Puglia, C., P. Blasi, L. Rizza, A. Schoubben, F. Bonina, C. Rossi, M. Ricci (2008). Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: An in vitro and in vivo investigation. *Int. J. Pharm.* 357 (1-2): 295-304
- Rancan, F., D. Papakostas, S. Hadam, S. Hackbarth, T. Delair, C. Primard, B. Verrier, W. Sterry, U. Blume-Peytavi, A. Vogt (2009). Investigation of Polylactic Acid (PLA) Nanoparticles as Drug Delivery Systems for Local Dermatotherapy. *Pharm. Res.* 26 (8): 2027-2036
- Rancan, F., U. Blume-Peytavi, A. Vogt (2014). Utilization of biodegradable polymeric materials as delivery agents in dermatology. *Clin., Cosmet. Invest. Dermatol.* 7: 23-34
- Rebora, A., M. Guarrera (2002). Kenogen - A new phase of the hair cycle? *Dermatology (Basel, Switz.)* 205 (2): 108-110
- Rolland, A., N. Wagner, A. Chatelus, B. Shroot, H. Schaefer (1993). Site-specific drug-delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres. *Pharm. Res.* 10 (12): 1738-1744

- Ross, J. I., A. M. Snelling, E. A. Eady, J. H. Cove, W. J. Cunliffe, J. J. Leyden, P. Collignon, B. Dreno, A. Reynaud, J. Fluhr, S. Oshima (2001). Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients attending dermatology clinics in Europe, the USA, Japan and Australia. *Br. J. Dermatol.* 144 (2): 339-346
- Rowe, R. C., P. J. Sheskey, W. G. Cook, M. E. Fenton (2012). Handbook of Pharmaceutical Excipients, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association (Poloxamer)
- Sakuma, T. H., H. I. Maibach (2012). Oily Skin: An Overview. *Skin Pharmacol. Physiol.* 25 (5): 227-235
- Saraceno, R., A. Chiricozzi, M. Gabellini, S. Chimenti (2013). Emerging applications of nanomedicine in dermatology. *Skin Res. Technol.* 19 (1): E13-E19
- Schaefer, H., J. Lademann (2001). The role of follicular penetration - A differential view. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 14: 23-27
- Schafer-Korting, M., W. Mehnert, H. C. Korting (2007). Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (6): 427-443
- Schlake, T. (2007). Determination of hair structure and shape. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18 (2): 267-273
- Shah, K. A., A. A. Date, M. D. Joshi, V. B. Patravale (2007). Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: potential in topical delivery. *Int. J. Pharm.* 345 (1-2): 163-171
- Song, W. C., K. S. Hu, H. J. Kim, K. S. Koh (2007). A study of the secretion mechanism of the sebaceous gland using three-dimensional reconstruction to examine the morphological relationship between the sebaceous gland and the arrector pili muscle in the follicular unit. *Br. J. Dermatol.* 157 (2): 325-330
- Souto, E. B., S. A. Wissing, C. M. Barbosa, R. H. Muller (2004). Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int. J. Pharm.* 278 (1): 71-77
- Sznitowska, M., M. Gajewska, S. Janicki, A. Radwanska, G. Lukowski (2001). Bioavailability of diazepam from aqueous-organic solution, submicron emulsion and solid lipid nanoparticles after rectal administration in rabbits. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52 (2): 159-163
- Takahashi, H., Y. Suzuki, Y. Miyauchi, Y. Hashimoto, A. Ishida-Yamamoto, H. Iizuka (2004). Roxithromycin decreases ultraviolet B irradiation-induced reactive oxygen intermediates production and apoptosis of keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 34 (1): 25-33
- Teeranachaideekul, V., R. H. Muller, V. B. Junyaprasert (2007a). Encapsulation of ascorbyl palmitate in nanostructured lipid carriers (NLC) - effects of formulation parameters on physicochemical stability. *Int. J. Pharm.* 340 (1-2): 198-206

- Teeranachaideekul, V., E. B. Souto, V. B. Junyaprasert, R. H. Muller (2007b). Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q(10) - development, physicochemical characterization and in vitro release studies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67 (1): 141-148
- Teichmann, A., N. Otberg, U. Jacobi, W. Sterry, J. Lademann (2006). Follicular penetration: Development of a method to block the follicles selectively against the penetration of topically applied substances. *Skin Pharmacol. Physiol.* 19 (4): 216-223
- Teskac, K., J. Kristl (2010). The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. *Int. J. Pharm.* 390 (1): 61-69
- Thiboutot, D. (2004). Regulation of human sebaceous glands. *J. Invest. Dermatol.* 123 (1): 1-12
- Thielitz, A., M. Helmdach, E. M. Ropke, H. Gollnick (2001). Lipid analysis of follicular casts from cyanoacrylate strips as a new method for studying therapeutic effects of antiacne agents. *Br. J. Dermatol.* 145 (1): 19-27
- Tiyaboonchai, W., W. Tungpradit, P. Plianbangchang (2007). Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 337 (1-2): 299-306
- Tobin, D. J. (2006). Biochemistry of human skin - our brain on the outside. *Chem. Soc. Rev.* 35 (1): 52-67
- Toll, R., U. Jacobi, H. Richter, J. Lademann, H. Schaefer, U. Blume-Peytavi (2004). Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. *J. Invest. Dermatol.* 123 (1): 168-176
- Tschan, T., H. Steffen, A. Supersaxo (1997). Sebaceous-gland deposition of isotretinoin after topical application: An in vitro study using human facial skin. *Skin Pharmacol.* 10 (3): 126-134
- Uner, M., G. Yener (2007). Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. *Int. J. Nanomed.* 2 (3): 289-300
- Vogt, A., B. Combadiere, S. Hadam, K. M. Stieler, J. Lademann, H. Schaefer, B. Autran, W. Sterry, U. Blume-Peytavi (2006). 40 nm, but not 750 or 1,500 nm, nanoparticles enter epidermal CD1a+ cells after transcutaneous application on human skin. *J. Invest. Dermatol.* 126 (6): 1316-1322
- Vogt, A., S. Hadam, M. Heiderhoff, H. Audring, J. Lademann, W. Sterry, U. Blume-Peytavi (2007). Morphometry of human terminal and vellus hair follicles. *Exp. Dermatol.* 16 (11): 946-950
- Wang, K. C., L. T. Zane (2008). Recent advances in acne vulgaris research: insights and clinical implications. *Adv. Dermatol.* 24: 197-209
- Weyenberg, W., P. Filev, D. Van den Plas, J. Vandervoort, K. De Smet, P. Sollie, A. Ludwig (2007). Cytotoxicity of submicron emulsions and solid lipid nanoparticles for dermal application. *Int. J. Pharm.* 337 (1-2): 291-298
- Wissing, S. A., R. H. Muller (2002). Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. *J. Controlled Release* 81 (3): 225-233

- Wosicka, H., K. Cal (2010). Targeting to the hair follicles: current status and potential. *J. Dermatol. Sci.* 57 (2): 83-89
- Wosicka, H., J. Stefanowska, K. Cal (2011). The Potential of Drug Targeting to Hair Follicles. *Treatment Strategies, Dermatology* 1 (1): 62-66
- Zouboulis, C. C. (2004). Acne and sebaceous gland function. *Clin. Dermatol.* 22 (5): 360-366

VIII SPIS RYCIN I TABEL

Spis rycin

Ryc. 1. Zdjęcie jednostki włosowo-łojowej spod mikroskopu fluorescencyjnego (preparat barwiony Czerwienią Nilu, obiektyw 40 x).....	18
Ryc. 2. Struktura skóry (A), struktura (B) i przekrój (C) mieszka włosowego (Wosicka i Cal, 2010).....	20
Ryc. 3. Model jednostki włosowo-łojowej (Song <i>et al.</i> , 2007).....	23
Ryc. 4. Cykl wzrostowy włosa.....	24
Ryc. 5. Zawartość nanocząstek w mieszkach włosowych (a) i warstwie rogowej (b) po 30 min, 1, 4, 8 i 10 dniach od aplikacji (Lademann <i>et al.</i> , 2006).....	33
Ryc. 6. Łuski kutikuli ludzkiego włosa terminalnego (lewy) i mieszkowego (prawy) (Prow <i>et al.</i> , 2011).....	34
Ryc. 7. Otrzymywanie nanocząstek drogą sonikacji – proces kawitacji (Parhi <i>et al.</i> , 2012).....	37
Ryc. 8. Wzór strukturalny ROX.....	44
Ryc. 9. Propozycja systemu klasyfikacji nanotoksykologicznej (Keck i Muller, 2013).....	49
Ryc. 10. Adapter dializacyjny AD4 (B) i jego napełnianie (A) (www.sotax.com)	59
Ryc. 11A,B. Aplikacja formułacji na skórę z okolicy klatki piersiowej.....	62
Ryc. 12. Wykonywanie przekrojów zamrożonego fragmentu skóry.....	62
Ryc. 13. A – wykonywanie <i>differential stripping</i> , B - cyjanoakrylowa biopsja.....	63
Ryc. 14. Widmo <i>total ion chromatogram</i> roztworu wzorcowego ROX w trybie przemiatania.....	65
Ryc. 15. Widmo <i>extracted ion chromatogram</i> roztworu wzorcowego ROX w trybie przemiatania.....	65
Ryc. 16. Widmo jonów potomnych ROX przy napięciach: w celi kolizyjnej 5 V, na fragmentorze 150 V.....	66
Ryc. 17. Widmo jonów potomnych ROX przy napięciach: w celi kolizyjnej 15 V, na fragmentorze 150 V.....	66
Ryc. 18. Widmo jonów potomnych ROX przy napięciach: w celi kolizyjnej 22 V, na fragmentorze 150 V.....	67
Ryc. 19. Widmo jonów potomnych ROX przy napięciach: w celi kolizyjnej 35 V, na fragmentorze 150 V.....	67

Ryc. 20. Widmo próby kontrolnej (<i>total ion chromatogram</i> , tryb MRM).....	68
Ryc. 21. Widmo roztworu wzorcowego ROX (<i>total ion chromatogram</i> , tryb MRM).....	68
Ryc. 22. Widmo roztworu wzorcowego ROX, zielona linia - jon ilościowy, czerwona - jon jakościowy (<i>total ion chromatogram</i> , tryb MRM).....	69
Ryc. 23. Fragment termogramu przedstawiającego zależność przepływu ciepła od temperatury podczas ogrzewania ROX (widoczny endotermiczny pik topnienia).....	70
Ryc. 24. Fragment termogramu przedstawiającego zależność przepływu ciepła od temperatury podczas chłodzenia ROX (widoczne przejście szkliste).....	71
Ryc. 25. Termogram przedstawiający zależność przepływu ciepła od temperatury podczas ogrzewania (czerwona linia) i chłodzenia (czarna linia) ROX. Widoczny pik topnienia (czerwona linia) i przejście szkliste (czarna linia).....	71
Ryc. 26. Fragment termogramu przedstawiającego zależność przepływu ciepła od temperatury podczas ogrzewania Compritolu (widoczny pik topnienia).....	72
Ryc. 27. Fragment termogramu przedstawiającego zależność przepływu ciepła od temperatury podczas ogrzewania formułacji A (widoczny pik topnienia Compritolu).....	72
Ryc. 28. Fragment termogramu przedstawiającego zależność przepływu ciepła od temperatury podczas ogrzewania mieszaniny fizycznej ROX i Compritolu.....	73
Ryc. 29A, B. Zdjęcia SEM roksytromycyny.....	73
Ryc. 30A, B. Zdjęcia SEM liofilizatów cząstek lipidowych, otrzymanych w badaniach wstępnych.....	73
Ryc. 31A, B. Zdjęcia TEM formułacji A: A - A MS, B - A S.....	74
Ryc. 32A, B. Zdjęcia TEM formułacji B: A - B MS, B - B S.....	74
Ryc. 33A, B. Zdjęcia TEM formułacji C: A - C MS, B - C S.....	75
Ryc. 34A, B. Zdjęcia AFM cząstek lipidowych, otrzymanych w badaniach wstępnych.....	75
Ryc. 35. Przykładowy chromatogram roztworu wzorcowego ROX o stężeniu 25 µg/ml...79	
Ryc. 36. Uwalnianie ROX z formułacji B S (n = 5, średnia ± SD).....	81
Ryc. 37A, B. Zdjęcia fluorescencyjne przekrojów podłużnych skóry z okolicy klatki piersiowej.....	83
Ryc. 38. Zdjęcie fluorescencyjne przekroju podłużnego skóry z okolicy klatki piersiowej.....	83
Ryc. 39A, B. Zdjęcia fluorescencyjne przekrojów poprzecznych skóry z okolicy klatki piersiowej, A - głębokość ok. 800 µm, B - głębokość ponad 1 mm.....	83

Ryc. 40A, B. Zdjęcia fluorescencyjne cyjanoakrylowych biopsji mieszków z okolicy klatki piersiowej.....	84
Ryc. 41A, B. Zdjęcia fluorescencyjne cyjanoakrylowych biopsji mieszków z okolicy klatki piersiowej.....	84
Ryc. 42A, B. Zdjęcia fluorescencyjne przekrojów podłużnych skóry głowy po aplikacji roztworu RBHE.....	85
Ryc. 43A, B. Zdjęcia fluorescencyjne przekrojów podłużnych skóry głowy po aplikacji cząstek lipidowych z RBHE.....	85
Ryc. 44A, B, C, D. Zdjęcia fluorescencyjne przekrojów poprzecznych skóry głowy po aplikacji roztworu RBHE.....	86
Ryc. 45A, B, C, D. Zdjęcia fluorescencyjne przekrojów poprzecznych skóry głowy po aplikacji formułacji B S z RBHE.....	86
Ryc. 46A, B, C. Zdjęcie fluorescencyjne przekroju poprzecznego skóry głowy po aplikacji roztworu RBHE, warstwa pierwsza (A). Intensywność fluorescencji wzdłuż białej strzałki na rycinie A (B). Intensywność fluorescencji wzdłuż zielonej strzałki na rycinie A (C).....	87
Ryc. 47A, B, C. Zdjęcie fluorescencyjne przekroju poprzecznego skóry głowy po aplikacji formułacji B S z RBHE, warstwa pierwsza (A). Intensywność fluorescencji wzdłuż białej strzałki na rycinie A (B). Intensywność fluorescencji wzdłuż zielonej strzałki na rycinie A (C).....	87
Ryc. 48A, B, C. Zdjęcie fluorescencyjne przekroju poprzecznego skóry głowy po aplikacji roztworu RBHE, warstwa druga (A). Intensywność fluorescencji wzdłuż białej strzałki na rycinie A (B). Intensywność fluorescencji wzdłuż zielonej strzałki na rycinie A (C).....	88
Ryc. 49A, B, C. Zdjęcie fluorescencyjne przekroju poprzecznego skóry głowy po aplikacji formułacji B S z RBHE, warstwa druga (A). Intensywność fluorescencji wzdłuż białej strzałki na rycinie A (B). Intensywność fluorescencji wzdłuż zielonej strzałki na rycinie A (C).....	88
Ryc. 50A, B, C. Zdjęcie fluorescencyjne przekroju poprzecznego skóry głowy po aplikacji roztworu RBHE, warstwa trzecia (A). Intensywność fluorescencji wzdłuż białej strzałki na rycinie A (B). Intensywność fluorescencji wzdłuż zielonej strzałki na rycinie A (C).....	89

Ryc. 51A, B, C. Zdjęcie fluorescencyjne przekroju poprzecznego skóry głowy po aplikacji formułacji B S z RBHE, warstwa trzecia (A). Intensywność fluorescencji wzdłuż białej strzałki na rycinie A (B). Intensywność fluorescencji wzdłuż zielonej strzałki na rycinie A (C).....	89
Ryc. 52A, B, C. Zdjęcie fluorescencyjne przekroju poprzecznego skóry głowy po aplikacji roztworu RBHE, warstwa czwarta (A). Intensywność fluorescencji wzdłuż białej strzałki na rycinie A (B). Intensywność fluorescencji wzdłuż zielonej strzałki na rycinie A (C).....	90
Ryc. 53A, B, C. Zdjęcie fluorescencyjne przekroju poprzecznego skóry głowy po aplikacji formułacji B S z RBHE, warstwa czwarta (A). Intensywność fluorescencji wzdłuż białej strzałki na rycinie A (B). Intensywność fluorescencji wzdłuż zielonej strzałki na rycinie A (C).....	90

Spis tabel

Tab. 1. Parametry charakteryzujące włosy meszkowe na różnych obszarach ciała (Otberg <i>et al.</i> , 2004; Wosicka <i>et al.</i> , 2011).....	22
Tab. 2. Przykłady głębokości penetracji różnych nośników w mieszkach włosowych.....	32
Tab. 3. Metody otrzymywania i charakterystyka cząstek lipidowych.....	38
Tab. 4. Przykłady i charakterystyka cząstek lipidowych otrzymanych metodą homogenizacji szybkoobrotowej i ultradźwiękowej.....	40
Tab. 5. Przykłady cząstek lipidowych otrzymanych tą samą metodą (homogenizacja mechaniczna i ultradźwiękowa) wraz z procentowym stopniem inkorporacji API...42	
Tab. 6. Skład formułacji.....	55
Tab. 7. Oznaczenie formułacji ze względu na metodę ich otrzymywania.....	55
Tab. 8. Schemat przygotowywania roztworów wzorcowych ROX do oznaczeń chromatograficznych.....	58
Tab. 9. Schemat przygotowywania roztworów wzorcowych ROX do oznaczeń spektrofotometrycznych.....	60
Tab. 10. Średnie wartości wielkości cząstek oraz współczynnika polidispersji dla 6 formułacji.....	76

Tab. 11. Wielkość cząstek oraz współczynnik polidispersji dla trzech serii formułacji B S przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych (4, 25, 40°C).....	77
Tab. 12. Potencjał Zeta dla trzech serii formułacji B S przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych (4, 25, 40°C).....	77
Tab. 13. Średnie wartości % inkorporacji ROX w cząstkach poszczególnych formułacji (\pm RSD%, n = 3).....	80
Tab. 14. Wartości pH formułacji.....	80
Tab. 15. Wyniki oznaczania zawartości ROX w poszczególnych biopsjach (n=3).....	91

IX ZALĄCZNIK

Tabela A. Jednodniowa precyzja pomiarów czasu retencji dla roztworów wzorcowych ROX o stężeniu 1 i 25 µg/ml

stężenie [µg/ml]	czas retencji [min]	średni czas retencji [min]	SD	RSD%
1	4,53	4,488	0,040	0,90%
	4,528			
	4,525			
	4,523			
	4,525			
25	4,452			
	4,45			
	4,45			
	4,448			
	4,45			

Tabela B. Jednodniowa precyzja pomiaru pól powierzchni pików dla roztworów wzorcowych ROX o stężeniu 1 i 25 µg/ml

stężenie [µg/ml]	powierzchnia pików [µV/100 min]	średnia powierzchnia pików [µV/100 min]	SD	RSD%
1	7587	7860	383	5%
	7423			
	7782			
	8208			
	8301			
25	181728	185070	2247	1%
	184844			
	184488			
	187223			
	187069			

Tabela C. Międzydniowa precyzja pomiarów czasu retencji dla roztworów wzorcowych ROX o stężeniu 10 µg/ml

data	czas retencji [min]	średni czas retencji [min]	SD	RSD%
02.08.2010	4,803	4,648	0,231	4,97%
	4,805			
	4,803			
21.09.2010	4,8			
	4,8			
	4,8			
28.09.2010	4,345			
	4,34			
	4,335			

Tabela D. Międzydniowa precyzja pomiarów pól powierzchni pików dla roztworów wzorcowych ROX o stężeniu 10 µg/ml

data	powierzchnia piku [µV/100 min]	średnia powierzchnia piku [µV/100 min]	SD	RSD%
02.08.2010	63443	68900	4970	7,21%
	62864			
	66033			
21.09.2010	75126			
	74343			
	75797			
28.09.2010	67434			
	68330			
	66730			