



**Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny**

Helena Barańska

**WPŁYW WARUNKÓW SPORZĄDZANIA I SKŁADU
MIKROSFER LIPIDOWYCH NA ICH PENETRACJĘ
DO MIESZKÓW WŁOSOWYCH**

Praca doktorska wykonana w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej

**Promotor pracy:
dr hab. n. farm. Krzysztof Cał, prof. uczelni
Kierownik Katedry i Zakładu:
prof. dr hab. n. farm. Małgorzata Sznitowska**

Gdańsk 2019

Panu profesorowi **Krzysztofowi Calowi** dziękuję za zainteresowanie mnie tematyką badawczą związaną z przenikaniem przezskórnym już podczas pracy magisterskiej, a także za cenne wskazówki w trakcie pracy badawczej oraz pomoc w odnalezieniu mojej dalszej ścieżki zawodowej.

Serdeczne podziękowania składam Pani profesor **Małgorzacie Sznitowskiej** za możliwość rozwoju i pracy w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej.

Serdeczne podziękowania kieruję również do **Julii Jacyny** z Katedry Biofarmacji i Farmakodynamiki za współpracę w procesie planowania doświadczeń.

Dziękuję także moim **Rodzicom Katarzynie i Jarosławowi, Siostrze Justynie oraz Partnerowi Arne** za ich nieocenione wsparcie i motywację.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW I NAZW HANDLOWYCH	5
STRESZCZENIE.....	6
SUMMARY.....	7
I. WSTĘP	8
II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	10
1. CHARAKTERYSTYKA JEDNOSTKI FOLIKULARNEJ	10
1.1. BUDOWA MIESZKA WŁOSOWEGO I WŁOSA	10
1.2. RODZAJE WŁOSÓW	13
1.3. GĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA WŁOSÓW.....	14
1.4. AKTYWNOŚĆ WŁOSÓW	15
1.5. FAZY ŻYCIA WŁOSA.....	16
2. PRZENIKANIE NANOCZĄSTEK DO MIESZKÓW WŁOSOWYCH	16
3. NANOCZĄSTKI LIPIDOWE	21
4. TOKSYCZNOŚĆ NANOCZĄSTEK	28
5. METODA PLANOWANIA DOŚWIADCZEŃ.....	29
III. CELE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	32
IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	33
1. ODCZYNNIKI	33
2. APARATURA	33
3. MATERIAŁY.....	34
4. METODYKA.....	35
4.1. OPTYMALIZACJA WYTWARZANIA MIKROSFER LIPIDOWYCH.....	35
4.1.1. Wpływ rodzaju emulgatora i warunków procesowych	35
4.1.2. Wpływ stężenia emulgatora.....	38
4.1.3. Wpływ zastosowania mieszaniny emulgatorów	39
4.1.4. Wpływ dodatku konserwantu	39
4.2. BADANIA POTENCJAŁY DRAŻNIĄCEGO <i>IN VITRO</i>	40
4.3. BADANIA TOLERANCJI SKÓRNEJ <i>IN VIVO</i>	41
4.4. BADANIA PRZENIKANIA MIKROSFER LIPIDOWYCH <i>EX VIVO</i>	42
4.4.1. Inkorporowanie barwnika fluorescencyjnego do mikrosfer lipidowych.	42
4.4.2. Przygotowanie materiału biologicznego do badań.....	43
4.4.3. Obrazowanie przenikania mikrosfer lipidowych do mieszków włosowych.....	44

5. WYNIKI	45
5.1. WPŁYW RODZAJU EMULGATORA I WARUNKÓW PROCESOWYCH	45
5.1.1. Wpływ emulgatora Axol C 62 i warunków procesowych	45
5.1.2. Wpływ emulgatora Tego Care 450 i warunków procesowych.....	46
5.1.3. Wpływ emulgatora MSG i warunków procesowych	46
5.1.4. Wpływ emulgatora Tween 80 i warunków procesowych.....	47
5.1.5. Wyniki analizy Full Factorial Design	49
5.1.6. Badanie trwałości stałych cząstek lipidowych	51
5.2. WPŁYW STĘŻENIA EMULGATORA	53
5.3. WPŁYW ZASTOSOWANIA MIESZANINY EMULGATORÓW	56
5.4. WPŁYW DODATKU KONSERWANTU	56
5.5. BADANIA POTENCJAŁU DRAŻNIĄCEGO <i>IN VITRO</i>	57
5.6. BADANIE TOLERANCJI SKÓRNEJ <i>IN VIVO</i>	58
5.7. BADANIA PRZENIKANIA MIKROSFER DO MIESZKÓW WŁOSOWYCH	59
6. DYSKUSJA WYNIKÓW	70
7. WNIOSKI.....	82
V. PIŚMIENICTWO	83
VI. SPIS RYCIN	90
VII. SPIS TABEL.....	93
VIII. ZAŁĄCZNIKI	95

WYKAZ SKRÓTÓW I NAZW HANDLOWYCH

API	substancja lecznicza (eng. active pharmaceutical ingredient)
Axol C 62	stearylocytrynian glicerolu
Compritol 888 ATO	behenian glicerolu
DoE	metoda planowania doświadczeń (eng. design of experiments)
Euxyl PE 9010	fenoksyetanol, etyloheksylogliceryna
FFD	plan czynnikowy (eng. full factorial design)
HLB	równowaga hydrofilowo-lipidowa
MSG	monostearynian glicerolu
NLC	nanostrukturalne nośniki lipidowe (eng. nanostructured lipid carrier)
PdI	współczynnik polidispersji (eng. Polydispersity index)
PLGA	kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego
RBHE	ester heksylowy rodaminy B
RSD	względne odchylenie standardowe
RT	temperatura pokojowa
SLM	stałe mikrocząstki lipidowe (eng. solid lipid microparticles)
SLN	stałe nanocząstki lipidowe (eng. solid lipid nanoparticles)
Tego Care 450	distearynian poliglicerylo-3 metyloglukozy
Tween 80	polisorbat 80
Z-ave	średnia wielkość cząstek (eng. Z-average)
ZP	potencjał zeta (eng. zeta potential)
X _{sr}	średni wskaźnik podrażnienia

STRESZCZENIE

W toku przeprowadzonych doświadczeń zbadano wpływ warunków sporządzania i składu mikrosfer lipidowych na ich penetrację do mieszków włosowych. Parametrami, które różnicowały poszczególne formułacje były skład, moc dezintegratora ultradźwiękowego oraz czas prowadzenia procesu ich otrzymywania. W pierwszym etapie badań składy mikrosfer lipidowych różniły się między sobą rodzajem użytego emulgatora (Tego Care 450, Axol C 62, MSG i Tween 80). W drugiej kolejności zbadano wpływ stężenia emulgatora Tego Care 450, następnie oznaczono wpływ użycia mieszaniny emulgatorów (Tego Care 450 i Tween 80) w różnych stosunkach zawartości aby na koniec prześledzić wpływ konserwantu (Euxyl PE 9010) na właściwości sporządzonych cząstek lipidowych. W celu otrzymania mikrosfer zastosowano trzy różne wartości mocy aparatu – maksymalną, pośrednią i minimalną (50, 150 i 300 W). Czas prowadzenia procesu wynosił 5, 10 lub 15 minut. Do zaplanowania i analizy niektórych etapów wykonywanych badań posłużono się metodą planowania doświadczeń. Metodą sonikacji otrzymano w sumie 51 formułacji. Ocena wielkości cząstek, potencjału zeta i współczynnika polidispersji mikrocząstek za pomocą *full factorial design* pozwoliła wybrać parametry procesowe (maksymalna moc aparatu, około 12-minutowy czas trwania procesu oraz skład: Tego Care 450 w stężeniu 3,8%) umożliwiające otrzymanie sfer o optymalnych właściwościach.

Przeprowadzono również badania tolerancji skórnej na modelu *EpiDerm*[®]. Wykazały one, że mniejszy wpływ na żywotność komórek mają cząstki wytworzone z użyciem emulgatora Tego Care 450 (formulacja 15 i 39) w porównaniu z Tween 80 (formulacja 29). Badania *in vivo* potwierdziły dobrą tolerancję skórą mikrosfer lipidowych (formulacja 15 i 39), gdyż nie stwierdzono potencjału drażniącego.

W badaniach przenikania cząstek lipidowych do mieszków włosowych *in vitro* wykorzystano dwie formułacje, które różniły się wielkością cząstek. Zaobserwowano, że mikrosfery lipidowe o wymiarach 190 nm i 350 nm przenikają do mieszków włosowych i kumulują się w regionie *infundibulum*, ujściu gruczołu łojowego i regionie *bulge*.

SUMMARY

In the course of conducted experiments, the impact of the preparation conditions and composition of lipid microspheres on their penetration into the hair follicles were examined. The parameters that differentiated the individual formulations were: the composition, power of the ultrasonic disintegrator and the duration of the obtaining process. In the first stage of research, the composition of lipid microspheres differed in the type of used emulsifier (Tego Care 450, Axol C 62, MSG and Tween 80). Secondly, the effect of the emulsifier Tego Care 450 concentration was investigated followed by the effect of using a mixture of emulsifiers (Tego Care 450 and Tween 80) in various content ratios to finally observe the influence of the preservative (Euxyl PE 9010) on the properties of the lipid particles. To obtain microspheres, three different power values of the device were used - maximum, intermediate and minimum (300, 150 and 50 W). Processing time was 5, 10 or 15 minutes. In order to plan and analyze some of the stages of the research, the design of experiments method was used. A total of 51 formulations were obtained by sonication. Evaluation of the particle size, zeta potential and microparticles polydispersity index by means of *full factorial design* allowed to select process parameters (maximum power of the device, about 12 minutes duration of the process and composition: Tego Care 450 in a concentration of 3.8%) enabling obtaining particles with optimal physical properties.

Skin tolerance studies were carried out on the EpiDerm® model. They showed that particles produced using Tego Care 450 emulsifier (formulation 15 and 39) had a smaller effect on cell viability compared to Tween 80 (formulation 29). *In vivo* studies confirmed good skin tolerance of lipid microspheres (formulations 15 and 39) as no irritation potential was indicated.

Two formulations that differed in particle size were used to study the penetration of lipid particles into the hair follicles *in vitro*. It was observed that 190 nm and 350 nm lipid microspheres penetrate the hair follicles and accumulate in the *infundibulum* region, sebaceous gland outlet and bulge region.

I. WSTĘP

W niniejszej rozprawie doktorskiej zostały poruszone dwa ważne aspekty z zakresu technologii farmaceutycznej. Pierwszym z nich jest poszukiwanie alternatywnych dróg podania leków, które znajduje się w kręgu zainteresowań technologów farmaceutycznych od wielu lat. Przenikanie substancji leczniczych drogą transfolikularną przez długi czas nie było uznawane za istotne ze względu na niewielką powierzchnię jaką ujścia mieszków włosowych zajmują na skórze. Mieszek włosowy podzielony jest na regiony, które cechują się zróżnicowaną budową i pełnią określone funkcje. Częścią mieszka włosowego jest również gruczoł łojowy.

W literaturze opisane są trzy możliwości wykorzystania mieszka włosowego jako potencjalnego miejsca podania leku:

- Celowane podanie leku w różne obszary mieszka włosowego.
- Podanie leku do mieszka włosowego z możliwością przeniknięcia do tkanek otaczających.
- Podanie leku do mieszka włosowego z możliwością przeniknięcia do krwi i wywołania działania ogólnego [Wosicka, Cal, 2010].

Dotarcie substancji leczniczej do tej wyjątkowej struktury mogłoby przyczynić się do zoptymalizowania terapii chorób skóry. Firmy farmaceutyczne nieustannie pracują nad wynalezieniem nowych leków, które będą wykazywały przynajmniej tak samo dobre efekty terapeutyczne jak szeroko wykorzystywane w dermatologii substancje lecznicze np. sterydy w terapii łuszczycy czy tretynoina w leczeniu trądziku. Jednak do dnia dzisiejszego w Europie i Stanach Zjednoczonych w celu leczenia łysienia androgenowego, które jest najczęstszą przyczyną nadmiernego wypadania włosów, wykorzystywane są jedynie dwie substancje: roztwór minoksidilu (w stężeniach 2, 5 i 10%) do podania miejscowego oraz doustne tabletki zawierające finasteryd [Blume-Peytavi i in., 2019].

Drugim zagadnieniem, jakie poruszono w niniejszej pracy jest rozwój nowoczesnych postaci leku jakimi są zawiesiny mikrosfer lipidowych. W dermatologii czy kosmetyce stałe cząstki lipidowe są interesującym nośnikiem dostarczającym substancje leczniczą bądź substancję odżywcze do skóry. Pierwszymi kosmetykami na świecie zawierającym dyspersje lipidowe były Nanobase®- odżywka do skóry suchej oraz seria produktów z koenzymem Q10 niemieckiej firmy Dr. Rimpler GmbH. Aktualnie nanocząstki można znaleźć w produktach regenerujących do stóp, kosmetykach przeciwstarzeniowych, nawilżających i oczyszczających. Mikrosfery lipidowe wyróżniają się małymi wymiarami, dużą powierzchnią i możliwością dostarczenia leku w sposób kontrolowany, wykazując nawet przedłużone działanie. Dzięki tym cechom mogą być one wykorzystane jako nośniki substancji leczniczych do mieszków włosowych [Khezri i in., 2018, Lohani i in., 2014, Beloqui i in., 2016, Knorr i in., 2019].

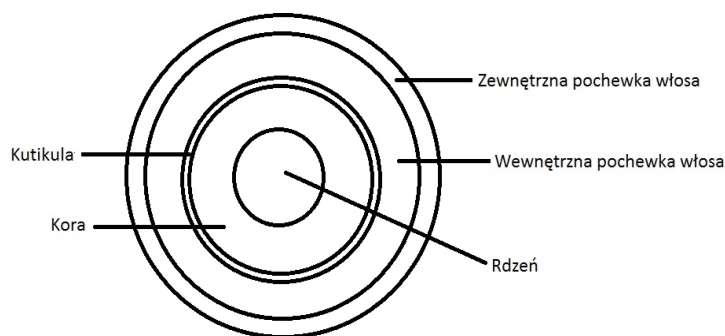
II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. CHARAKTERYSTYKA JEDNOSTKI FOLIKULARNEJ

1.1. BUDOWA MIESZKA WŁOSOWEGO I WŁOSA

Jednostką folikularną, nazywaną również jednostką włosowo-łojową, określamy strukturę zbudowaną z mieszka włosowego wraz z wyrastającym z niego włosem, mięsień włosowy oraz jeden bądź kilka gruczołów łojowych. Ten wyjątkowo interesujący, niewielki układ cechuje się długością od kilkuset mikrometrów do około czterech milimetrów. Pomimo niedużych rozmiarów jego budowa jest bardzo złożona. Jednostka włosowo-łojowa składa się z około 20 rodzajów komórek, pełniących określone funkcje. Są to między innymi komórki odpornościowe, macierzyste, melanocyty, komórki gruczołowe oraz naczynia krwionośne [Knorr i in., 2009].

Włosy występują na powierzchni niemal całego ciała człowieka, wyłączając jedynie takie obszary jak podeszwa stopy, wewnętrzna część dłoni i usta [Meidan i in., 2005]. Zbudowane są z białek keratyny, w 50% składają się z węgla, 20% z tlenu, 17% z azotu, 6% wodoru i w 5% z siarki. Włosy zawierają także śladowe ilości magnezu, arsenu, żelaza, chromu oraz innych metali i minerałów [Vogt i in., 2008]. W otaczającym włos mieszkę włosowym występuje flora bakteryjna, którą stanowią drożdżaki *Malassezia furfur* i bakterie z rodziny *Staphylococcus* i *Propioni* [Patzelt i in., 2008]. W przekroju poprzecznym trzon włosa tworzą trzy warstwy: rdzeń, kora i kutikula, otoczone dwiema pochwami (Ryc. 1). Jednak nie wszystkie rodzaje włosów posiadają rdzeń np. włosy skóry głowy są go pozbawione [Wosicka i Cal, 2010]. Kora zawiera melanosomy, które determinują kolor włosów, *kutikula* natomiast składa się z licznych warstw skeratynizowanych komórek. Komórki *kutikuli* włosa ułożone są dachówkowo, tworząc łuski włosowe.



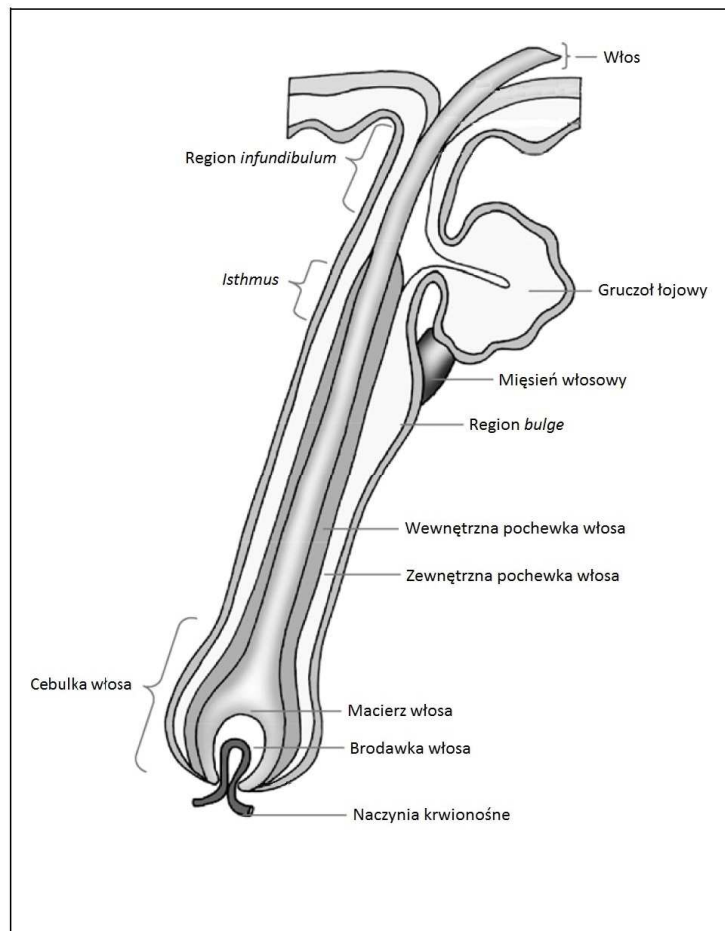
Rycina 1. Przekrój poprzeczny przez włos ludzki.

W jednostce folikularnej wyróżniamy cztery regiony, mające różną budowę i pełniące określone funkcje. Naukowcy badający przenikanie przez i do mieszków włosowych wskazują na możliwość podania substancji w określone miejsce mieszka włosowego wywołując tam działanie miejscowe, bądź przenikanie substancji leczniczej do krwiobiegu i przez to wywołanie działania ogólnego. Wykorzystanie złożonej budowy mieszka włosowego i potencjału jaki niesie za sobą ta struktura daje nie tylko nadzieję na efektywniejszą terapię chorób włosów czy skóry jak np. trądzik, ale również terapię genową i rozwój immunoterapii. Do obszarów struktury włosowo-łojowej, w których możliwe byłoby zastosowanie terapii celowanej zaliczamy: region *infundibulum*, region *bulge*, gruczoł łojowy i macierz włosa (Ryc.2).

- **region *infundibulum*** – zaczyna się na granicy ze skórą, a kończy w miejscu, gdzie gruczoł łojowy otwiera się na kanał włosa. W początkowej części pokryty jest warstwą komórek *stratum corneum*, która w niższych częściach traci swoją barierowość, a komórki są coraz cieńsze. Region ten otoczony jest dużą ilością naczyń krwionośnych, co umożliwiałoby ogólnoustrojowe przenikanie substancji leczniczych. Występują tutaj również komórki układu odpornościowego. Z tego powodu naukowcy upatrują w tym miejscu cel dla bezbolesnych szczepień. [Patzelt i in., 2008; Vogt i in., 2015].
- **gruczoł łojowy** – tutaj produkowane jest *sebum*. Ludzkie *sebum* składa się głównie z triglicerydów (57%), z wosków (26%) oraz ze skwalenu (2%). Ma ono właściwości przeciwgrzybiczne i przeciwbakteryjne, dodatkowo nawilża włosy i skórę. Jego sekrecja regulowana jest przez hormony płciowe, może zmieniać się wraz

z wiekiem i jest zależna od miejsca występowania gruczołu. Nadmierne pobudzenie czynności gruczołu łojowego jest przyczyną takich chorób jak trądzik czy łupież łojotokowy. Otaczają go liczne naczynia włosowate. Pomiędzy ujściem gruczołu łojowego, a regionem *bulge* występuje niewielki *isthmus* [Meidan i in., 2005].

- **region *bulge* (wybrzuszenie)** – w tym miejscu dochodzi do rekonstrukcji mieszka włosowego. Region ten jest zbudowany z komórek macierzystych, o dużym potencjale proliferacyjnym. Stanowi doskonałe miejsce docelowe dla leków medycyny regeneracyjnej, w leczeniu ran i genetycznych chorób skóry.
- **macierz włosa** – region znajdujący się najgłębiej, w cebulce włosa. Odpowiedzialny jest za wzrost włosa, który następuje dzięki podziałom keratynocytów [Knorr i in., 2009; Patzelt i in., 2008; Wosicka, Cal, 2010].



Rycina 2. Budowa jednostki folikularnej (na podstawie Patzelt i in., 2008)

1.2. RODZAJE WŁOSÓW

Gęstość występowania i cechy takie jak średnica czy długość włosów zależą od części ciała, na której się znajdują. U dorosłego człowieka wyróżniamy dwa główne rodzaje włosów: włosy mieszkowe (pierwotne) i włosy terminalne (ostateczne, dojrzałe). Te pierwsze charakteryzują się średnicą poniżej 30 μm i długością poniżej 2 cm, pozbawione są rdzenia i melaniny. Włosy mieszkowe zagłębione są na około 1 mm w skórze. Włosy terminalne posiadają średnice powyżej 60 μm i długość powyżej 2 cm, występują one w brwiach, rzęsach, na głowie, brodzie, klatce piersiowej, pod pachami czy w rejonie łonowym. Zagłębiają się na około 3 mm w głąb skóry przez co ich cebulki zlokalizowane są bardzo często w podskórnej warstwie tłuszczowej. Poza tymi dwoma rodzajami wyróżniamy również włosy „pośrednie”. Należą do nich włosy, które są w stadium przejściowym pomiędzy włosem mieszkowym a terminalnym [Knorr i in., 2009; Wosicka, Cal, 2010]. Włosy na głowie występują w jednostkach składających się z jednego do czterech włosów terminalnych i jednego do dwóch włosów mieszkowych. Brodawka włosa terminalnego wraz z macierzą odżywiana jest za pomocą naczyń włosowatych, natomiast włosy mieszkowe tych naczyń nie posiadają.

W badaniu z 2007 roku grupa naukowców dokonała morfometrycznych oznaczeń długości i pozycji poszczególnych obszarów mieszków włosowych włosów terminalnych i mieszkowych w ludzkiej skórze pochodzącej z głowy (Tab. 1) [Vogt i in., 2007].

Tabela 1. Wielkości opisujące regiony mieszków włosowych [Vogt i in., 2007].

Cecha mieszka włosowego	Mieszki włosów terminalnych	Mieszki włosów mieszkowych
Długość mieszka włosowego [μm]	3864 \pm 605	646 \pm 140
Długość <i>infundibulum</i> [μm]	580 \pm 84	225 \pm 34
Głębokość regionu <i>bulge</i> [μm]	1191 \pm 23	362 \pm 88
Długość regionu <i>bulge</i> [μm]	240 \pm 52	91 \pm 27
Średnica otworu włosowego [μm]	172 \pm 70	86 \pm 37

Średnica otworu mieszków włosowych włosów terminalnych wynosiła 172 μm na powierzchni skóry. Ale już na głębokości 350 μm zmniejszyła się do 68 μm

i pozostała niezmieniona. Mieszek włosa terminalnego cechował się średnią długością około 3,8 mm, natomiast włosa mieszkowego zaledwie 650 μm . Zmierzono również grubość nabłonka występującego w regionie *infundibulum* mieszka włosowego. Okazało się, że jest on znacznie cieńszy od *stratum corneum* otaczającego otwór włosowy. Dla mieszków włosów mieszkowych grubość nabłonka wyniosła 45 μm na głębokości 100 μm . Dla porównania warstwa rogowa otaczająca otwór mieszka miała w tym przypadku grubość 99 μm . Dla mieszków włosów terminalnych było to 65 μm na głębokości 150 μm w porównaniu ze *stratum corneum* o grubości 136 μm [Vogt i in., 2007]. Wartości te wyraźnie pokazują dużą różnicę w grubości pomiędzy nabłonkiem w mieszku włosowym a samym *stratum corneum*. Nabłonek występujący w mieszku włosowym w regionie *infundibulum* cechuje się grubością około 50% mniejszą od *stratum corneum* otaczającego otwór mieszka. Ze względu na zmniejszoną barierowość nabłonka w mieszku włosowym wskazano na możliwość lepszej penetracji substancji leczniczej w głąb skóry lub do krwiobiegu dzięki podaniu leku drogą transfolikularną w porównaniu z drogą transepidermalną.

1.3. GĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA WŁOSÓW

Gęstość występowania włosów na ciele człowieka jest zróżnicowana ze względu na miejsce ich występowania. Najwięcej włosów występuje na głowie, jest ich między 50 a 1000 na cm^2 [Meidan i in., 2005]. Otberg w 2004 roku, w jednej ze swoich prac zbadał wielkości mieszków włosowych i ich rozmieszczenie w różnych częściach ciała ludzkiego. Największą gęstość występowania włosów mieszkowych oznaczono na czole (292 mieszki włosowe/ cm^2), a najmniejszą na łydce i udzie, odpowiednio 14 i 17 na cm^2 . Natomiast największą średnicą otworu włosowego cechowały się włosy na łydce, a najmniejszą na czole. Zbadano również średnicę samego włosa. Najgrubsze okazały się włosy występujące na łydce (42 μm) i udzie (29 μm), średnica pozostałych wynosiła poniżej 20 μm . Ostatnim ze zbadanych parametrów była objętość mieszka włosowego. Największą cechowały się mieszki włosów czoła i łydki, najmniejszą natomiast przedramienia. Procent badanej powierzchni skóry, który pokrywały mieszki włosowe mieścił się w zakresach od 0,09%

na przedramieniu do 1,28% na czole. Autorzy zwracają jednak uwagę, że pomimo iż mieszki włosowe zajmują jedynie około 0,1% powierzchni ludzkiego ciała, stanowią one swego rodzaju „otwór” czy „wgłębienie” w skórze. Głębokość wewnętrzna mieszków włosowych wynosi około 3,8 mm dla włosów terminalnych i 0,6 mm dla włosów mieszkowych. Taka budowa zapewnia znacznie większą właściwą powierzchnię potencjalnego przenikania substancji leczniczych. Biorąc pod uwagę te założenia obliczono, że powierzchnia mieszków włosowych na czole odpowiadająca za penetrację wzrasta z 1,28% do 13,7% [Otberg i in., 2004; Patzelt i in., 2008].

1.4. AKTYWNOŚĆ WŁOSÓW

Już na początku rozwoju badań nad przenikaniem do mieszków włosowych zauważono, że penetracja substancji możliwa jest jedynie przez niewielką część mieszków włosowych. W badaniach przenikania mikrocząstek dwutlenku tytanu jedynie 10% mieszków włosowych zapewniło transport tego filtra przeciwsłonecznego w głąb jednostki folikularnej [Lademann i in., 1999]. Wyniki te pozwoliły na rozróżnienie dwóch rodzajów mieszków włosowych: otwartych (aktywnych) i zamkniętych (nieaktywnych). Kiedy włosy są w fazie wzrostu, a gruczoł łojowy wytwarza *sebum*, mieszki są „aktywne” i możliwa jest większa penetracja substancji leczniczych. Kiedy włosy nie rosną i nie odbywa się produkcja *sebum*, mieszki są „nieaktywne”, a penetracja substancji jest utrudniona [Lademann i in., 2001]. Wykazano, że włosy „nieaktywne” blokowane są przez „czop”, który musi zostać usunięty, tak aby substancje aplikowane w tym miejscu mogły przenikać w głąb [Lademann i in., 2015; Lademann i in., 1999]. W kolejnych etapach badań nad tym zjawiskiem scharakteryzowano strukturę blokującą mieszki włosowe (czop). Okazało się, że składa się ona ze złuszczonego korneocytów i wysuszonego *sebum*, która w wyniku wzrostu włosa czy wydzielania *sebum* jest wypychana na zewnątrz, co umożliwia otwarcie mieszków i wnikanie do nich substancji leczniczej. Wskazano również, że zastosowanie dodatkowych procedur podczas badania przenikania, takich jak delikatny peeling, czy usunięcie zawartości mieszka włosowego za pomocą kleju cyjanoakrylowego, umożliwia otwarcie zamkniętych mieszków włosowych [Lademann i in., 2015; Otberg i in., 2004].

1.5. FAZY ŻYCIA WŁOSA

W tak skomplikowanej strukturze, jaką jest mieszek włosowy, każdy włos przechodzi przez cykl życia, który pozwala na jego regenerację. Wyróżnić można trzy główne fazy życia włosa:

- **anagen** – będący fazą wzrostu włosa, w której komórki macierzyste znajdujące się w macierzy włosa dzielą się intensywnie. Faza ta trwa od 2 do 6 lat, w tej fazie znajduje się między 85% a 90% włosów skóry głowy. Jest to czas intensywnego wzrostu nie tylko włosa, ale i wszystkich komórek mieszka włosowego,
- **katagen** – faza zaniku, regresji, w której cebulka włosa przesuwa się wyżej w stronę regionu *bulge*, przez co włos traci swoją przyczepność do skóry. Faza ta trwa 2 tygodnie i obejmuje 1% do 2% włosów,
- **telogen** – około 10-15% włosów znajduje się w tej fazie, trwa ona od 2 do 4 miesięcy, jest to faza spoczynku [Knorr i in., 2009].

Poza wyżej wymienionymi, wyróżniono dodatkowo dwie fazy. Egzogen, który jest fazą wypadania włosa i kenogen, w którym mieszek włosowy jest pusty [Vogt, McElwee i Blume-Peytavi, 2008]. Łysienie androgenowe jest jedną z częstszych chorób włosa występujących zarówno u mężczyzn jak i kobiet. Polega ono na skróceniu fazy anagenu, co daje kliniczne objawy wypadania włosów i wystąpienia fazy kenogenu. Chorobie tej towarzyszy również zjawisko miniaturyzacji, która jest procesem zmiany włosa ostatecznego na włos mieszkowy - dużo mniejszy [Wosicka i Cal, 2010].

2. PRZENIKANIE NANOCZĄSTEK DO MIESZKÓW WŁOSOWYCH

Wyróżniamy cztery główne drogi transportu substancji przez skórę: drogę transepidermalną przez *stratum corneum*: międzykomórkową i przezkomórkową oraz drogę przez przydatki skóry: gruczoły potowe i mieszki włosowe (transfolikularną). Naukowcy zainteresowali się możliwością penetracji substancji do i przez jednostkę folikularną na początku lat dziewięćdziesiątych poprzedniego wieku.

Już na początku lat 90 naukowcy zauważyli, że mieszki włosowe mogą mieć większe znaczenie w transporcie przez skórę niż wcześniej sądzono. Wykazali, że penetracja substancji takich jak hydrokortyzon, kwas niflumowy, kofeina czy kwas p-aminobenzoowy przez skórę zawierającą mieszki włosowe jest kilkakrotnie większa niż przez skórę nieowłosioną [Illel i in., 1991]. W 1992 roku potwierdzono to doniesienie i dodatkowo zauważono, że przenikanie zależy od właściwości fizycznych badanej substancji i czasu jej aplikacji [Hueber i in., 1992]. W kolejnym roku Rolland ze swoim zespołem obserwował przenikanie mikrocząstek polimerowych (wielkość 5 μm), zawierających adapalen, do gruczołu łojowego [Rolland i in., 1993]. W roku 1999 Lademann i jego zespół badał przenikanie dwutlenku tytanu do warstwy rogowej naskórka i mieszków włosowych. Zauważyli oni, że filtr przeciwsłoneczny gromadził się głównie na powierzchni skóry i rejonie *infundibulum* mieszków włosowych [Lademann i in., 1999]. Dwa lata później ten sam naukowiec przyjrzał się zależności produkcji *sebum*, aktywności wzrostu włosa i wpływie tych czynników na przenikanie do mieszków włosowych. W ten sposób wyróżniono włosy „aktywne” i „nieaktywne”, o których wspomniano wcześniej. Kolejne lata przyniosły dalszy rozwój metod badania przenikania do mieszków włosowych, skupiono się na nowoczesnych postaciach leku promujących penetrację do mieszków włosowych. Ze względu na to, jak niewielkim układem jest jednostka folikularna (długość około 4 mm, średnica otworu włosowego około 200 μm) zaczęto wnikliwie badać wielkość i rodzaj cząstek, które najlepiej przenikałyby do tej struktury. Do cząstek, które promują penetrację do mieszków włosowych zaliczono stałe nanocząstki lipidowe, nanostrukturalne nośniki lipidowe oraz nanocząstki polimerowe. Grupa naukowców udowodniła, że nanocząstki wnikają znacznie lepiej do jednostki folikularnej, niż standardowe postaci leku. Porównano przenikanie dwóch formułacji, zawierających fluoresceinę, przez skórę świnią. Pierwsza zawierała barwnik inkorporowany w cząstkach o wielkości 320 nm, a drugą stanowił hydrożel. Zaobserwowano głębszą penetrację nanocząstek do mieszków włosowych. Dodatkowo dowiedli oni również, że w porównaniu z tradycyjnymi postaciami leku do podania na skórę formy zawierające nanocząstki mogą kumulować się w mieszkach włosowych do 10 dni, co oznacza, że ich obecność była wykrywalna o 6 dni dłużej niż po aplikacji konwencjonalnego żelu. Dzięki takim właściwościom mikrosfer lipidowych terapie

chorób skóry głowy byłyby mniej czasochłonne i uciążliwa dla pacjentów, gdyż mogłyby być stosowana co kilka dni, a możliwość gromadzenia się cząstek w jednostce folikularnej zapewniłyby długotrwałe działanie i rzadszą konieczność aplikacji produktu. [Lademann i in., 2007].

W literaturze znajdziemy doniesienia wskazujące na różne wymiary cząstek penetrujących w głąb mieszka włosowego. Tabela nr 2 ukazuje jak dużym zróżnicowaniem pod względem rodzajów i wymiarów cechują się sfery mogące przenikać drogą transfolikularną.

Tabela 2. Przykłady cząstek przenikających do mieszków włosowych.

RODZAJ CZĄSTKI	WIELKOŚĆ CZĄSTEK	ŹRÓDŁO
Mikrocząstki	0,75 – 6,0 μm	[Toll i in., 2004]
-	320 nm	[Lademann i in., 2007]
Nanocząstki PLGA i krzemionki	od 120 do 1000 nm	[Patzelt i in., 2011]
Nanocząstki polistyrenowe	20 i 200 nm	[Alvarez-Román i in., 2004]
Nanocząstki polikaprolaktonu i polietylenoglikolu	40 i 130 nm	[Shim i in., 2004]
SLN	198 nm	[Hamishehkar i in., 2016]
SLN	172 nm	[Wosicka-Fraćkowiak i in., 2015]
Nanocząstki lipidowe	242 nm	[Lohan i in., 2017]
NLC	200 nm	[Gomes Martins, 2014]
SLM	4,2 μm	[Lauterbach Mueller-Goymann, 2014]

Początkowo oznaczano głębokość penetracji cząstek do mieszków włosowych w zakresie od 750 nm do 6 μm . Najgłębiej okazały się przenikać cząstki o wielkości 1,5 μm [Toll i in., 2004]. W kolejnych latach naukowcy przeprowadzili pomiary penetracji cząstek kopolimeru kwasu mlekowego i glikolowego o dużo mniejszych wymiarach, od 100 do 900 nm. Zauważyli oni, że w przedziale wielkości 100-650 nm

im większe były cząstki, tym penetrowały głębiej. Najgłębiej, aż do regionu *bulge*, wnikały sfery o wielkości 643 nm. Sfery powyżej 650 nm penetrowały znacząco płycej, jednak wciąż osiągały głębokość 600 μm mieszka włosowego, co pozwoliło im osiągnąć ujście gruczołu łojowego. Co ciekawe, wyniki dla sfer najmniejszych były podobne do tych wykazywanych przez sfery największe. Cząstki o wielkości 122 nm i 860 nm docierały do głębokości około 600 μm mieszka. Na podstawie obserwacji, że głębokość penetracji cząstek zależy od ich wielkości, autorzy podkreślili możliwość zastosowania celowanej terapii w mieszkach włosowych. W takim przypadku, w zależności od wymiarów cząstek aplikowanej formacji, penetrowałyby one do określonej struktury mieszka włosowego i tam uwalniana byłaby substancja lecznicza wywołująca określone działanie [Patzelt i in., 2011].

W celu ułatwienia i zwiększenia penetracji cząstek do mieszków włosowych została opracowana metoda biopsji cyjanoakrylowej. Polega ona na aplikacji na skórę zawierającą mieszki włosowe kleju cyjanoakrylowego. Następnie pokrywa się klej taśmą i po wyschnięciu odrywa. Na taśmie pozostaje zawartość mieszków włosowych jak i około 30% *stratum corneum*. Procedura ta pozwala na otwarcie zamkniętych mieszków włosowych i przez to ułatwia przenikanie substancji [Toll i in., 2004; Vogt i in., 2015]. Biopsja cyjanoakrylowa poza odblokowaniem samego dostępu do nieaktywnych mieszków włosowych zapewnia również usunięcie zawartości *infundibulum* i samego włosa, co poza dodatkowym zwiększeniem penetracji do mieszków, umożliwia zwiększenie przestrzeni magazynowania w nim substancji leczniczej. Udowodniono, że mieszki włosowe stanowią znacznie efektywniejszy zbiornik dla substancji leczniczej niż *stratum corneum*, które ulega ciągłej keratynizacji. Wpływ na to ma budowa samego mieszka i wgłębienie jakie tworzy w skórze [Lademann i in., 2007; Ossadnik i in., 2006; Otberg i in., 2004].

Inną metodą zwiększającą penetrację cząstek do mieszków włosowych jest masaż. We wcześniej przytoczonej pracy badawczej porównującej przenikanie cząstek zawierających fluoresceinę dowiedziono również, że zastosowanie masażu po wcześniejszej aplikacji produktu zawierającego nanocząstki, promuje przenikanie formacji w głąb jednostki folikularnej. Tego zjawiska nie zaobserwowano dla hydrożelu. Dodatkowo zauważono, że kiedy tkanka nie była poddana masażowi głębokość penetracji dla obu formacji była taka sama. Autorzy podkreślili, że ruch

włosa w mieszkcu włosowym i jego dachówkowa powierzchnia działają na zasadzie „pompy”, która powoduje „zasysanie” cząstek o wielkości zbliżonej do wymiarów komórek keratyny (500-800 nm) w głąb mieszkca włosowego. To zjawisko zauważalne jest tylko w warunkach *in vivo*, jednak możliwe jest również jego wzbudzenie poprzez zastosowanie masażu w warunkach *in vitro*, dzięki temu spotęgowana zostaje penetracja cząstek lipidowych [Lademann i in., 2007].

Transport transfolikularny okazują się być również dużo szybszy niż transport transepidermalny. Naukowcy porównali te dwa rodzaje transportu po dwuminutowej aplikacji szamponu zawierającego kofeinę. Wyniki pokazały, że w przypadku przenikania przez mieszki włosowe stężenie na poziomie 6,3 ng/ml wykrywalne było we krwi po upływie 5 minut od aplikacji. Kiedy mieszki włosowe były zablokowane i możliwy był tylko transport przez skórę, stężenie takie we krwi zostało osiągnięte dopiero po 20-30 minutach. Po upływie 2 godzin stężenia osiągnęły wartości maksymalne około 20 ng/ml i były porównywalne dla obu rodzajów transportu [Otberg i in., 2007].

Do klasycznych metod badania przenikania *in vitro* należy model przepływowy z użyciem komór Franza z zastosowaniem skóry ludzkiej po biopsji lub modele zwierzęce. Do metod *in vivo* możemy zaliczyć *tape-stripping* oraz badanie stężeń we krwi czy moczu. Ze względu na charakterystyczną budowę mieszków włosowych opracowano dwie dodatkowe procedury badania penetracji drogą transfolikularną: metodę blokowania mieszków włosowych i metodę *differential stripping* [Patzelt i in., 2008]. Pierwsza z nich umożliwia porównanie przenikania przez skórę drogą transepidermalną i transfolikularną. W pierwszym etapie polega ona na zbadaniu transportu substancji przez skórę obiema drogami, aby w drugim etapie zablokować mieszki włosowe i oznaczyć przenikanie tylko drogą transepidermalną. Dzięki temu w łatwy sposób można zaobserwować jaki wpływ na przenikanie substancji ma transport transfolikularny. Blokowanie mieszków przeprowadza się za pomocą lakieru do paznokci [Teichmann i in., 2006], czy mieszaniny lakieru z woskiem [Otberg i in., 2007]. Badania te wykorzystano między innymi do oznaczenia przenikania filtrów przeciwsłonecznych, kurkumy i kofeiny. Druga z metod *differential stripping* polega na usunięciu za pomocą taśmy adhezyjnej warstw *stratum corneum* zawierających zaaplikowany preparat. Następnie na to samo miejsce aplikowany jest wspomniany

wcześniej klej cyjanoakrylowy, który pokrywa się taśmą. Po wyschnięciu taśma zostaje oderwana a zawartość mieszka włosowego wyizolowana. Technika ta umożliwia oznaczenie zawartości substancji leczniczej w jednostce folikularnej, ale może być również wykorzystana w celu zwiększania penetracji [Patzelt i in., 2008; Teichmann i in., 2005].

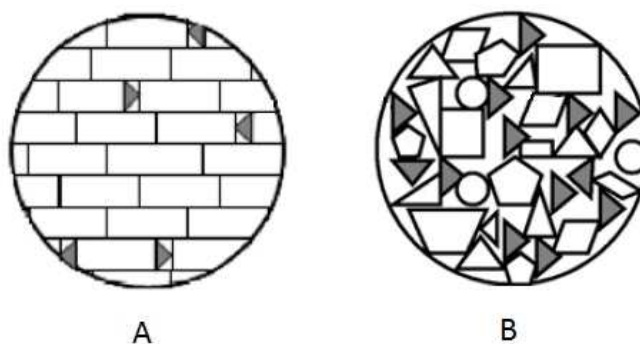
3. NANOCZĄSTKI LIPIDOWE

Definicja nanocząstki nie jest do dnia dzisiejszego jednoznaczna i różni się w zależności od dyscypliny naukowej. Przyjmuje się, że nanocząstki mają wielkości w zakresie nanometrycznym od 1 do 1000 nm. FDA natomiast definiuje nanocząstki jako struktury o wielkości poniżej 100 nm [Keck i Müller, 2013]. Komisja Europejska w 2011 roku określiła nanomateriały jako „naturalny, powstały przypadkowo lub wytworzony materiał zawierający cząstki w stanie swobodnym lub w formie agregatu bądź aglomeratu, w którym co najmniej 50% lub więcej cząstek w liczbowym rozkładzie wielkości cząstek ma jeden lub więcej wymiarów w zakresie 1-100 nm”. W przemyśle farmaceutycznym przyjmuje się, że nanocząstki stanowią sfery o wielkości od 10 do 1000 nm wytworzone z użyciem biozgodnej substancji [Khezri i in., 2018]. Początkowo ta nowoczesna postać leku rozwijana była pod kątem podania jej dożylnie. W 2005 roku zarejestrowano pierwszy na świecie lek zawierający nanocząstki, Abraxane®. Jest to zawiesina nanocząstek albuminy surowicy krwi ludzkiej, zawierająca paklitaksel. Lek ten stosowany jest w leczeniu raka piersi z przerzutami, w postaci wlewu dożylnego [Roberts i in., 2017].

Dyspersje lipidowe są to heterogenne systemy, których fazę wewnętrzną stanowi stały w temperaturze pokojowej i w temperaturze organizmu człowieka lipid, bądź jego mieszanina z lipidem ciekłym. Fazę zewnętrzną stanowi natomiast woda. Stabilizowane są przez jeden albo dwa emulgatory. Od początku lat 90, kiedy to pierwszy raz opracowano stałe lipidowe nanocząstki jako alternatywę dla istniejących już nośników substancji leczniczych: emulsji, liposomów i cząstek polimerowych, przeprowadzono setki badań rozwijających tą dziedzinę. Przyczyniła się do tego dostępność metod wytwarzania, brak właściwości toksycznych stosowanych składników, a także zalety w porównaniu do postaci tradycyjnych. Do stałych

nanocząstek lipidowych należą SLN i NLC. SLN zawierają matrycę lipidową zbudowaną z lipidu stałego w temperaturze pokojowej (w stężeniu od 0,1% do 30%) i emulgatora (w stężeniu od 0,5% do 5%). Druga generacja stałych cząstek lipidowych, NLC, zbudowana jest z mieszaniny lipidu stałego i ciekłego w stosunku 70:30. Te dwie grupy cząstek różnią się strukturą wewnętrzną (Ryc. 3). SLN mają budowę bardziej uporządkowaną, „cegiełkową”, natomiast NLC tworzą nieuporządkowane struktury o różnych kształtach. Dzięki takiej budowie cząstki drugiej generacji charakteryzują się większą pojemnością wewnętrzną, przez co mogą być do nich inkorporowane większe ilości substancji leczniczych [Garcês i in., 2018; Pardeike i in., 2009; Sala i in., 2018].

Zespół naukowców w 2004 roku otrzymał SLN i NLC zawierające substancję przeciwgrzybiczą – klotrimazol. Wykazali, że w cząstki NLC, ze względu na strukturę jaką posiadają, można inkorporować około 5-10% więcej substancji leczniczej niż w SLN. Uwalnianie API następowało z nich również szybciej. Natomiast cząstki SLN cechowały się lepszymi zdolnościami okluzyjnymi, co jest efektem pożądanym kiedy stosowane są na skórę [Souto i in, 2004].

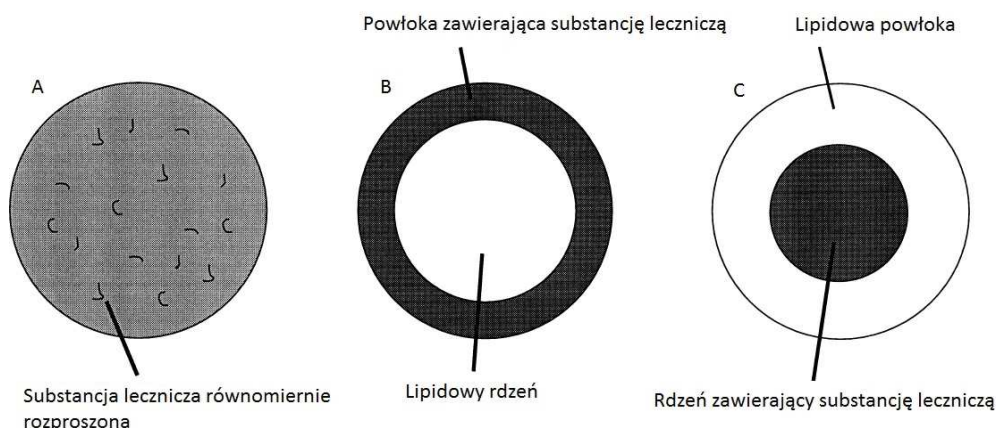


Rycina 3. Struktura wewnętrzna SLN (A), struktura wewnętrzna NLC (B) [Müller i in., 2007]

Opracowano wiele metod otrzymywania cząstek lipidowych. Do najpopularniejszych z nich należy: homogenizacja wysokociśnieniowa [Souto i in., 2004; Wissing i Müller, 2003] technika tworzenia mikroemulsji, metoda emulgowania i odparowania rozpuszczalnika, technika wysokoobrotowej homogenizacji i sonikacja. Sonikacja, która została zastosowana w niniejszej pracy, wyróżnia się łatwością prowadzenia procesy i brakiem użycia toksycznych, organicznych rozpuszczalników. Proces ten występuje w literaturze rzadko jako samodzielna metoda jest jednak nieskomplikowany i nie pochłania dużo czasu [Schwarz i in., 2012]. Metoda sonikacja

jest procesem polegającym na zmianie energii elektrycznej w energię fal dźwiękowych. Fale dźwiękowe rozchodzą się w medium i dzięki temu następuje dyspersja cząstek w roztworze. Metoda ta nie jest jednak pozbawiona wad. Podczas przeprowadzania procesu istnieje zagrożenie zanieczyszczenia formulacji metalami, które mogą się tam dostać z urządzenia. W porównaniu z homogenizacją wysokociśnieniową otrzymane cząstki tworzą układy mniej homogenne [Schwarz i in., 2012]. Tabela 3 przedstawia zestawienie rodzajów, wielkości i zastosowań cząstek otrzymanych za pomocą sonikacji.

Substancja lecznicza inkorporowana w cząstkach lipidowych może znajdować się w różnych częściach tej struktury, co będzie bezpośrednio wpływać na proces jej uwalniania. Wyróżniamy 3 główne modele (Ryc. 4): kiedy substancja lecznicza jest homogenicznie rozproszona w całej cząstce, kiedy znajduje się w otoczce i kiedy występuje w rdzeniu [Khezri i in., 2018]. To jaki układ zostanie otrzymany zależy od użytych substancji pomocniczych, właściwości API i samego procesu sporządzania. Model homogeny (A) powstaje w procesie homogenizacji na zimno, bądź przy zastosowaniu leku o właściwościach silnie lipofilowych, który dobrze rozpuszcza się w podłożu tłuszczowym i w procesie chłodzenia nie dochodzi do rozdzielenia faz między lipidem i lekiem. Model B powstaje, gdy substancja lecznicza tworzy w podłożu lipidowym roztwór nienasycony i lipid rekrytalizuje w pierwszej kolejności. Model C natomiast tworzy się, gdy roztwór jest prawie lub całkowicie nasycony i kiedy podczas procesu chłodzenia następuje przesycenie API w stopionym lipidzie i lek krystalizuje szybciej niż lipid [Müller, Radtke i Wissing, 2002; Müller, Mäder i Gohla, 2000].



Rycina 4. Modele inkorporacji substancji leczniczej do cząstek lipidowych SLN [Müller i in., 2000].

Tabela 3. Przykłady formułacji otrzymanych metodą sonikacji

RODZAJ CZĄSTKI	PODŁOŻE TŁUSZCZOWE/EMULGATOR	SUBSTANCJA LECZNICZA	ŚREDNIA WIELKOŚĆ CZĄSTEK	SPOSÓB PODANIE	ŹRÓDŁO
SLN	Compritol 888 ATO/Poloxamer 188	roksytromycyna	172 nm	Na skórę, do mieszków włosowych	[Wosicka-Fraćkowiak i in., 2015]
SLM	Różne	-	Od 1 do 30 μ m	Iniekcja dożylna	[Pietkiewicz i Sznitowska, 2004]
SLN	Compritol 888 ATO/Tween 80	-	<300 nm	-	[Sznitowska i in., 2017]
SLN	Compritol 888 ATO/Tego Care 450	-	<360 nm	-	[Sznitowska i in., 2017]
NLC	Compritol 888 ATO, Miglyol 812/Lutrol F68	ketoprofen naproxen	335 nm 380 nm	Na skórę	[Puglia i in., 2008]
SLN	Precirol ATO 5/Plantacare 810 UP	kwask flufenamowy	106 nm	Na skórę	[Schwarz i in., 2012]
NLC	Precirol ATO 5, Miglyol 812/Plantacare 810 UP	kwask flufenamowy	118 nm	Na skórę	[Schwarz i in., 2012]
SLN	Compritol 888 ATO/Lecytyna, polyoxyl (40) stearate	Mitoksantron	61 nm	Iniekcja podskórna	[Lu i in., 2006]
SLN	Compritol 888 ATO, Precirol ATO 5/ (Poloxamer 188, Tween 20 and Tween 80, laurylosiarczan sodu, dokuzynian sodu	Kwercetyna	Od 300 nm do > 1000 nm	Na skórę	[Bose i in., 2013]
NLC	Palmitynian cetylu, Miglyol 812/Tween 80	Metotreksat	< 500 nm	Na skórę	[Ferreira i in., 2015]
NLC	Witepsol E85, Miglyol 812/alcohol poliwinylowy	Metotreksat	252 nm	Ogólnoustrojowe i miejscowe na skórę	[Ferreira i in., 2016]
SLN	Compritol 888 ATO/Span 80	palmitynian glicerolu	270 nm	Na skórę	[Clares i in., 2014]

Stałe cząstki lipidowe badane są pod kątem możliwości podania ich do płuc, doustnie, dożylnie [Wissing i in., 2004], do oka [Fangueiro i in., 2014; Leonardi i in., 2014; Sánchez-López i in., 2017] i dostarczenia substancji leczniczej do mózgu [Jose i in., 2014; Kumar i in., 2014]. W dermatologii, do aplikacji na skórę, zastosowanie znajdują różne postaci leku, jednak tą najbardziej powszechną są preparaty półstałe: maści, kremy, żele. Nanocząstki lipidowe SLN czy NLC występują w formie wodnej dyspersji i cechują się niewielką lepkością. Aby uzyskać odpowiednią końcową półstałą postać preparatu konieczne jest zastosować jednej z dwóch strategii. Pierwsza, w której gotową zawiesinę bezpośrednio łączy się z wcześniej przygotowaną formą półstałą. Druga, która polega na zwiększeniu lepkości formulacji poprzez dodatek odpowiednich substancji pomocniczych [Garcês i in., 2018; Pardeike i in., 2009].

W skład cząstek SLN wchodzi podłoże tłuszczowe, emulgator i woda. Wybór odpowiednich substancji pomocniczych ma wpływ na właściwości fizyczne ostatecznego produktu. W tabeli 4 przedstawiono najczęściej stosowane substancje stosowane przy otrzymywaniu dyspersji lipidowych.

Tabela 4. Podłoża tłuszczowe i emulgatory używane do wytwarzania SLN do podania na skórę. Na podstawie [Garcês i in., 2018; Montenegro i in., 2016; Schäfer-Korting, Mehnert, Korting, 2007]

Nazwa	Nazwa handlowa
PODŁOŻA TŁUSZCZOWE	
Palmitynostearynian glicerolu	Precirol® ATO 5
Behenian glicerolu	Compritol® 888 ATO
Kwas palmitynowy	-
Wosk pszczeli	-
Palmitynian cetylu	Precifac® ATO 5, Cutina® CP
Tristearynian glicerolu	Dynasan® 118
Tripalimitynian glicerolu	Dynasan® 116
Trimyrystynian glicerolu	Dynasan® 114
Kwas stearynowy	-
EMULGATORY	
Polisorbat 80	Tween® 80
Polisorbat 20	Tween® 20
Distearynian poliglicerylo-3 metyloglukozy	Tego Care® 450
Poloxamer 407	Pluronic® F127
Polaxamer 188	Lutrol® F68, Pluronic® F68
-	Tyloxapol®
-	Miranol Ultra® C32
Lecytyna sojowa	-

Wybór odpowiedniego podłoża tłuszczowego, jego polarność i rozpuszczalność w nim substancji leczniczej mają wpływ na przenikanie leków w głąb skóry. Grupa naukowców porównała penetrację betametazonu ze stałych cząstek lipidowych, sporządzonych z użyciem różnych podłoży tłuszczowych, z konwencjonalną maścią. Wykazano, że znacznie większa część substancji leczniczej przedostawała się do skóry w przypadku aplikacji formułacji, gdzie nośnikiem były SLN. Przy aplikacji cząstek otrzymanych z użyciem Precirol® ATO 5 otrzymano najwyższe stężenia betametazonu w skórze, co wytłumaczono najlepszą rozpuszczalnością tej substancji leczniczej w podłożu, powinowactwem podłoża lipidowego do lipidów *stratum corneum*, jak również najmniejszą wielkością tych cząstek [Jensen i in., 2011].

Nanocząstki lipidowe posiadają wiele zalet w porównaniu z konwencjonalnymi postaciami leku stosowanymi na skórę. Mają one charakter lipofilowy, dzięki czemu

mogą łatwo pokonać barierę jaką jest *stratum corneum*. NLC i SLN wytwarzane są z substancji biozgodnych i biodegradowalnych, dlatego są nietoksyczne dla organizmu ludzkiego. Cząstki lipidowe wykazują lepsze wchłanianie przezskórne oraz cechują się kontrolowanym uwalnianiem substancji leczniczej. Kolejną zaletę stanowi zdolność cząstek lipidowych do ochrony fizycznej inkorporowanej w nie substancji leczniczej [Montenegro i in., 2016; Trombino i in., 2009]. SLN dają możliwość inkorporowania w nie substancji zarówno lipofilowych jak i hydrofilowych. Ponadto małe wymiary nanocząstek przyczyniają się do zwiększenia ich właściwości adhezyjne i powierzchni kontaktu z warstwą rogową, promując przenikanie leku przez skórę [Garcês i in., 2018; Pardeike i in., 2009]

Wissing i Müller porównali właściwości nawilżające dwóch preparatów. Pierwszym z nich była konwencjonalna emulsja o/w, a drugim emulsja zawierająca stałe cząstki lipidowe o wielkości 480 nm. Preparaty były aplikowane przez okres 4 tygodni. Po tym czasie przy pomocy korneometru oznaczono nawilżenie skóry. Wyniki pokazały, że obydwie formułacje wpłynęły korzystnie na poziom nawilżenia skóry, z tym że, formułacja zawierająca SLN w dużo większym stopniu [Wissing i Müller, 2003]. Zjawisko wzrostu nawilżenia skóry po aplikacji cząstek lipidowych zostało przez naukowców wytłumaczone zdolnością cząstek do tworzenia okluzyjnego filmu na powierzchni skóry, który ogranicza transepidermalną utratę wody. Jako drugi mechanizm tłumaczący te właściwości wymienili adhezję cząstek do *stratum corneum*, dzięki czemu wzmacniana zostaje bariera lipidowa skóry [Garcês i in., 2018; Müller i in., 2002].

W innym badaniu nanostrukturalne nośniki lipidowe zawierające leki przeciwzapalne takie jak ketoprofen i naproksen, poddane zostały badaniom przenikania przez skórę ludzką. Wykazano, że cząstki zdolne były przenikać i akumulować się w warstwie rogowej naskórka. Dodatkowo możliwe było zapewnienie przedłużonego uwalniania substancji leczniczej w skórze w porównaniu z roztworem. NLC wykazywały zdolności akumulacji w *stratum corneum* [Puglia i in., 2008]. Również Zoubari i jego zespół wskazują na przedłużone uwalnianie substancji z nośników lipidowych. Podkreślają, że zależy ono od struktury krystalicznej zastosowanego podłoża tłuszczowego i rozpuszczalności substancji leczniczej. Cząsteczki o budowie bardziej uporządkowanej uwalniały substancje leczniczą wolniej niż te, których

struktura była mniej uporządkowana [Zoubar i in., 2017]. Hamishehkar i jego zespół potwierdzili zdolność gromadzenia się cząstek lipidowych w skórze. Badali oni formułacje stałych cząstek lipidowych zawierających kofeinę, stosowanych w terapii cellulitu. Dowiedli oni, że formułacja SLN kumuluje się w skórze w większym stopniu niż standardowy hydrożel zawierający kofeinę. Potwierdzili również trzykrotnie mniejsze wchłanianie ogólnoustrojowe kofeiny z formułacji SLN [Hamishehkar i in., 2015].

Powyższe przykłady potwierdzają jak duże znaczenie dla rozwoju terapii w dermatologii miałyby zastosowanie dyspersji lipidowych. Sfery lipidowe umożliwiają lepszą penetrację składników do określonych tkanek, dzięki czemu możliwy byłby wzrost skuteczności i bezpieczeństwa terapii. Jednak poza wieloma wyżej wymienionymi zaletami SLN nie są one pozbawione wad. Największą z nich jest, wspomniana wcześniej, możliwość inkorporowania do nich tylko niewielkiej ilości substancji leczniczej, co wynika z budowy wewnętrznej cząstek. Ponadto w samej formułacji podczas przechowywania może dojść do zjawiska rekrytalizacji i wycieku substancji leczniczej spowodowanych zmianami w strukturze. Kolejną wadą tych nośników jest duża zawartość wody. Stanowi ona między 70 a 99,9% zawartości formułacji, przez co w procesie wytwarzania nie jest możliwe otrzymanie zawiesiny o wysokim stężeniu nanocząstek [Ganesan i Narayanasamy, 2017; Pardeike i in., 2009; Sala i in., 2018].

4. TOKSYCZNOŚĆ NANOCZĄSTEK

Nanocząstki stosowane na skórę, które przenikną do krwi, mogą wywierać działanie toksyczne. Badane były formułacje aplikowane podskórnym myszom będącym w ciąży, zawierające dwutlenek tytanu w formie nanocząstek. Okazało się, że TiO_2 penetruje do mózgu prowadząc do jego uszkodzenia, a także wpływa na redukcję dziennego wytwarzania niesienia u potomstwa płci męskiej [Takeda i in., 2009].

Keck i Müller zaproponowali w roku 2012 system klasyfikacji nanotoksyczności. Rozróżnia on 4 klasy bezpieczeństwa nanosfer w farmacji. Klasy te różnią się między sobą zakresem wielkości cząstek i biodegradowalnością. Cząstki biodegradowalne metabolizowane są w organizmie do związków naturalnie tam występujących. Autorzy zaznaczają, że problem bezpieczeństwa podania tak małych cząstek wiąże się

z ich większą adhezyjnością do powierzchni tkanki. Zakres wielkości, na którym skupiono się w tej kwalifikacji wynosi od 100 do 1000 nm. Wyznaczenie dolnej granicy na poziomie 100 nm spowodowane jest łatwiejszym przenikaniem cząstek o tych rozmiarach przez błony komórkowe. Do klasy pierwszej bezpieczeństwa zaliczamy cząstki o wielkości powyżej 100 nm i biodegradowalne, do drugiej cząstki o wielkości powyżej 100 nm, niebiodegradowalne. Grupę trzecią stanowią cząstki o wymiarach poniżej 100 nm, biodegradowalne i ostatnią cząstki o tych wielkościach niebiodegradowalne. Grupa I cechuje się brakiem lub niskim ryzykiem toksyczności. Do tej klasy możemy zaliczyć nanoemulsje, liposomy i cząstki lipidowe o odpowiedniej wielkości. Natomiast podane uprzednio jako przykład nanocząstki dwutlenku tytanu to klasa czwarta. Opisana powyżej klasyfikacja odnosi się do formulacji aplikowanych na skórę. Nanocząstki podane inną drogą powinny być rozpatrywane indywidualnie. Substancje inkorporowane w nanocząstki w zależności od ich dawki mogą charakteryzować się różną toksycznością. Zaproponowana kwalifikacja nie zwalnia z konieczności szerokiego spojrzenia na konkretne formulacje i przenikliwej analizy ich toksyczności. Autorzy zaznaczają konieczność standaryzacji metod oznaczania toksyczności nanocząstek, badania ich pod kątem biodostępności, farmakokinetyki, trwałości, degradacji, absorpcji przez komórki, interakcji z komórkami czy ich losu w komórkach [Keck i Müller, 2013].

5. METODA PLANOWANIA DOŚWIADCZEŃ

Idea posłużenia się analizą statystyczną na początku planowania doświadczeń a nie tylko analizą danych, które otrzymano w wyniku eksperymentu ma swoje początki w 1920 roku i jej autorem był Roland Fisher. W kolejnych latach zaznaczano, że odpowiednie zaplanowanie procesu zapewni wysoką jakość produktu. Tak powstał termin „Quality by Design” – jakość poprzez planowanie. Planowanie doświadczeń jest metodą polegającą na wykazaniu związku pomiędzy czynnikami wpływającymi na proces, a wynikami tego procesu. Czynnikiem mający największy wpływ określany jest jako parametr krytyczny procesu, a jego zmienność ma decydujący wpływ na jakość otrzymanego produktu i powinna być kontrolowana. Międzynarodowa Rada Harmonizacji w wytycznych dotyczących rozwoju produktów farmaceutycznych

(ICH Q8) wyróżnia również pojęcie krytycznych atrybutów jakości. Składają się na nie cechy chemiczne, fizyczne, biologiczne oraz mikrobiologiczne opisujące produkt, które powinny się mieścić w odpowiednich zakresach i potwierdzać jakość.

Planowanie eksperymentów pozwala na:

- wyznaczenie parametru mającego największy wpływ na końcowe cechy produktu,
- wyznaczenie optymalnej wartości czynnika dla osiągnięcia odpowiedniej jakości produktu,
- oznaczenie interakcji między czynnikami [Politis, i in., 2017].

Jednym z rodzajów planowania doświadczeń jest *full factorial design*. Umożliwia on zbadanie wszystkich możliwych zależności między czynnikami oraz czy badane czynniki mają wpływ na efekt końcowy. Planowanie doświadczeń jest narzędziem ułatwiającym pracę technologa a odpowiednia analiza danych pozwala na zmniejszenie ilości wykonywanych prób. Obniża również ilość użytych odczynników, przez co redukowane są koszty rozwoju nowego produktu [Shah i Pathak, 2010].

Full factorial design staje się metodą coraz częściej wykorzystywaną w projektowaniu doświadczeń. Jej zalety zostały wykorzystane również do optymalizacji wytwarzania SLN. Grupa naukowców z Portugalii za pomocą projektowania doświadczeń zbadała wpływ różnych czynników na wielkość stałych cząstek lipidowych wytworzonych metodą emulgowania i wyparowania rozpuszczalnika. Okazało się, że w tej technice otrzymywania cząstek największy wpływ na wielkość ma stosunek rozpuszczalnika do lipidu, a zwiększenie ilości rozpuszczalnika powoduje zmniejszenie wielkości cząstek. Rodzaj rozpuszczalnika, rodzaj lipidu oraz ilość emulgatora nie mają wpływu na wymiary, natomiast ilość użytego lipidu niewielki. Im mniej lipidu użyto, tym otrzymane cząstki były mniejsze. Udało się również wyodrębnić optymalne warunki otrzymywania sfer o konkretnych cechach. Wyniki przeprowadzonego eksperymentu świadczą o dużej przydatności metody i wskazują na ułatwienie pracy technologów farmaceutycznych [Vitorino i in., 2011].

Metoda planowania doświadczeń posłużyła również do zbadania wpływu stężenia lipidu i emulgatora na sporządzanie SLN zawierających linalol metodą wysokociśnieniowej homogenizacji na gorąco. Uzyskane dane pokazały istotność wpływu poszczególnych czynników na produkt końcowy, jak również umożliwiły

wyodrębnienie wartości czynników koniecznych do uzyskania formułacji optymalnej. Taką formułacją okazały się SLN składające się w 1% linalolu, 2% stałego lipidu, którym w tym wypadku był monostearynian glicerolu, 5% emulgatora oraz wody [Pereira i in., 2018].

Innej grupie naukowców metoda *full factorial design* ułatwiła rozwój i optymalizację wytwarzania SLN zawierających rywastygminę metodą homogenizacji wysokociśnieniowej. Czynniki, których wpływ na otrzymany produkt zbadano, były: stosunek stężenia leku do lipidu, stężenie emulgatora i czas homogenizacji [Shah i in., 2015].

Przytoczone przykłady pokazują, jak duże znaczenie w technologii farmaceutycznej, w której wiele różnych czynników może mieć wpływ na jakość otrzymanego produktu, może mieć metoda planowania doświadczeń. Dzięki niej proces rozwoju nowej postaci leku, czy nowego produktu, staje się o wiele łatwiejszy i szybszy. Metoda ta daje możliwość obserwacji zależności między czynnikami i pozwala w szybki i łatwy sposób zaplanować doświadczenie, przeanalizować uzyskane dane i wyciągnąć odpowiednie wnioski.

III. CELE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Głównym celem opisanych w tej rozprawie doktorskiej badań było określenie wpływu warunków procesowych otrzymywania i składu mikrosfer lipidowych na ich penetrację do mieszków włosowych. W przebiegu tego projektu wyróżnić można dwa etapy. Pierwszym z nich była optymalizacja wytwarzania stałych cząstek lipidowych metodą sonikacji. Polegała ona na wyodrębnieniu takich parametrów procesowych oraz wyborze takiego emulgatora, które pozwolą otrzymać cząstki o określonych właściwościach. W drugiej fazie badań skoncentrowano się na oznaczeniu penetracji otrzymanych mikrocząstek do mieszków włosowych.

Do szczegółowych etapów pracy należało:

- wybranie odpowiednich parametrów procesowych i rodzaju emulgatorów w celu otrzymania formułacji mikrocząstek lipidowych,
- wytwarzanie stałych cząstek lipidowych metodą z zastosowaniem ultradźwięków,
- ocena właściwości cząstek takich jak wielkość, potencjał zeta i współczynnik polidispersji,
- zbadanie zależności między parametrami procesowymi i cechami emulgatora na właściwości mikrosfer lipidowych,
- ocena potencjału drażniącego wybranych formułacji metodą *in vitro* i *in vivo*,
- inkorporacja barwnika RBHE w mikrosfery lipidowe,
- obrazowanie penetracji mikrosfer o różnych parametrach do mieszków włosowych.

Wszystkie etapy pracy realizowane były w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego we współpracy z Katedrą i Zakładem Biofarmacji i Farmakokinetyki i Centrum Naukowo-Badawczym Dr Irena Eris.

IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. ODCZYNNIKI

- Behenian glicerolu (Compritol 888 ATO), Gattefossé, Lyon, Francja,
- Distearynian poliglicerylo-3 metyloglukozy (Tego Care 450), Evonik Industries, Essen, Niemcy,
- Etanol 95^o, Polmos, Białystok, Polska,
- Ester heksylowy rodaminy B, Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA,
- Fenoksyetanol, etyloheksylogliceryna (Euxyl PE 9010), Schülke Inc., Norderstedt, Niemcy,
- 0,9% roztwór chlorku sodu, Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej, GUMed,
- Monostearynian glicerolu, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone,
- Olej z pestek winogron, Olitalia, Forli, Włochy,
- Polisorbat 80 (Tween 80), MP Biomedicals, Santa Ana, USA,
- Stearylocytrynian glicerolu (Axol C 62), Evonik Industries, Essen, Niemcy,
- Woda oczyszczona metodą wymiany jonowej i odwróconej osmozy, system Elix 3, Millipore, Bedford, USA.

2. APARATURA

- Analizator wielkości cząstek LS I3 320, Beckman Coulter, Brea, Kalifornia, Stany Zjednoczone,
- Aparat do pomiaru wielkości cząstek i potencjału zeta, Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, Wielka Brytania,
- Dezintegrator ultradźwiękowy typ UD-20, Techpan, Puławy, Polska,
- Kriotom Cryotome E, Thermo Shandon, Pittsburgh, USA,
- Masażer atom, Homedics, Opole, Polska,
- Mikroskop fluorescencyjny Nikon Eclipse 50i, kamera Nikon Digital Sight DS-5MC, lampa rtęciowa Nikon C-SHG1 i programam komputerowy NIS Elements Advanced

Research 3.2, Nikon Corporation, Tokyo, Japonia z zautomatyzowanym napędem osi Z Prior ES 102E/a, Scientific Instruments, Cambridge, Wielka Brytania,

- Płyta grzewcza SLK 1, Schott Instruments, Mainz, Niemcy,
- Program komputerowy SAS JMP wersja 320 8.0, SAS Institute, Cary, USA,
- Waga analityczna TYP WAX 62, Zakłady Mechaniki Precyzyjnej Radwag, Radom, Polska,
- Waga laboratoryjna PS 1200/C/1, Zakłady Mechaniki Precyzyjnej Radwag, Radom, Polska,
- pHmetr Five Easy F20, Mettler Toledo, Columbus, Stany Zjednoczone,
- Termometr laboratoryjny, szklany, bezręciowy, Merzet, Poznań, Polska.

3. MATERIAŁY

- Bibułki do testów tolerancji skórnej, SmartPractice Europe GmbH, Barsbüttel, Niemcy,
- Ludzki model naskórka *EpiDerm**, MatTek Corporation, Ashland, USA,
- Plaster Viscoplast, 3M, Maplewood, Stany Zjednoczone,
- Skóra ludzka, Zakład Patomorfologii, GUMed, Gdańsk, Polska.

*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 uzyskanych podczas operacji chirurgicznych.

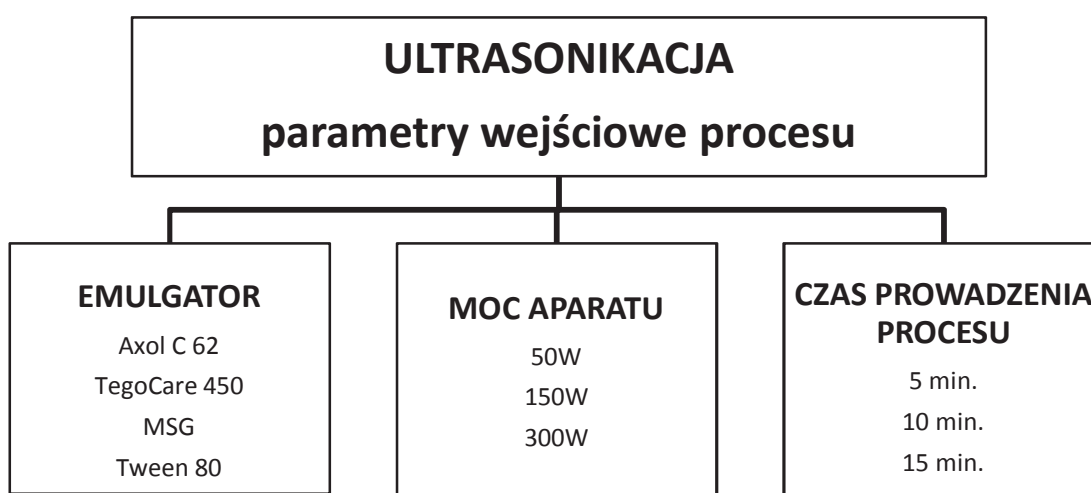
4. METODYKA

4.1. OPTIMALIZACJA WYTWARZANIA MIKROSFER LIPIDOWYCH

4.1.1. Wpływ rodzaju emulgatora i warunków procesowych

Planowanie otrzymywania mikrosfer lipidowych za pomocą full factorial design

Po przeprowadzeniu badań wstępnych zdecydowano się na zbadanie wpływu rodzaju emulgatora i warunków procesowych, takich jak moc aparatu i czas prowadzenia procesu na właściwości cząstek lipidowych (Ryc. 5). Biorąc pod uwagę czynniki wejściowe, ilość zmiennych, specyfikę procesu oraz cel pracy, przy projektowaniu i analizie wyników, posłużono się metodą planowania doświadczeń, a dokładniej *full factorial design*. To narzędzie pozwala na określenie istotności wpływu poszczególnych czynników wejściowych na wyjściowe właściwości otrzymanych mikrosfer, ale również na zbadanie wpływu występujących między nimi interakcji. Korzystano z programu SAS JMP wersji 320 8.0. W pierwszym etapie został wygenerowany zrandomizowany plan procesu wytwarzania, według którego otrzymywano poszczególne formułacje. W celu uzyskania zawiesin mikrosfer lipidowych posłużono się szybką i łatwą metodą sonikacji.



Rycina 5. Parametry wejściowe (różnicujące poszczególne formułacje) procesu otrzymywania mikrosfer lipidowych.

Otrzymywanie mikrosfer

Do otrzymania mikrocząstek lipidowych zastosowano dezintegrator ultradźwiękowy typu UD-20 o częstotliwości 20 kHz. Wszystkie mikrocząstki zostały przygotowane przy użyciu matrycy tłuszczowej, którą stanowił Compritol 888 ATO, wody oczyszczonej i środka konserwującego. Poszczególne formułacje różniły się natomiast między sobą rodzajem emulgatora i warunkami procesowymi ich otrzymywania (Tab. 5). W przebiegu badań wykorzystano 4 emulgatory: Axol C 62, Tego Care 450, MSG i Tween 80, podczas gdy zmiennymi opisującymi procedurę wytwarzania cząstek była moc aparatu, która wynosiła odpowiednio 50, 150 lub 300 W i czas prowadzenia procesu (5, 10 lub 15 minut). Na podstawie wygenerowanego planu otrzymano 36 formułacji, w trzech powtórzeniach. Szczegółowe składy i warunki wytwarzania wszystkich zawiesin mikrosfer lipidowych, otrzymanych w przebiegu prac badawczych, załączono na końcu niniejszej rozprawy doktorskiej.

Tabela 5. Skład i warunki otrzymywania formułacji 1-36.

Nr formułacji	Emulgator [2%]	Moc aparatu [W]	Czas [min.]
1-9	Axol C 62	50, 150, 300	5, 10, 15
10-18	Tego Care 450	50, 150, 300	5, 10, 15
19-27	MSG	50, 150, 300	5, 10, 15
28-36	Tween 80	50, 150, 300	5, 10, 15

Przed przystąpieniem do sporządzania odważono dwie fazy niezbędne w tym procesie. Fazę lipidową, którą stanowił emulgator w stężeniu 2% i podłoże tłuszczowe w stężeniu 5% oraz fazę wodną zawierającą wodę w ilości 92% i konserwant w stężeniu 1% (Ryc. 6). Jedynie w próbkach zawierających emulgator Tween 80 substancja ta dodawana była do fazy wodnej. Fazę tłuszczową topiono w temperaturze 70-80°C, a fazę wodną podgrzano do temperatury 70-80°C. Po osiągnięciu odpowiedniej temperatury przez układy, połączono je wlewając fazę tłuszczową do fazy wodnej i poddano działaniu ultradźwięków przy zastosowaniu odpowiednich parametrów procesowych. W ten sposób sporządzono formułacje zawiesin mikrosfer lipidowych, które ochłodzono w temperaturze pokojowej i rozdozowywano do plastikowych pojemników. Otrzymane próbki poddano pomiarom ich właściwości fizycznych.



Rycina 6. Schemat procesu otrzymywania mikrosfer lipidowych

Obserwacje wizualne

Cząstki były obserwowane pod kątem ich barwy, konsystencji i homogenności.

Pomiar wielkości cząstek

Oceny wielkości cząstek dokonano przy użyciu techniki dynamicznego rozproszenia światła za pomocą aparatu Zetasizer Nano ZS. Wyznacza on parametry opisujące cząstki takie jak współczynnik polidispersji czy średnia wielkość cząstek. Przed dokonaniem pomiaru próby rozcieńczano wodą oczyszczoną tysiącrotnie.

Pomiar potencjału zeta

Potencjał zeta zmierzono za pomocą aparatu Zetasizer Nano ZS techniką dopplerowskiej elektroforezy laserowej. Przed dokonaniem pomiaru próby były rozcieńczane tysiącrotnie wodą oczyszczoną.

Pomiar wartości pH

pH formulacji mierzono metodą potencjometryczną, za pomocą wcześniej skalibrowanej elektrody kombinowanej bezpośrednio zanurzonej w zlewce zawierającej zawiesinę. Dokonano trzech pomiarów dla każdej próbki.

Analiza full factorial design

Otrzymane wyniki przeanalizowano za pomocą programu komputerowego SAS JMP wersja 320 8.0. Jako parametry wyjściowe, opisujące cząstki, wybrano PDI, $d_{(0,9)}$ oraz potencjał zeta. W odpowiedzi został wygenerowany model, który na podstawie zadanych mu parametrów procesowych potrafi przewidzieć wartości zmiennych wyjściowych.

Na podstawie przeglądu piśmiennictwa podczas analizy przyjęto następujące zakresy kryteriów doświadczalnych dla parametrów wyjściowych:

- wielkość cząstek - $d_{(0,9)}$ do 650 nm,
- potencjał zeta od -25 do -50 mV,
- współczynnik polidispersji Pdl - wartości jak najmniejsze.

Badania trwałości

Po uzyskaniu wyników analizy metodą FFD wybrano formułacje, które poddano badaniom trwałości. Były to próby, do których wytwarzania zastosowano emulgator Tego Care 450 i MSG. Przechowywano je w plastikowych pojemnikach przez 2 miesiące w temperaturze pokojowej i 8°C. Po tym czasie poddano je ponownemu pomiarowi wielkości cząstek, potencjału zeta i pH w celu zaobserwowania ewentualnych zmian. Otrzymane wyniki przeanalizowano za pomocą programu komputerowego SAS JMP wersja 320 8.0. Procedury oznaczania charakterystyki cząstek jak i analizy FFD były jednakowe z opisanymi wcześniej.

4.1.2. Wpływ stężenia emulgatora

W wyniku analizy danych z badań wpływu rodzaju emulgatora i parametrów procesowych na mikrosfery lipidowe, zaprojektowany został eksperyment oznaczania wpływ stężenia emulgatora Tego Care 450 na właściwości mikrosfer lipidowych (Tab. 6). Mikrocząstki zostały przygotowane według wcześniej opisanego procesu. W przypadku tych badań posłużono się maksymalną mocą aparatu (300 W) przy zastosowaniu różnych czasów (5, 10 i 15 minut). W ten sposób otrzymano 9 formułacji różniących się stężeniem Tego Care 450. Dodatkowo przeprowadzono badania trwałości w temperaturze pokojowej i 8°C dla tych formułacji. Mikrosfery zostały zbadane pod kątem ich wielkości, potencjału zeta i pH, metodami opisanymi w punkcie 4.1.1 niniejszej rozprawy, zaraz po otrzymaniu i po dwumiesięcznym okresie przechowywania. Badanie zostało zaplanowane i wyniki zostały przeanalizowane przy pomocy programu SAS JMP wersja 320 8.0.

Tabela 6. Skład i czas prowadzenia procesu otrzymywania zawiesin mikrosfer lipidowych dla formułacji nr. 37-45.

Nr formułacji	Stężenie emulgatora (Tego Care 450)	Czas prowadzenia procesu [min]	Ilość fazy wodnej
37-39	4%	5/10/15	91,0%
40-42	2,5%	5/10/15	92,5%
43-45	1%	5/10/15	94%

4.1.3. Wpływ zastosowania mieszaniny emulgatorów

W kolejnym etapie badań zdecydowano się na sprawdzenie wpływu użycia mieszaniny emulgatorów na właściwości mikrosfer lipidowych. W tym celu wybrano dwa emulgatory, Tego Care 450 i Tween 80 i zastosowano je razem w różnych stężeniach (Tab. 7). Mikrosfery lipidowe zostały przygotowane i scharakteryzowane w taki sam sposób jak opisany wcześniej przy użyciu mocy 300 W i czasie 15 min.

Tabela 7. Stężenia emulgatorów w formułacjach 46-48.

	Formułacja 46	Formułacja 47	Formułacja 48
Tween 80	0,5	1,0	1,5
Tego Care 450	1,5	1,0	0,5

4.1.4. Wpływ dodatku konserwantu

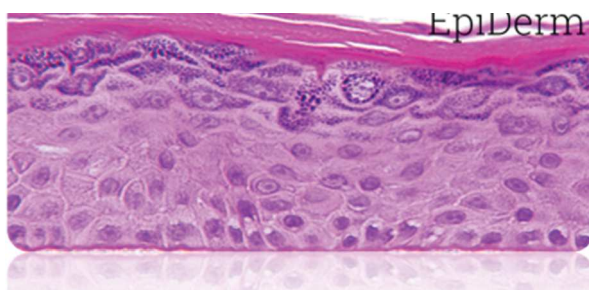
Ostatnim etapem badań nad wpływem czynników na właściwości otrzymanych mikrosfer lipidowych było oznaczenie zależności między użytym konserwantem (Euxyl PE 9010) a charakterystyką mikrocząstek lipidowych. Mikrosfery sporządzonych wyżej opisaną metodą sonikacji. Zastosowano emulgator Tego Care 450 w stężeniu 2%, moc aparatu 300 W nie dodając konserwantu. Proces prowadzono przez 5, 10 i 15 minut. Otrzymano 3 formułacje (49, 50 i 51).

4.2. BADANIA POTENCJAŁY DRAŻNIĄCEGO *IN VITRO*

Kontynuacją badań było określenie potencjału drażniącego mikrosfer lipidowych wyrażonego jako procentowy stopień przeżywalności komórek po aplikacji badanego preparatu na model naskórka *EpiDerm*[®] (Ryc. 7). Badanie to wykonano w Centrum Naukowo-Badawczym Dr Irena Eris w Warszawie. Oznaczano potencjał drażniący dla próbek nr 15, 29 i 39.



Rycina 7. Insert



Rycina 8. Przekrój poprzeczny

Na początku model *EpiDerm*[®] został umieszczony w inkubatorze na 24 godziny w celu kondycjonowania układu. Następnie badane formułacje były aplikowane na powierzchnię insertów na 60 min (Ryc. 8). Jednocześnie wykonano pozytywną próbę kontrolną, którą stanowił 5% roztwór SDS - dodecylsulfianu sodu w wodzie i próbę ujemną, którą była woda oczyszczona. Po upływie tego czasu inserty zostały kilkakrotnie przemyte w celu usunięcia testowanego preparatu i umieszczone w świeżym medium. Po około 40 godzinnym procesie inkubacji próbki przeniesiono do medium zawierającego sól tetrazoliową (MTT) w stężeniu 1mg/ml. Po 3 godzinach pobierano barwny produkt, który ekstrahowano izopropanolem i oznaczono

spektrofotometrycznie przy długości fali 570 nm. Średnia przeżywalność komórek dla pojedynczej próby była wyliczana jako procent średniej kontroli negatywnej.

4.3. BADANIA TOLERANCJI SKÓRNEJ *IN VIVO*

W celu zbadania potencjału drażniącego formułacji *in vivo* wykorzystano półotwarty płytkowy test dermatologiczny (Ryc. 9). Oceny tych właściwości dokonano na grupie 10 ochotników bez wywiadu alergologicznego, zapoznanych z przeciwwskazaniami i zaleceniami dotyczącymi badania. Badaniom poddano próbki nr 15 i 39. Formułacje cząstek lipidowych zostały w niewielkiej ilości zaaplikowane na papierowe płatki. Dodatkowo w celu zobiektywizowania wyników testu wykonano ślełą próbę, którą stanowił sam papierowy płatek oraz próbę z wykorzystaniem wody. Plaster przymocowano na przedramieniu wolontariuszy. Po upływie 48 godzin od nałożenia plastry zdjęto. Pierwszego odczytu dokonano po 15 minutach od zdjęcia plastra według poniżej skali (Tab. 8).

Tabela 8. Skala oceny reakcji skóry

Rumień	
0	Brak
0,5	Lekki odczyn rumieniowy
1	Odczyn rumieniowy (grudki)
2	Średni odczyn rumieniowy (grudki, pęcherzyki)
3	Silny odczyn rumieniowy (grudki, pęcherzyki, pęcherze)
4	Bardzo silny odczyn rumieniowy (widoczne owrzodzenie/nadżerka)
Obrzęk	
0	Brak
1	Bardzo lekki
2	Lekki
3	Umiarkowany
4	Bardzo silny



Rycina 9. Plasty przygotowane do aplikacji na skórę (lewa strona) i plaster zaaplikowany na skórę przedramienia (prawa strona).

Po upływie kolejnych 24 godzin dokonano ponownego odczytu. Na podstawie obserwacji reakcji skóry oceniony został potencjał drażniący i alergizujący badanych formułacji. Wyniki zostały przedstawione za pomocą wskaźnika podrażnień, który stanowi sumę wszystkich wyników podzieloną przez ilość odczytów. Uzyskana w ten sposób wartość umożliwia klasyfikację badanego produktu kosmetycznego według skali (Tab. 9). Ze względu na brak w składach formułacji substancji leczniczej i ich przyszłego zastosowania w preparatach kosmetycznych, do przeprowadzenia badań nie była wymagana zgoda komisji bioetycznej.

Tabela 9. Skala klasyfikacji produktu kosmetycznego

Średni wskaźnik podrażnienia – $X_{\text{śr}}$	Klasyfikacja wyrobu
$X_{\text{śr}} < 0,50$	Niedrażniący
$0,50 \leq X_{\text{śr}} < 2,00$	Lekko drażniący
$2,00 \leq X_{\text{śr}} < 5,00$	Umiarkowanie drażniący
$5,00 \leq X_{\text{śr}}$	Silnie drażniący

4.4. BADANIA PRZENIKANIA MIKROSFER LIPIDOWYCH *EX VIVO*

4.4.1. Inkorporowanie barwnika fluorescencyjnego do mikrosfer lipidowych.

Mikrosfery lipidowe inkorporowano barwnikiem fluorescencyjny, który stanowił ester heksylový rodaminy B, w stężeniu 0,005 mg/ml. W celu otrzymania cząstek o różnych wielkościami formułacje sporządzono w różnych warunkach procesowych (Tab. 10).

Tabela 10. Parametry procesu otrzymywania formułacji 52 i 53 oraz stężenie użytego emulgatora.

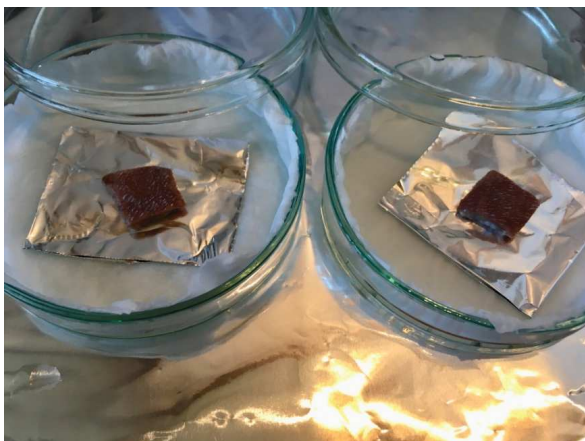
Nr formułacji	Stężenie emulgatora [%]	Czas otrzymywania [min.]	Moc aparatu [W]
52	2	15	300
53	2	5	150

Cząstki otrzymano metodą sonikacji opisaną w punkcie 4.1.1, z użyciem emulgatora Tego Care 450. Barwnik rozpuszczono w fazie tłuszczowej z dodatkiem kropli etanolu. Wielkość otrzymanych cząstek oznaczono za pomocą analizatora LS 13 320 firmy Beckman Coulter wykorzystującego technikę dyfrakcji laserowej.

4.4.2. Przygotowanie materiału biologicznego do badań.

Materiał biologiczny do badań przenikania mikrosfer lipidowych do mieszków włosowych został pobrany przez pracowników Zakładu Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego od nieżyjących dawców ze skóry głowy. Przechowywany był w zamrażarce. Przed przystąpieniem do badania skórę rozmroźono, usunięto z niej tkankę tłuszczową, oczyszczono jałowym roztworem 0,9% NaCl i osuszono bibułką. Włosy przycięto do kilku milimetrów.

W ten sposób przygotowaną tkankę pocięto na mniejsze kawałki i umieszczono na folii aluminiowej w płytce Petriego zawierającej zwilżoną w 0,9% roztworze NaCl ligninę (Ryc. 10). Kolejną niewielką ilość zawiesiny mikrosfer, 100 μm , zaaplikowano na skórę i przystąpiono do 5 minutowego masażu z użyciem masażera Atom (Ryc. 11). Preparaty inkubowano w cieplarni w temperaturze 37°C przez 60 min i 5 godzin. Po tym czasie materiał oczyszczono z nadmiaru preparatu i osuszono. Ślepe próby stanowiła skóra na którą zaaplikowano roztwór olejowy barwnika i skóra bez barwnika. Następnie przystąpiono do przygotowania przekrojów poprzecznych skóry. Próbkę umieszczono w aparacie Criotomu E gdzie zamroźono je w temperaturze -60°C aby w dalszym toku prac pociąć je, w temperaturze -25°C, na przekroje poprzeczne o grubości około 20 μm . Materiał biologiczny zbierano na szkiełkach podstawowych i poddawano obserwacjom mikroskopowym.



Rycina 10. Skóra ludzka z głowy przygotowana do aplikacji formułacji



Rycina 11. Proces masowania materiału biologicznego

4.4.3. Obrazowanie przenikania mikrosfer lipidowych do mieszków włosowych

Przekroje poprzeczne obserwowane były pod mikroskopem epifluorescencyjnym Nikon Eclipse 50i z lampą rtęciową. Ze względu na użyty barwnik RBHE i jego maksimum absorpcji promieniowania świetlnego przy długości fali 555 nm i emisji promieniowania świetlnego przy długości 579 nm zastosowano filtr zielony G 2A o zakresie 510-560 nm. Podczas obrazowania i edycji zdjęć wykorzystano automatyczny napęd, kamerę oraz program komputerowy NIS Elements AR 3.2. Otrzymywano zdjęcia przedstawiające głębokość wnikania preparatów w głąb mieszków włosowych. Dodatkowo zmierzono intensywność fluorescencji. Dla wszystkich prób zastosowano identyczne ustawienia kamery w celu umożliwienia późniejszego porównania wyników.

5. WYNIKI

5.1. WPŁYW RODZAJU EMULGATORA I WARUNKÓW PROCESOWYCH

Wszystkie zawiesiny po przygotowaniu miały płynną konsystencję i charakteryzowały się barwą od białej do jasno kremowej. pH formułacji mierzone było po ochłodzeniu każdej z próbek do temperatury pokojowej. pH zawiesin mieściło się w zakresie od 6,8 do 8,0.

5.1.1. Wpływ emulgatora Axol C 62 i warunków procesowych

Cząstki otrzymane przy użyciu emulgatora Axol C 62 miały wielkości od około 360 nm do 760 nm dla parametru $d_{(0,9)}$. Współczynnik polidispersji dla czterech formułacji z sześciu wynosił poniżej 0,3. Wyniki pokazały, że najmniejsze cząstki przy użyciu emulgatora Axol C 62 uzyskano stosując moc 150 W i podczas 10 minutowego czasu trwania procesu (Tab. 10, formułacja nr 2). Dwie z sześciu formułacji charakteryzowały się wielkościami powyżej 650 nm. Składy i warunki otrzymywania wszystkich formułacji opisane zostały w tabeli A (strona 95), która załączona jest na końcu niniejszej rozprawy.

Tabela 11. Średnie parametry opisujące cząstki otrzymane przy użyciu emulgatora Axol C 62.

Nr	$d_{(0,9)}$ [nm] ± RDS % N=3	$d_{(0,5)}$ [nm] ± RDS % N=3	Z-Ave [nm] ± RDS % N=3	PdI ± RDS % N=3
1	693,0 ± 15,16	232,2 ± 10,17	223,9 ± 4,53	0,289 ± 9,2
2	366,2 ± 17,9	106,4 ± 10,0	169,7 ± 11,7	0,237 ± 8,8
3	448,5 ± 7,4	172,5 ± 24,2	191,6 ± 7,0	0,229 ± 8,7
4	411,0 ± 27,5	157,8 ± 21,5	176,7 ± 11,8	0,220 ± 15,7
5	587,0 ± 33,7	159,8 ± 28,3	182,8 ± 5,9	0,305 ± 27,3
6	764,0 ± 36,1	197,8 ± 16,1	187,5 ± 5,5	0,322 ± 29,8

5.1.2. Wpływ emulgatora Tego Care 450 i warunków procesowych

Wielkości mikrosfer otrzymanych przy zastosowaniu emulgatora Tego Care 450 zawierały się w przedziale między 260 nm a 500 nm ($d_{(0,9)}$). Współczynnik polidispersji dla pięciu z sześciu formułacji wynosił poniżej 0,3. Wyniki wskazały, że najmniejsze cząstki uzyskano stosując moc 300 W podczas 15 minutowego okresu prowadzenia procesu (Tab. 11, formułacja nr 15). Sfery wytworzone przy mocy 300 W były mniejsze od tych otrzymanych z zastosowaniem mocy 150 W. Największymi wymiarami cechowała się formułacja 11.

Tabela 12. Średnie parametry opisujące cząstki otrzymane przy użyciu emulgatora Tego Care 450.

Nr	$d_{(0,9)}$ [nm] ± RDS % N=3	$d_{(0,5)}$ [nm] ± RDS % N=3	Z-Ave [nm] ± RDS % N=3	PdI ± RDS % N=3
10	461,3 ± 15,9	159,3 ± 30,2	198,7 ± 13,1	0,259 ± 4,5
11	501,8 ± 17,0	133,5 ± 38,4	189,8 ± 3,0	0,307 ± 23,7
12	316,8 ± 8,3	87,3 ± 8,8	155,3 ± 8,9	0,241 ± 5,3
13	339,8 ± 33,8	97,0 ± 27,1	164,1 ± 14,0	0,228 ± 12,3
14	300,7 ± 21,4	85,7 ± 10,9	149,4 ± 12,7	0,239 ± 7,2
15	261,2 ± 23,5	75,8 ± 10,3	136,9 ± 10,3	0,237 ± 10,0

5.1.3. Wpływ emulgatora MSG i warunków procesowych

Cząstki otrzymane przy użyciu emulgatora MSG miały wielkości od około 420 nm do 650 nm ($d_{(0,9)}$). Współczynnik polidispersji dla wszystkich formułacji wynosił poniżej 0,3. Zaobserwowano, że najmniejsze cząstki przy użyciu emulgatora MSG uzyskano stosując moc 300 W i 15 minutowy czas trwania procesu (Tab. 12, formułacja nr. 24). Wszystkie formułacje cechowały się większymi wymiarami niż wcześniej opisane, jednak żadna nie przekroczyła 650 nm.

Tabela 13. Średnie parametry opisujące cząstki otrzymane przy użyciu emulgatora MSG.

Nr	$d_{(0,9)}$ [nm] ± RDS % N=3	$d_{(0,5)}$ [nm] ± RDS % N=3	Z-Ave [nm] ± RDS % N=3	PdI ± RDS % N=3
19	645,6 ± 19,9	234,6 ± 9,8	210,0 ± 2,3	0,249 ± 12,5
20	492,8 ± 7,8	189,5 ± 24,7	196,5 ± 6,6	0,230 ± 16,6
21	440,0 ± 10,6	163,2 ± 33,2	190,1 ± 10,5	0,238 ± 19,0
22	471,0 ± 10,7	191,2 ± 16,9	201,6 ± 1,2	0,218 ± 24,4
23	446,0 ± 9,6	159,7 ± 40,8	190,7 ± 8,9	0,233 ± 18,2
24	420,3 ± 19,7	148,4 ± 47,5	181,9 ± 12,3	0,232 ± 16,5

5.1.4. Wpływ emulgatora Tween 80 i warunków procesowych

Cząstki otrzymane przy użyciu emulgatora Tween 80 przyjmowały wielkości od około 260 nm do 460 nm ($d_{(0,9)}$). Współczynnik polidispersji dla wszystkich formułacji wynosił poniżej 0,2 i cechował się bardzo niską wartością. Na podstawie otrzymanych wyników zauważono, że najmniejsze cząstki przy użyciu emulgatora Tween 80 uzyskano stosując moc 150 W i 10 minutowy czas trwania procesu (Tab. 13, formułacja nr 29).

Tabela 14. Średnie parametry opisujące cząstki otrzymane przy użyciu emulgatora Tween 80.

Nr	$d_{(0,9)}$ [nm] ± RDS % N=3	$d_{(0,5)}$ [nm] ± RDS % N=3	Z-Ave [nm] ± RDS % N=3	PdI ± RDS % N=3
28	307,2 ± 9,6	167,3 ± 12,8	171,6 ± 8,0	0,131 ± 5,5
29	262,2 ± 20,3	139,7 ± 35,9	154,6 ± 20,3	0,135 ± 25,5
30	442,5 ± 28,3	228,5 ± 27,1	212,4 ± 18,8	0,151 ± 12,3
31	334,3 ± 5,2	193,5 ± 2,9	187,8 ± 1,5	0,114 ± 11,6
32	370,8 ± 29,8	199,0 ± 27,6	193,1 ± 19,6	0,135 ± 9,9
33	460,0 ± 27,6	255,7 ± 20,6	234,2 ± 15,6	0,131 ± 21,5

Porównując wszystkie otrzymane formułacje, najmniejsze cząstki udało się uzyskać stosując emulgatory Tego Care 450 i Tween 80. Większe okazały się te wytworzone z MSG i Axol C 62. Co ciekawe, tylko dwie formułacje z wyżej opisanych (formułacja 1 i 6) i wszystkie otrzymane przy zastosowaniu mocy 50 W (właściwości tych cząstek pominięto w tabelach 10-14) posiadały średnią wielkość cząstek powyżej założonych 650 nm. Dla emulgatorów Axol C 62 i Tween 80, w procesie otrzymywania mikrosfer metodą sonikacji, optymalna okazała się moc 150 W i czas 10 minut. Dzięki takiemu zaprojektowaniu procesu udało się uzyskać formułacje o najmniejszych wielkościach cząstek. Natomiast dla Tego Care 450 i MSG maksymalny czas trwania sonikacji (15 minut) i maksymalna moc aparatu (300 W) pozwoliły uzyskać najmniejsze cząstki. Przy zastosowaniu mocy 300 W dla emulgatorów Axol C 62 i Tween 80 wydłużenie czasu homogenizacji spowodowało wzrost wielkości cząstek. Jednak dla emulgatorów MSG i Tego Care 450 zauważalne było zjawisko zupełnie odwrotne. Im dłuższy był czas homogenizacji tym mniejsze wymiary mikrosfer lipidowych obserwowano.

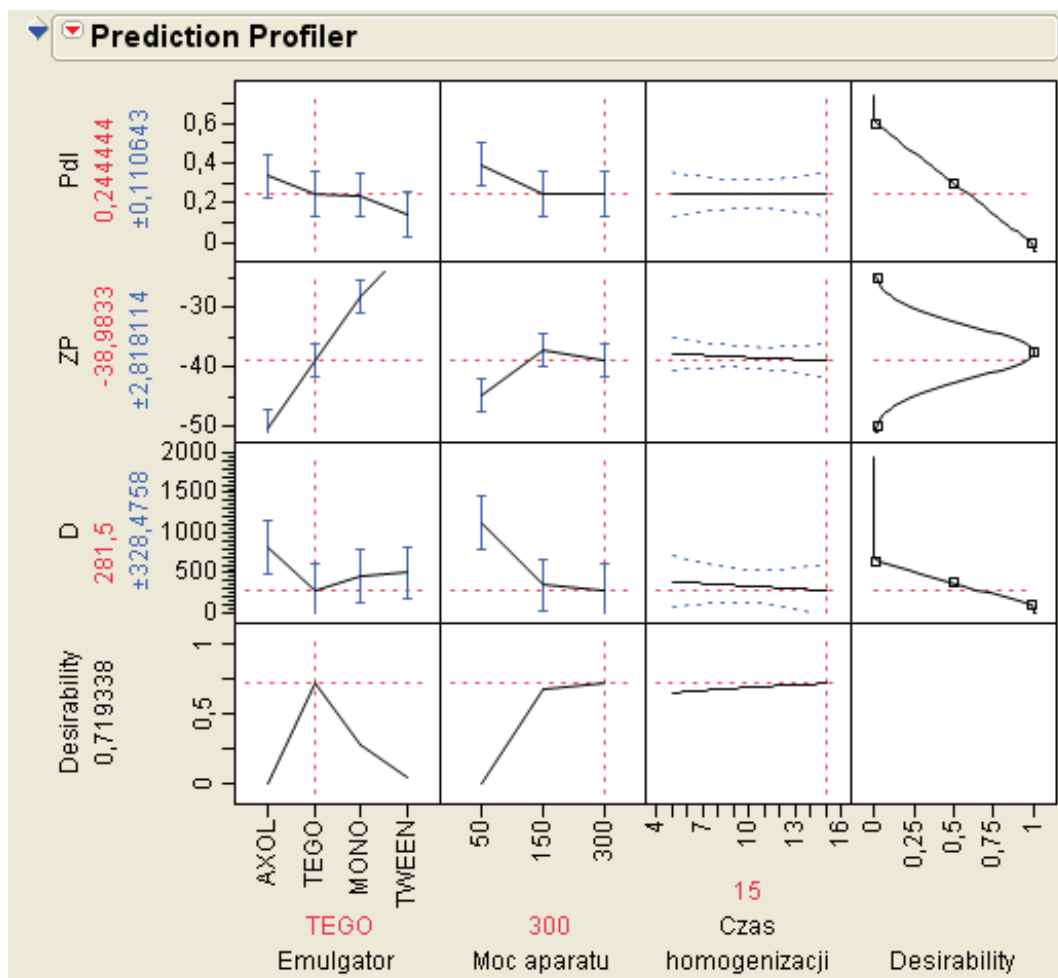
Potencjał zeta otrzymanych zawiesin wynosił pomiędzy -50 mV a -20 mV (Tab. 14). Najniższe wartości posiadały formułacje otrzymane przy użyciu emulgatora Axol C 62, było to między -50 mV a -40 mV, dla Tego Care 450 -42 mV do -37 mV i dla MSG od -27 mV do -38 mV. Wartości najwyższe, powyżej -22 mV, otrzymano dla formułacji wytworzonych przy użyciem emulgatora Tween 80.

Tabela 15. Wartości potencjału zeta dla formulacji przygotowanych przy użyciu różnych emulgatorów.

Emulgator	Nr	Potencjał zeta [mV] ± RDS % N=3	Emulgator	Nr	Potencjał zeta [mV] ± RDS % N=3
Axol C 62	1	-41,8 ± 5,7	MSG	19	-37,8 ± 10,6
	2	-48,6 ± 5,7		20	-33,5 ± 9,7
	3	-41,6 ± 18,5		21	-31,1 ± 3,9
	4	-48,4 ± 4,9		22	-31,7 ± 16,6
	5	-50,1 ± 6,7		23	-27,8 ± 14,1
	6	-49,2 ± 3,2		24	-30,0 ± 11,8
Tego Care 450	10	-41,7 ± 3,9	Tween 80	28	-22,3 ± 13,0
	11	-39,3 ± 3,2		29	-21,2 ± 6,0
	12	-37,4 ± 2,7		30	-19,9 ± 13,0
	13	-37,6 ± 1,7		31	-22,7 ± 12,2
	14	-38,1 ± 5,4		32	-21,2 ± 4,3
	15	-37,8 ± 8,3		33	-19,8 ± 3,0

5.1.5. Wyniki analizy *full factorial design*

Wyniki pomiarów wielkości cząstek, potencjału zeta i współczynnika polidispersji dla wszystkich 36 formulacji zostały przeanalizowane w programie SAS JMP. Otrzymano profil zależności poszczególnych parametrów wejściowych od parametrów wyjściowych otrzymanych formulacji (Ryc. 12).



Rycina 12. Profil wpływu zmiennych wejściowych na zmienne wyjściowe. Wpływ rodzaju emulgatora i parametrów procesowych na właściwości stałych cząstek lipidowych. Pojęcie desirability oznacza funkcję użyteczności czyli związek pomiędzy przewidywanymi odpowiedziami wielkości wyjściowej a użytecznością odpowiedzi. Przyjmuje ona wartości od 0,00 dla wartości niepożądanych do 1,00 dla wartości użyteczności bardzo pożądaných.

Wygenerowane przez program profile pokazały, w jakim stopniu poszczególne zmienne wejściowe wpływają na zmienne wyjściowe. Największy wpływ na parametry końcowe otrzymanych sfer miał rodzaj emulgatora, a najkorzystniejszym okazał się Tego Care 450. Moc aparatu w zakresie między 50 W a 150 W wpływała w dużym stopniu na właściwości cząstek, jednak w zakresie od 150 W do 300 W różnica ta nie była już taka duża i wpływ mocy był znacznie mniejszy. Pomimo to jako optymalna została przez program wskazana moc najwyższa. Czas trwania procesu miał najmniejszy wpływ na cechy stałych cząstek lipidowych, natomiast najkorzystniejsze dla właściwości końcowych mikrosfer okazało się prowadzenie sonikacji przez okres 15 minut. Na wszystkie trzy parametry wyjściowe (wielkość cząstek, wartość potencjału zeta i współczynnika polidispersji), w ich założonych kryteriach, największy wpływ miał rodzaj emulgatora i moc aparatu.

5.1.6. Badanie trwałości stałych cząstek lipidowych

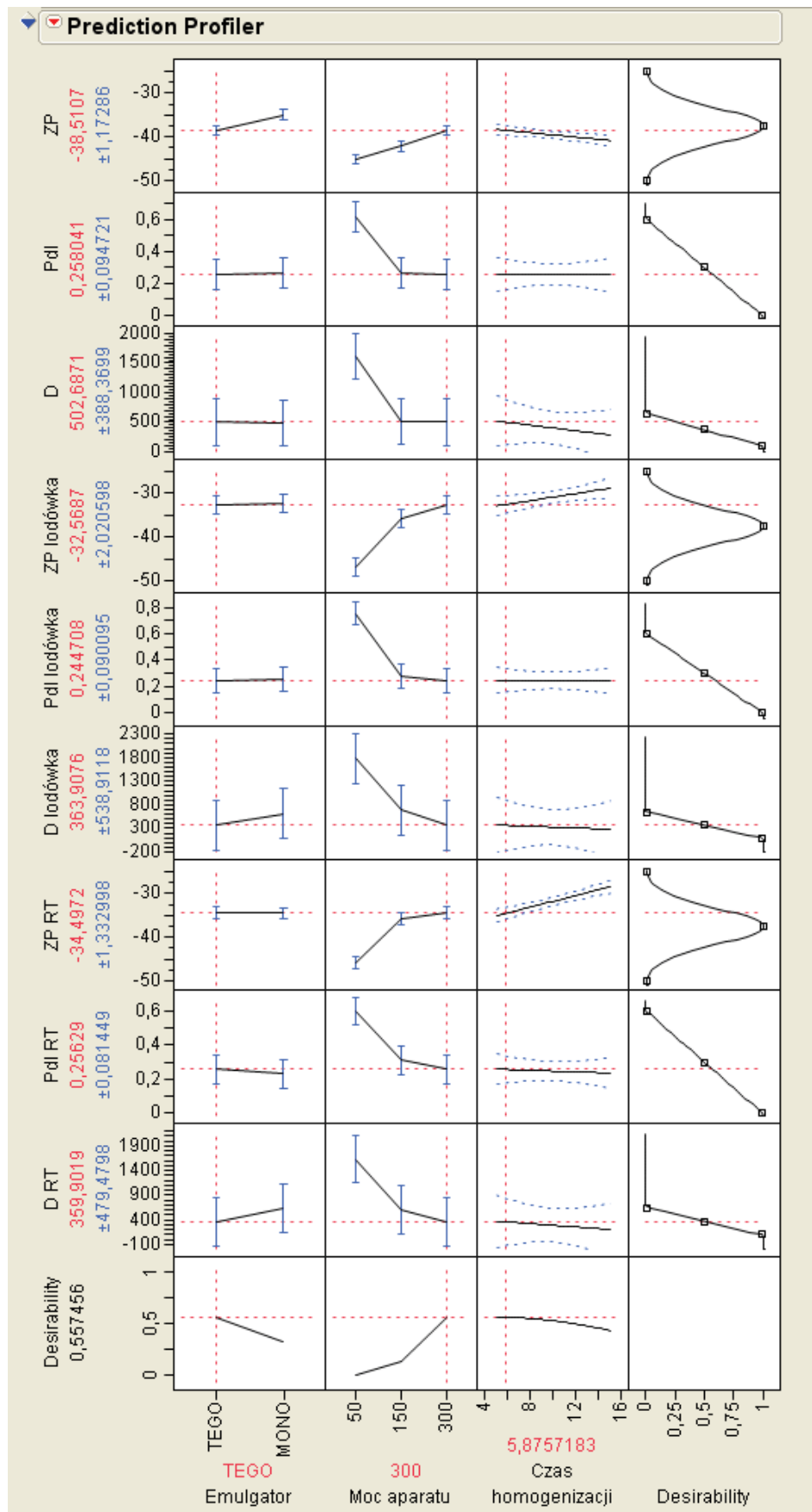
Mikrosfery otrzymane z użyciem Tego Care 450 i MSG poddano badaniom trwałości. Przechowywano je w temperaturze pokojowej i w temperaturze 2-8°C. Po upływie 8 tygodni przeprowadzono ponowne pomiary wielkości cząstek i potencjału zeta.

Formulacje po upływie tego czasu zmieniały konsystencje z płynnej na półstałą. Nie zaobserwowano natomiast zjawiska rozdziału faz. Dla każdej próbki, po okresie przechowywania, zmierzono również pH a jego wartości nie przekraczały 8,0. Tabela nr 15 przedstawia wyniki dla formulacji 15 i 24. Analizując poniższe dane można zauważyć, że wartości różniły się nieznacznie od początkowych. Widoczny jest przyrost wielkości cząstek o maksymalnie około 10 %. Potencjał zeta uległ tylko nieznacznym zmianom. Nie obserwowano również konkretnych zależności względem przechowywania mikrosfer lipidowych w lodówce i temperaturze pokojowej.

Tabela 16. Parametry opisujące cząstki po ośmiotygodniowym przechowywaniu w lodówce i temperaturze pokojowej.

Nr	Temperatura 2-8°C			Temperatura pokojowa (do 25°C)		
	Z-Ave [nm] ± RDS % N=3	PdI ± RDS % N=3	ZP [mV] ± RDS % N=3	Z-Ave [nm] ± RDS % N=3	PdI ± RDS % N=3	ZP [mV] ± RDS % N=3
15	141,0 ± 3,9	0,214 ± 14,59	-35,9 ± 21,82	130,3 ± 7,06	0,215 ± 8,68	-37,5 ± 24,51
24	200,6 ± 4,45	0,240 ± 16,00	-32,0 ± 4,31	193,6 ± 11,16	0,211 ± 13,92	-32,6 ± 1,81

Otrzymane wartości wielkości cząstek, potencjału zeta oraz współczynnika polidispersji poddano dodatkowo analizie FFD, w wyniku czego otrzymano profil wpływu poszczególnych czynników uwzględniając ich ośmiotygodniowe przechowywanie w różnych warunkach. Zakresy wartości zmiennych wyjściowych były takie same jak w poprzedniej analizie, a właściwości cząstek po upływie 2 miesięcy miały mieścić się w tych kryteriach.



Rycina 13. Profil wpływu zmiennych wejściowych na zmienne wyjściowe. Badania trwałości stałych cząstek lipidowych.

Rycina 13 przedstawia profil wpływu poszczególnych czynników wejściowych (rodzaj emulgatora, moc aparatu i czas trwania procesu) na właściwości cząstek w czasie 0 jak i po okresie przechowywania w lodówce i temperaturze pokojowej. Biorąc pod uwagę trwałość otrzymanych układów, największy wpływ na parametry wyjściowe formulacji ma moc aparatu. Widoczna jest znaczna różnica między mocą 150 a 300 W. Użycie wyższej mocy urządzenia pozwoliło otrzymać sfery o mniejszych wymiarach. Kolejnym istotnym czynnikiem był rodzaj emulgatora. W tym wypadku ponownie emulgator Tego Care 450 pozwoliłby uzyskać formułacje o optymalnych właściwościach. Podobnie jak w poprzedniej analizie FFD czas okazał się nie stanowić istotnego parametru dla właściwości cząstek i mógłby zostać skrócony do około 6 minut. Takie postępowanie pozwoliłoby w dalszym ciągu zachować optymalne parametry końcowe mikrocząstek lipidowych.

5.2. WPŁYW STĘŻENIA EMULGATORA

W kolejnym etapie zbadano wpływ stężenia emulgatora Tego Care 450 na właściwości mikrosfer lipidowych. Zaobserwowano, że niezależnie od stężenia Tego Care 450, im dłuższy był czas otrzymywania mikrocząstek, tym posiadały one mniejsze wielkości, co potwierdziło wcześniejsze wyniki. Cząstki o najmniejszych wymiarach otrzymano przy użyciu 4% Tego Care 450 w ciągu 15 minut prowadzenia procesu. $d_{(0,5)}$ dla tych cząstek wynosiło 52 nm, a $d_{(0,9)}$ 259 nm (Tab. 16, formułacja 39). Różny czas prowadzenia procesu umożliwił otrzymanie cząstek o zróżnicowanych właściwościach. Cząstki otrzymane w czasie 5 minut i zakresie stężeń emulgatora 4, 2,5 i 1% przekraczały wymiarami 650 nm. Wyniki zobrazowały, że przy większych stężeniach Tego Care 450 krótki czas prowadzenia procesu jest niewystarczający, aby uzyskać cząstki o wielkości poniżej 650 nm. Współczynnik dyspersji dla tych prób był również dość wysoki i wynosił powyżej 0,3. Dodatkowo zauważono, że najbardziej jednolite pod względem wielkości cząstki uzyskano, niezależnie od czasu prowadzenia procesu, stosując emulgator Tego Care 450 w stężeniu 2%. Potencjał zeta otrzymanych cząstek zawierał się w przedziale między -42mV a -25mV (Tab. 17).

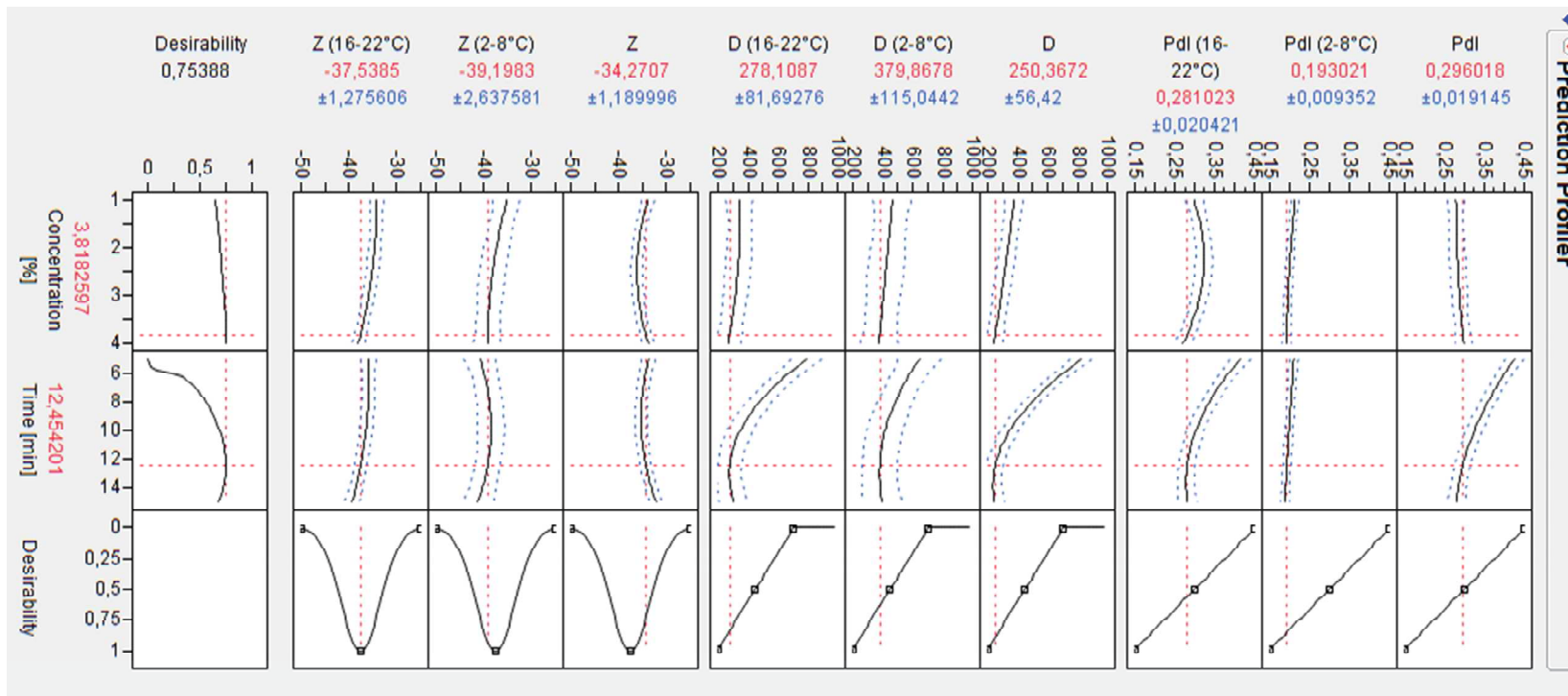
Tabela 17. Średnie parametry opisujące cząstki otrzymane przy użyciu różnych stężeń emulgatora Tego Care 450.

Nr	$d_{(0,9)}$ [nm] ± RDS % N=3	$d_{(0,5)}$ [nm] ± RDS % N=3	Z-Ave [nm] ± RDS % N=3	PdI ± RDS % N=3
37	806,0 ± 13,5	189,0 ± 51,8	207,8 ± 2,6	0,420 ± 3,8
38	343,0 ± 7,6	60,5 ± 20,0	148,8 ± 1,1	0,339 ± 9,7
39	259,0 ± 21,0	52,2 ± 18,2	135,6 ± 0,5	0,283 ± 1,2
40	862,0 ± 3,3	196,0 ± 41,8	229,9 ± 2,6	0,409 ± 4,0
41	337,7 ± 7,1	59,7 ± 25,0	159,7 ± 1,1	0,283 ± 1,1
42	307,3 ± 19,4	66,4 ± 32,1	143,5 ± 1,3	0,274 ± 1,1
13	339,8 ± 33,8	97,0 ± 27,1	164,1 ± 14,0	0,228 ± 12,3
14	300,7 ± 21,4	85,7 ± 10,9	149,4 ± 12,7	0,239 ± 7,2
15	261,2 ± 23,5	75,8 ± 10,3	136,9 ± 10,3	0,237 ± 10,0
43	690,7 ± 12,7	187,7 ± 23,3	219,1 ± 1,6	0,330 ± 7,7
44	443,0 ± 13,4	99,2 ± 9,2	173,6 ± 0,6	0,296 ± 13,3
45	454,3 ± 12,8	96,9 ± 7,8	172,3 ± 0,6	0,288 ± 4,3

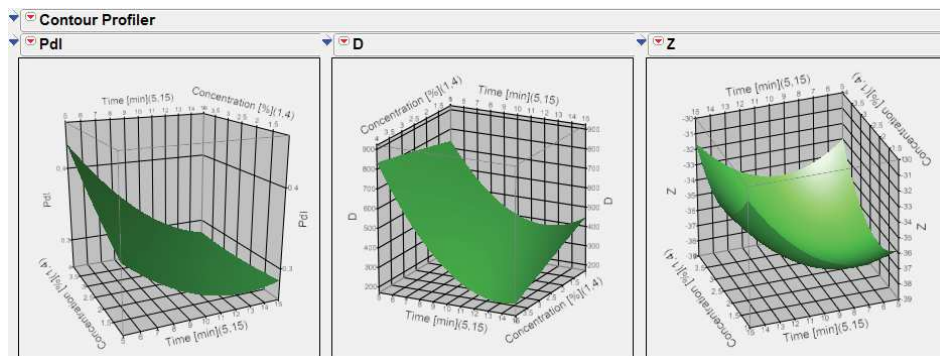
Tabela 18. Wartości potencjału zeta dla formulacji przygotowanych przy użyciu różnych stężeń emulgatorów, mieszaniny emulgatorów i formulacji bez użycia konserwantu.

Emulgator	Nr	Potencjał zeta [mV] ± RDS % N=3	Emulgator	Nr	Potencjał zeta [mV] ± RDS % N=3
Tego Care 450, różne stężenia	37	-32,6 ± 0,9	Mieszanina Tween +Tego Care 450	46	-31,6 ± 3,4
	38	-33,6 ± 2,9		47	-32,6 ± 1,5
	39	-33,1 ± 0,5		48	-25,5 ± 1,8
	40	-38,2 ± 1,7	Bez konserwantu	49	-40,9 ± 2,5
	41	-38,5 ± 0,6		50	-41,4 ± 1,5
	42	-31,3 ± 2,1		51	-42,4 ± 0,7
	43	-34,8 ± 1,1			
	44	-35,6 ± 1,4			
	45	-31,8 ± 4,6			

A



B



Rycina 14. A-Profil wpływu zmiennych wejściowych na zmienne wyjściowe. Wpływ stężenia emulgatora na właściwości mikrosfer lipidowych, B-Wykresy powierzchni odpowiedzi ukazujące wpływ stężenia emulgatora i czasu na takie właściwości cząstek jak wielkość, współczynnik polidispersji i potencjał zeta.

Powyższy profile przedstawiają zależności między stężeniem emulgatora Tego Care 450 i czasem prowadzenia procesu sonikacji a właściwościami mikrosfer lipidowych (formulacje 37–45 i 13-15) uwzględniając również badania ich trwałości (Ryc. 14). Największy wpływ na wartości parametrów wyjściowych miał w tym przypadku czas prowadzenia procesu. Najbardziej optymalny wynosiłby niewiele ponad 12 minut. Stężenie emulgatora okazało się mieć dość niewielki znaczenie, ale optymalną wartością obliczoną przez program było stężenie około 3,8%.

5.3. WPŁYW ZASTOSOWANIA MIESZANINY EMULGATORÓW

Użycie emulgatora Tego Care 450 w połączenie z Tween 80 nie wpłynęło pozytywnie na właściwości otrzymanych cząstek. Wielkość cząstek formulacji 47 i 48 znacznie przekraczała 650 nm (Tab. 18). Jedynie formuacja 46 cechowała się mniejszymi wymiarami cząstek, a jej współczynnik polidispersji wynosił 0,4. Wartości potencjału zeta dla wszystkich z tych formuacji były ujemne (Tab. 17).

Tabela 19. Właściwości cząstek otrzymanych przy użyciu mieszaniny emulgatorów

Nr	$d_{(0,9)}$ [nm] ± RDS % N=2	$d_{(0,5)}$ [nm] ± RDS % N=2	Z-Ave [nm] ± RDS % N=2	PdI ± RDS % N=2
46	475,0 ± 1,19	70,5 ± 1,51	166,8 ± 1,06	0,400 ± 2,83
47	2400,0 ± 2,36	191,0 ± 0,74	192,2 ± 0,37	0,256 ± 3,87
48	1166,0 ± 23,89	458,0 ± 14,40	292,1 ± 0,44	0,247 ± 3,65

5.4. WPŁYW DODATKU KONSERWANTU

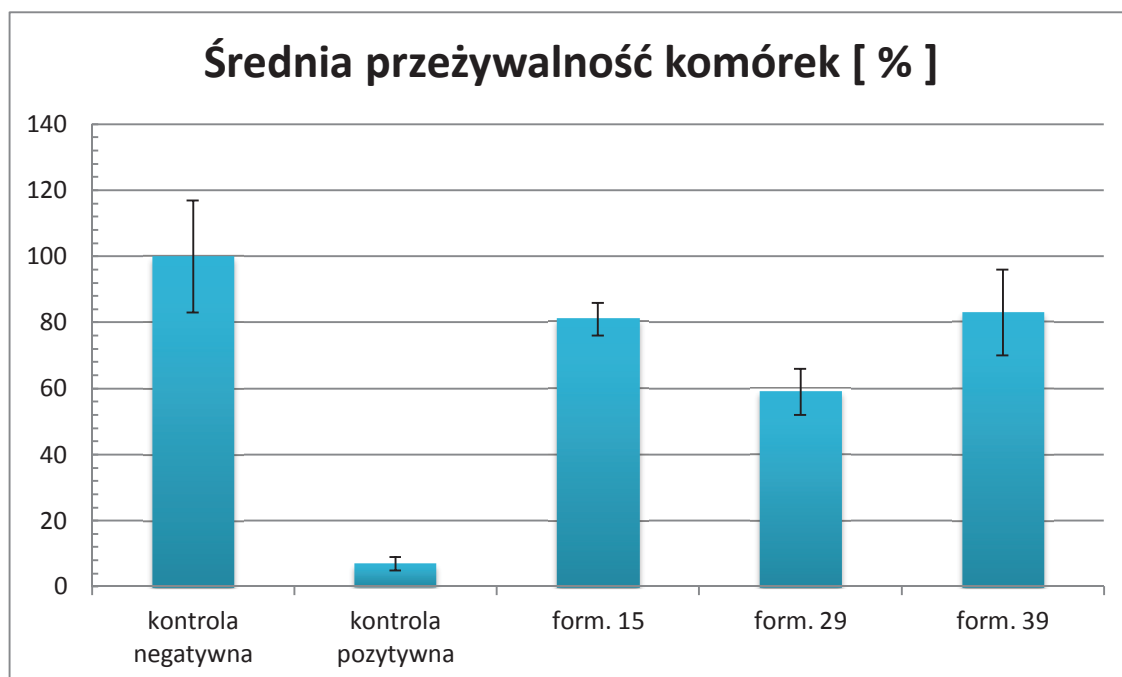
W celu porównania właściwości cząstek otrzymanych przy użyciu emulgatora Tego Care 450, zamierających Euxyl PE 9010, z cząstkami nie zawierających tego konserwantu, otrzymano 3 formuacje. Wielkości cząstek trzech sporządzonych zawiesin przekraczają 450 nm. Potencjał zeta wynosił około -40 mV (Tab. 17 i 19).

Tabela 20. Właściwości cząstek otrzymanych bez użycia konserwantu Euxyl PE 9010

Nr	$d_{(0,9)}$ [nm] ± RDS % N=3	$d_{(0,5)}$ [nm] ± RDS % N=3	Z-Ave [nm] ± RDS % N=3	PdI ± RDS % N=3
49	881,0 ± 15,4	361,0 ± 11,8	276,9 ± 0,3	0,273 ± 1,9
50	631,0 ± 1,5	248,7 ± 7,9	224,0 ± 0,9	0,256 ± 3,8
51	490,7 ± 5,6	192,3 ± 13,8	197,1 ± 1,3	0,237 ± 2,4

5.5. BADANIA POTENCJAŁU DRAŻNIĄCEGO *IN VITRO*

Średnia przeżywalność komórek dla zbadanych formułacji wynosiła odpowiednio: 80,7% dla formułacji 15, 59,3% dla formułacji nr 29 i 83,1% dla formułacji 39 (Ryc. 15). Do dalszych badań tolerancji skórnej wybrane zostały formułacje 15 i 39.



Rycina 15. Średnia przeżywalność komórek dla formułacji 15, 29, 39 oraz prób kontrolnych.

5.6. BADANIE TOLERANCJI SKÓRNEJ *IN VIVO*

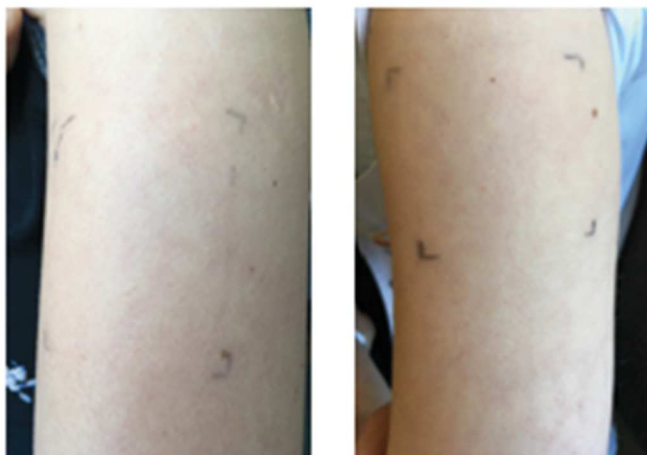
Po przeprowadzeniu badania dermatologicznego dla formułacji 15 i 39, i po 15 minutach od zdjęcia plastra, dokonano pierwszej obserwacji skóry. Na przedramionach wszystkich uczestników badania nie zauważono zmian świadczących o ewentualnej reakcji alergicznej i nie zaobserwowano podrażnień (Ryc. 16). W drugiej dobie od zdjęcia plastra wyniki były również negatywne (Tab. 20, Ryc. 17).

Tabela 21. Wyniki odczytu reakcji skórnej

Uczestnik	48h		72h	
	Rumień	Obrzęk	Rumień	Obrzęk
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0



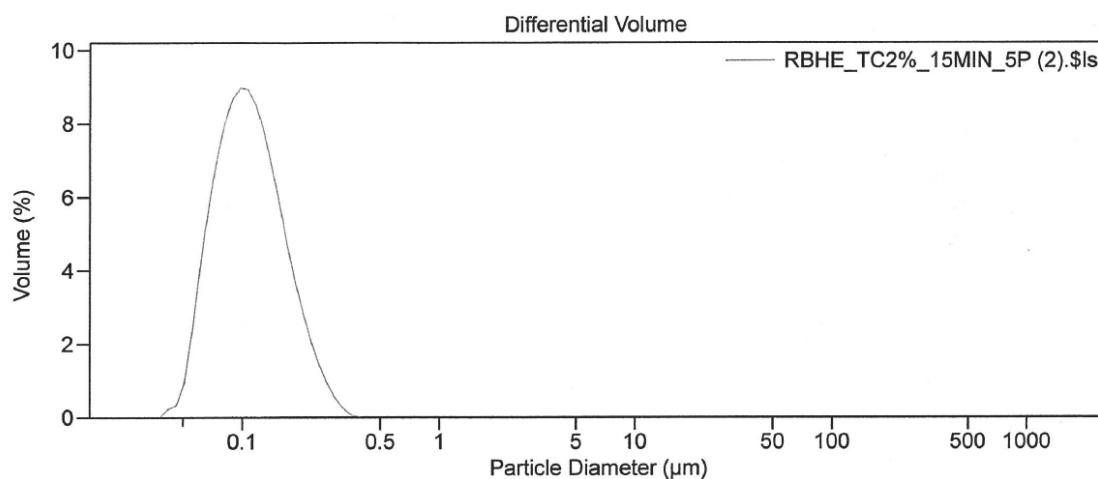
Rycina 16. Obszary badania po upływie 48 godzin od aplikacji plastrów z formułacjami, 15 minut od zdjęcia plastra.



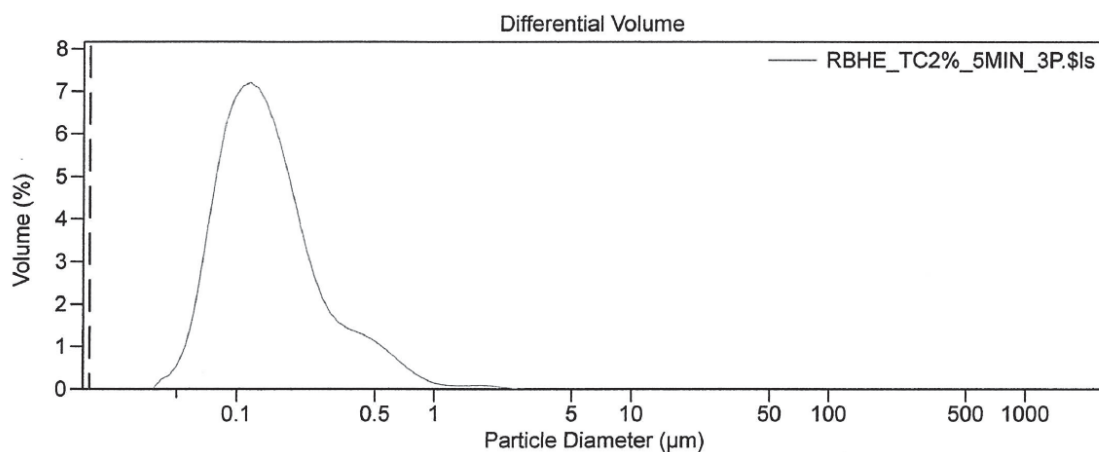
Rycina 17. Obszary badania po upływie 24 godzin od zdjęcia plastrów.

5.7. BADANIA PRZENIKANIA MIKROSFER DO MIESZKÓW WŁOSOWYCH

Otrzymano dwie formułacje z inkorporowanym barwnikiem RBHE. Formułacja 52 charakteryzowała się cząstkami o wielkości około 190 nm, a formułacja 53 około 350 nm (Ryc. 16 i Ryc. 17).

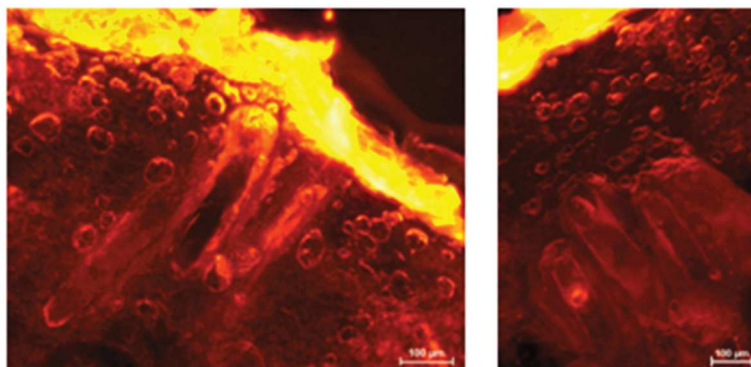


Rycina 18. Rozkład wielkości cząstek dla formułacji 52.

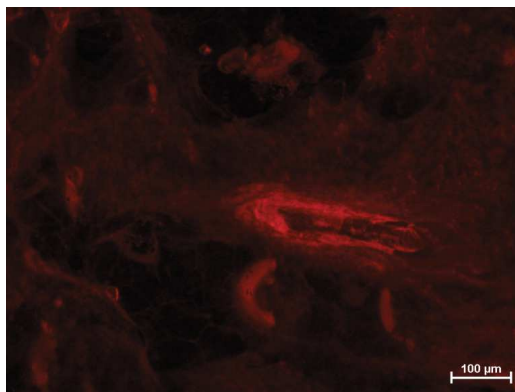


Rycina 19. Rozkład wielkości cząstek dla formułacji 53.

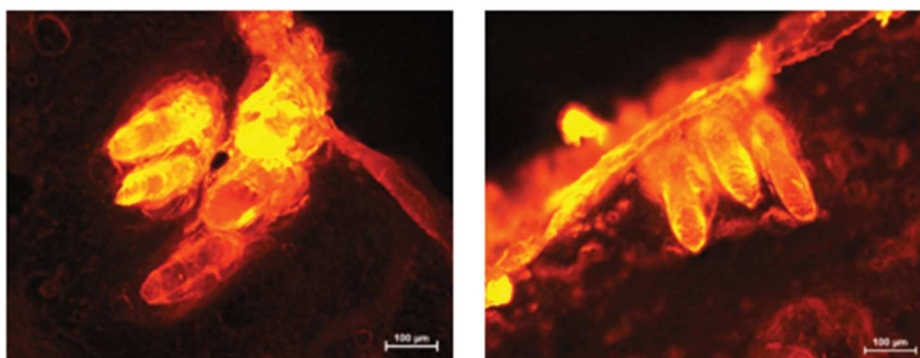
Kolejne ryciny (18-28) przedstawiają zdjęcia przekrojów poprzecznych skóry po aplikacji roztworu barwnika i formułacji 52 i 53 z inkorporowanym barwnikiem. Formułacje inkubowane były w różnym czasie, 1 (Ryc. 18-23) i 5 godzin (Ryc. 24-28). Grubość użytej tkanki do badań przenikania do wynosiła około 3 mm. Przekroje poprzeczne skóry zostały podzielone na dwie warstwy. Warstwa A sięgała głębokości około 1,5 mm i znajdowała się bliżej warstwy rogowej, warstwa B były to głębsze rejony skóry, między 1,5-3,0 mm.



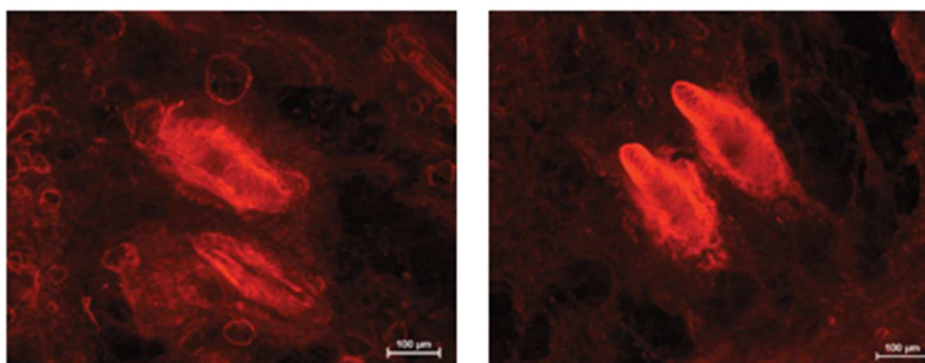
Rycina 20. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji roztworu olejowego barwnika RBHE i godzinnej inkubacji, warstwa A skóry.



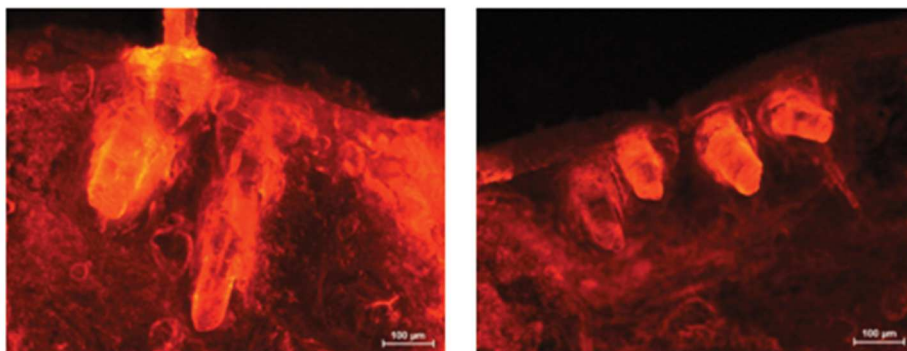
Rycina 21. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji roztworu olejowego barwnika RBHE i godzinnej inkubacji, warstwa B skóry.



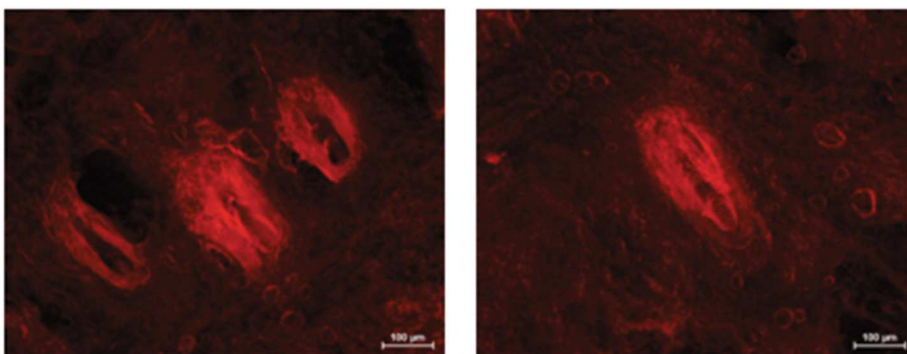
Rycina 22. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 52 i godzinnej inkubacji, warstwa A skóry.



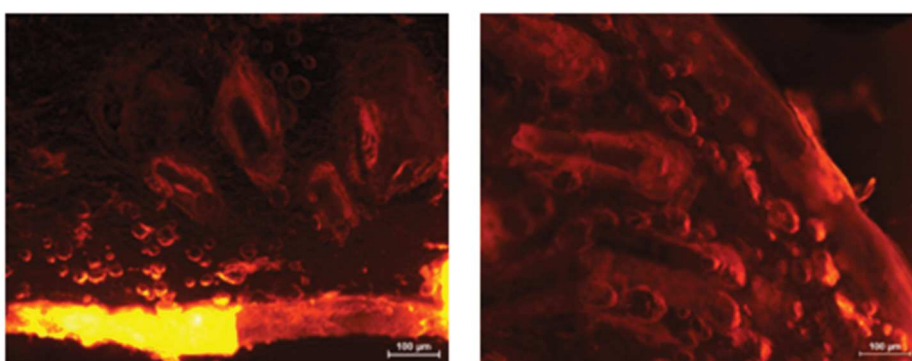
Rycina 23. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 52 i godzinnej inkubacji, warstwa B skóry.



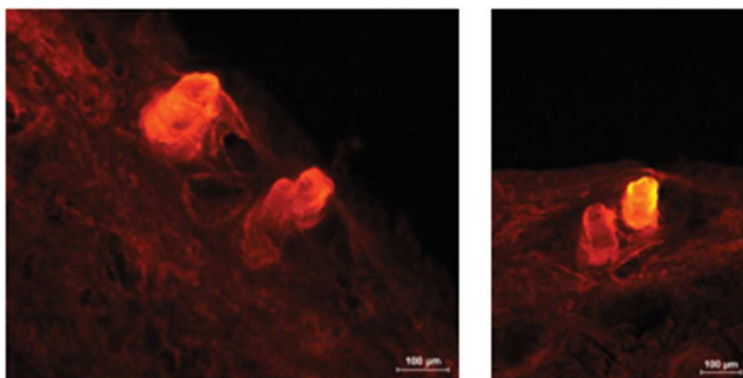
Rycina 24. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 53 i godzinnej inkubacji, warstwa A skóry.



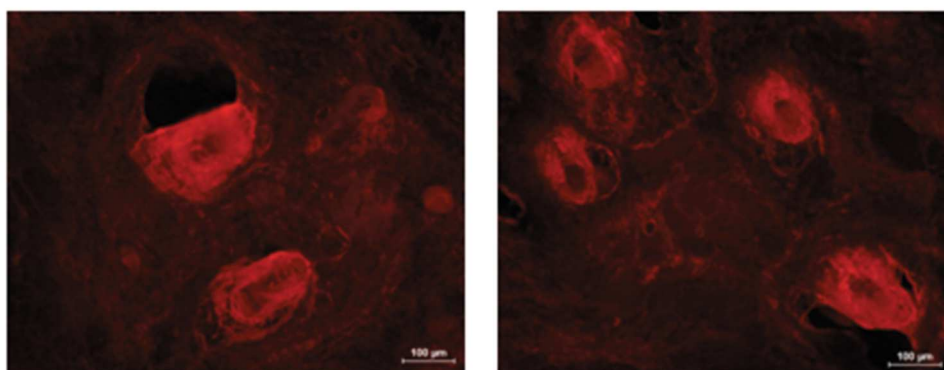
Rycina 25. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 53 i godzinnej inkubacji, warstwa B skóry.



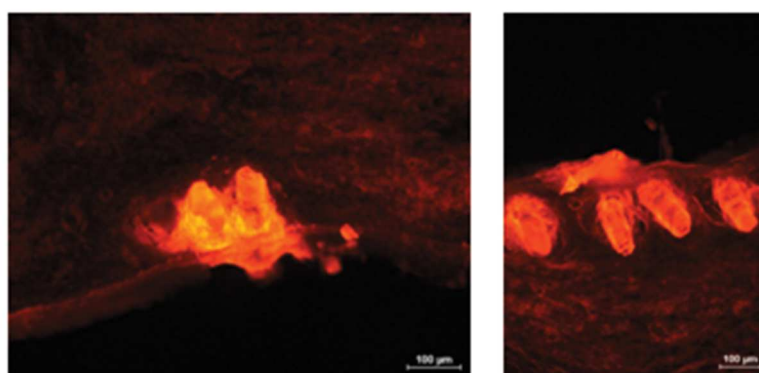
Rycina 26. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji roztworu olejowego barwnika RBHE i pięciogodzinnej inkubacji, warstwa A skóry.



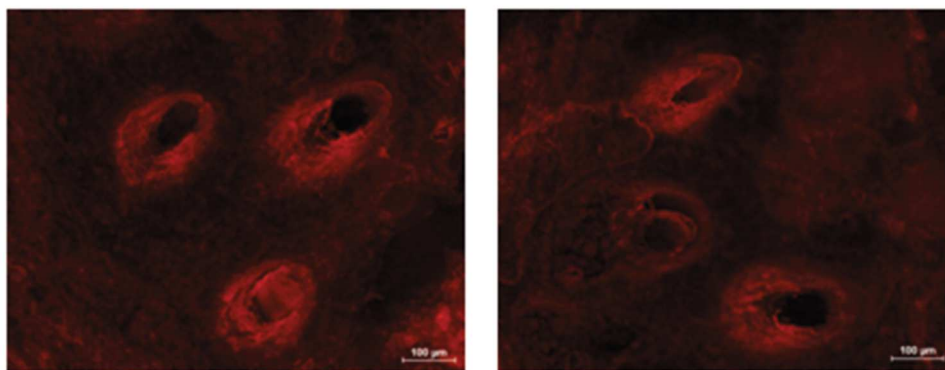
Rycina 27. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 52 i pięciogodzinnej inkubacji, warstwa A skóry.



Rycina 28. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 52 i pięciogodzinnej inkubacji, warstwa B skóry.

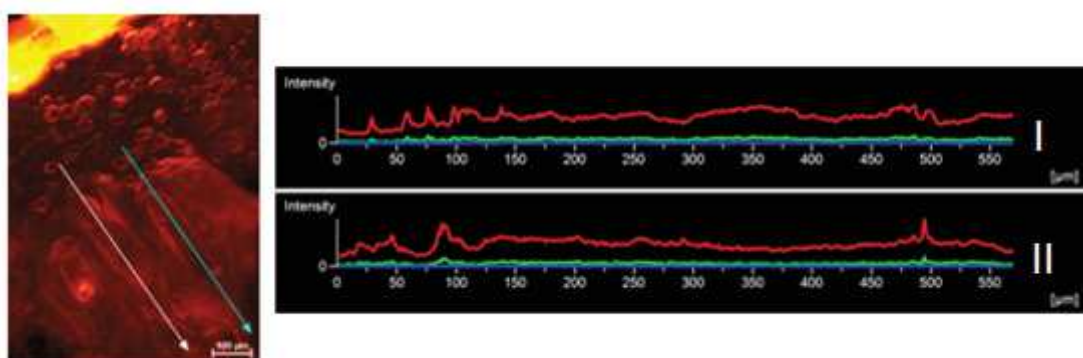


Rycina 29. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 53 i pięciogodzinnej inkubacji, warstwa A skóry.

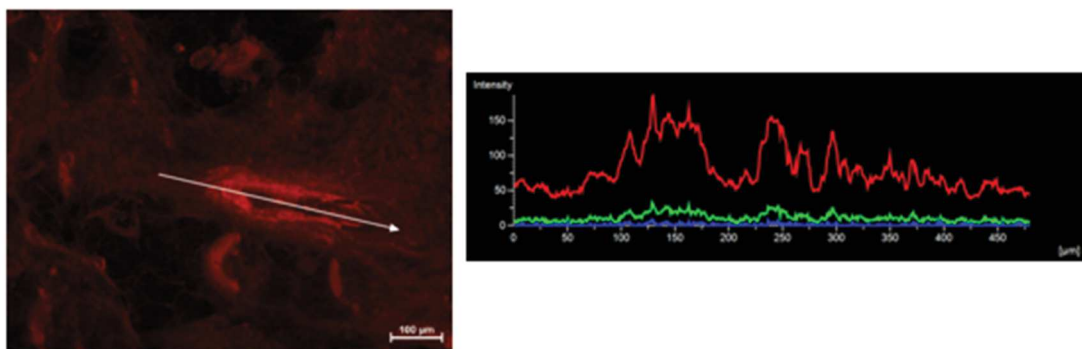


Rycina 30. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 53 i pięciogodzinnej inkubacji, warstwa B skóry.

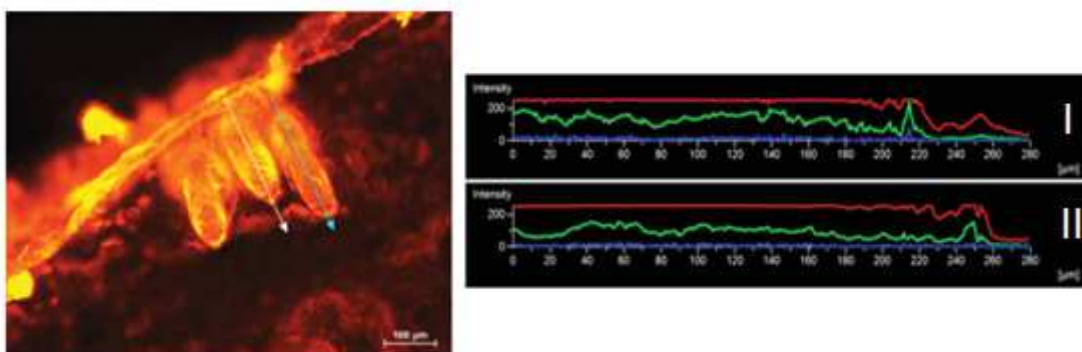
Otrzymane zdjęcia przeanalizowano pod względem intensywności fluorescencji za pomocą programu NIS Elements Advanced Research 3.2. Na fotografiach oznaczono strzałkami obszary pomiaru dzięki czemu zostały wygenerowane wykresy obrazujące intensywność fluorescencji. Badania prowadzono przy długości fali z zakresu światła czerwonego, niebieskiego i zielonego. Ryciny 29 i 30 przedstawiają ślepe próby, czyli przekroje poprzeczne dla skóry po wcześniejszej aplikacji samego roztworu olejowego barwnika RBHE i jednogodzinnej inkubacji. Kolejne wykresy ilustrują intensywność fluorescencji dla obszarów po aplikacji zawiesiny 52 (Ryc. 31 i 32) i 53 (Ryc. 33 i 34), po jednogodzinnej inkubacji. Badania przeprowadzono również stosując inkubacje pięciogodzinną. Ryciny 35-39 przedstawiają intensywność fluorescencji dla tych prób. Natomiast w tabelach 21 i 22 pokazano wartości liczbowe średniej intensywności fluorescencji w zakresie długości fali światła czerwonego w poszczególnych obszarach.



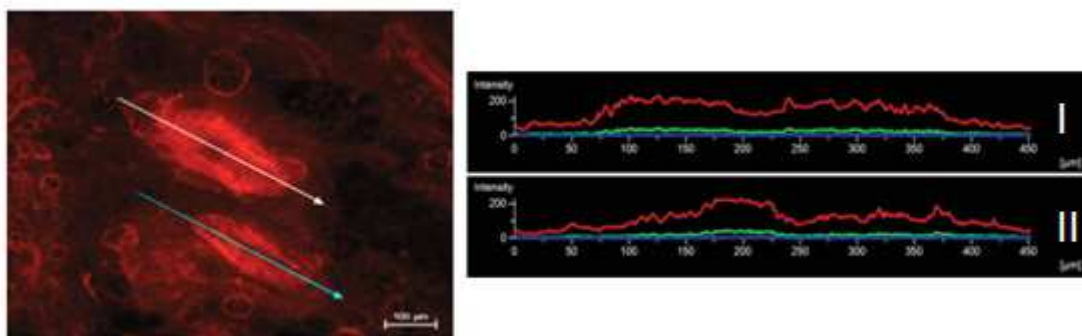
Rycina 31. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji roztworu olejowego RBHE i godzinnej inkubacji. Wykres I przedstawia intensywność fluorescencji wzdłuż linii białej, wykres II wzdłuż linii niebieskiej. Warstwa A skóry.



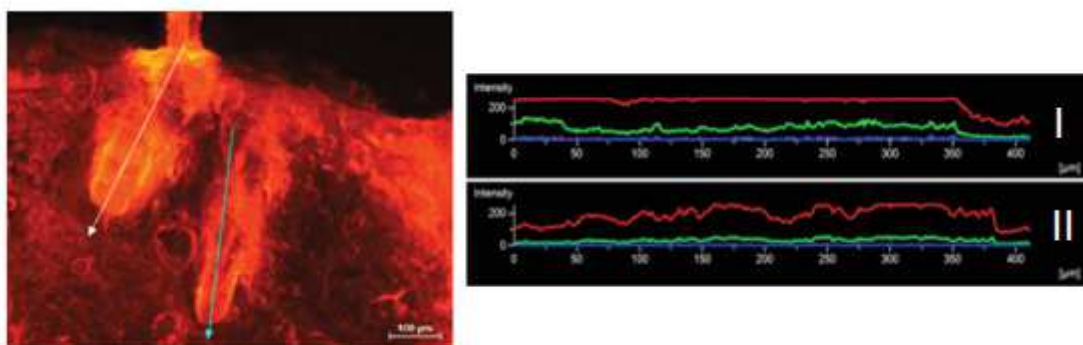
Rycina 32. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji roztworu olejowego RBHE i godzinnej inkubacji. Wykres przedstawia intensywność fluorescencji wzdłuż linii białej. Warstwa B skóry.



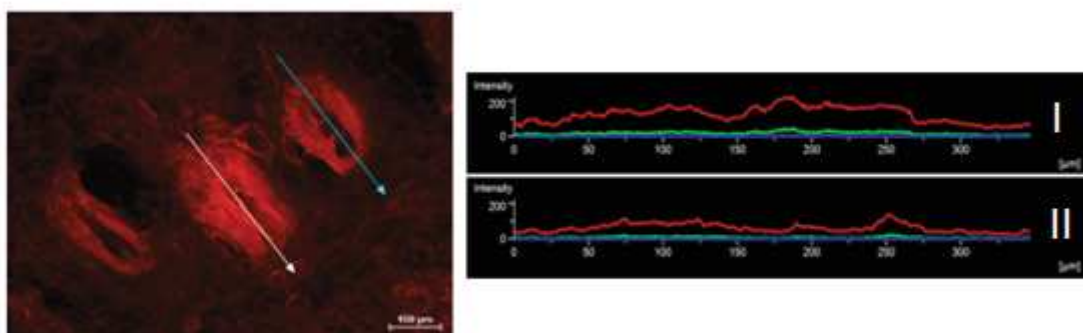
Rycina 33. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 52 i godzinnej inkubacji. Wykres I przedstawia intensywność fluorescencji wzdłuż linii białej, wykres II wzdłuż linii niebieskiej. Warstwa A skóry.



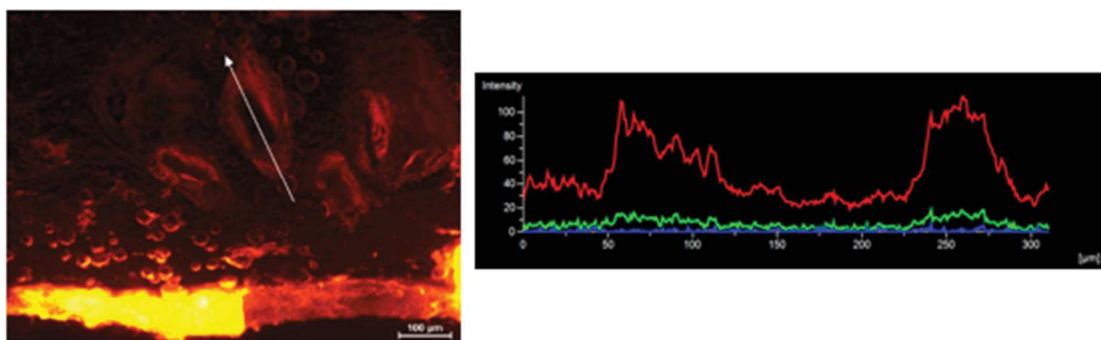
Rycina 34. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 52 i godzinnej inkubacji. Wykres I przedstawia intensywność fluorescencji wzdłuż linii białej, wykres II wzdłuż linii niebieskiej. Warstwa B skóry.



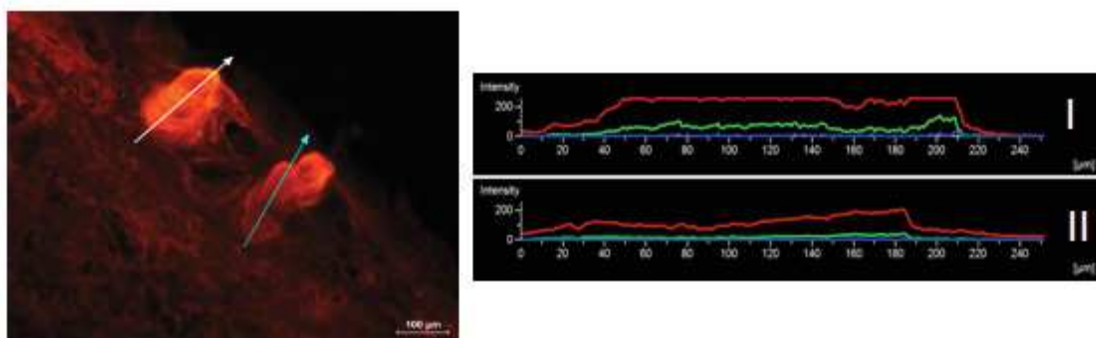
Rycina 35. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formuacji 53 i godzinnej inkubacji. Wykres I przedstawia intensywność fluorescencji wzdłuż linii białej, wykres II wzdłuż linii niebieskiej. Warstwa A skóry.



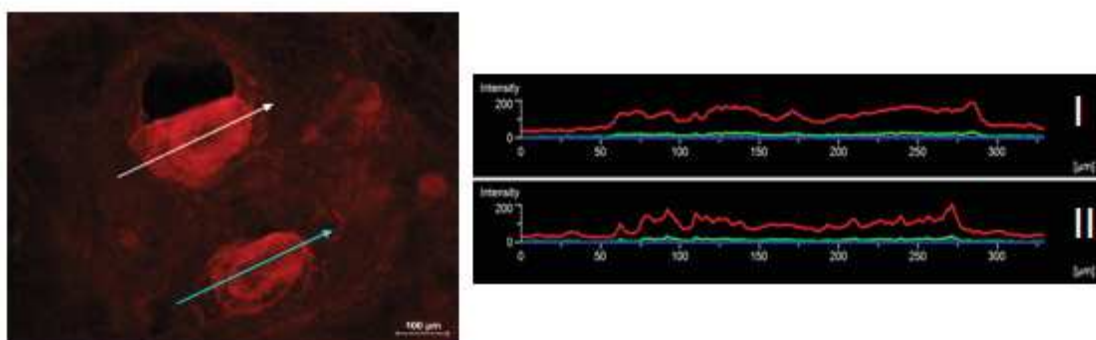
Rycina 36. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formuacji 53 i godzinnej inkubacji. Wykres I przedstawia intensywność fluorescencji wzdłuż linii białej, wykres II wzdłuż linii niebieskiej. Warstwa B skóry.



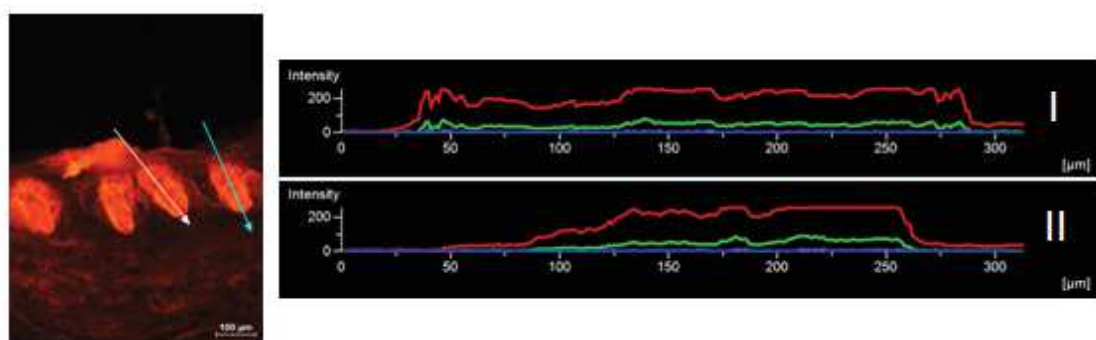
Rycina 37. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji roztworu olejowego RBHE i pięciogodzinnej inkubacji. Wykres przedstawia intensywność fluorescencji wzdłuż linii białej. Warstwa A skóry.



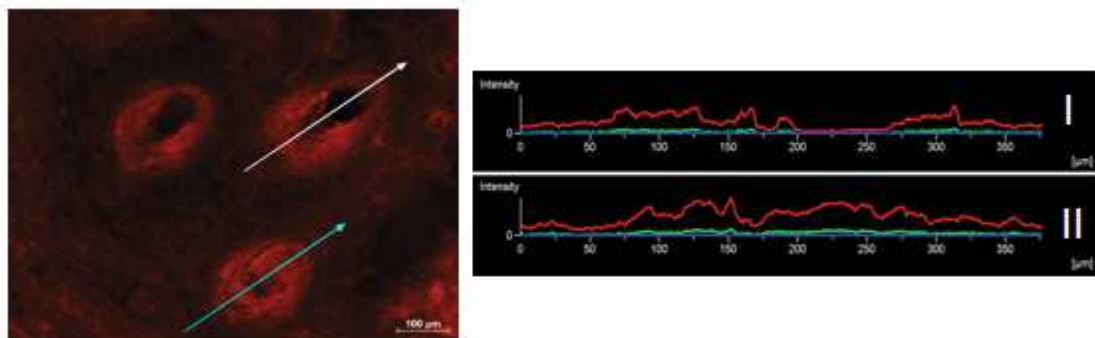
Rycina 38. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 52 i pięciogodzinnej inkubacji. Wykres I przedstawia intensywność fluorescencji wzdłuż linii białej, wykres II wzdłuż linii niebieskiej. Warstwa A skóry.



Rycina 39. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 52 i pięciogodzinnej inkubacji. Wykres I przedstawia intensywność fluorescencji wzdłuż linii białej, wykres II wzdłuż linii niebieskiej. Warstwa B skóry.



Rycina 40. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 53 i pięciogodzinnej inkubacji. Wykres I przedstawia intensywność fluorescencji wzdłuż linii białej, wykres II wzdłuż linii niebieskiej. Warstwa A skóry.



Rycina 41. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 53 i pięciogodzinnej inkubacji. Wykres I przedstawia intensywność fluorescencji wzdłuż linii białej, wykres II wzdłuż linii niebieskiej. Warstwa B skóry.

Tabela 22. Wartości średniej intensywności fluorescencji dla długości fali światła czerwonego w dwóch warstwach skóry dla 3 różnych formułacji po jednogodzinnej inkubacji.

INKUBACJA 1h	Ślepa próba		Formulacja 52		Formulacja 53	
	I	II	I	II	I	II
Intensywność fluorescencji warstwa A skóry	103	88	227	247	236	190
Intensywność fluorescencji warstwa B skóry	80	-	133	124	137	75

Tabela 23. Wartości średniej intensywności fluorescencji dla długości fali światła czerwonego w dwóch warstwach skóry dla 3 różnych formułacji po pięciogodzinnej inkubacji.

INKUBACJA 5h	Ślepa próba	Formulacja 52		Formulacja 53	
		I	II	I	II
Intensywność fluorescencji warstwa A skóry	54	234	125	214	214
Intensywność fluorescencji warstwa B skóry	-	133	105	52	108

We wszystkich ślepych próbach, które stanowił roztwór olejowy barwnika RBHE, średnia intensywność fluorescencji, o długości fali światła czerwonego, wynosiła maksymalnie około 100 (Tab. 21 i 22). Natomiast dla formułacji stałych cząstek lipidowych wskaźnik ten cechował się dużo wyższymi wartościami. W przypadku aplikacji cząstek obu formułacji (52 i 53), w warstwie A skóry i niezależnie od czasu inkubacji została osiągnięta prawie maksymalna intensywność fluorescencji czyli 250. Ponadto wartości wskaźnika dla formułacji 52 były nieznacznie wyższe niż dla formułacji 53. Wyniki dla formułacji 52, wykres II, w warstwie A skóry, przy

pięciogodzinnej inkubacji (Ryc. 36, tab. 22) okazały się być znacznie niższe, niż dla pozostałych prób. W warstwie skóry A intensywność fluorescencji stanowiła około 200 i tylko w jednym przypadku osiągnął zaledwie 125. W warstwie B intensywność fluorescencji dla większości prób wynosiła ponad 100. Tylko w dwóch przypadkach nie osiągnęła tej wartości. Dodatkowo zauważono, że w warstwie B skóry intensywność fluorescencji przyjmowała znacznie mniejsze wartości niż w warstwie A.

6. Dyskusja Wyników

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była optymalizacja wytwarzania cząstek poprzez wybór odpowiedniego emulgatora i warunków procesowych, które pozwolą otrzymać cząstki o sprzyjających właściwościach – wielkości: do 650 nm, potencjale zeta: poniżej -25 mV i współczynnika polidispersji o jak najmniejszej wartości. Podczas projektowania badań zdecydowano się na zastosowanie substancji powszechnie wykorzystywanych przez przemysł kosmetyczny (Tego Care 450, Axol C 62 i Euxyl PE 9010) i farmaceutyczny (Tween 80, MSG i Compritol 888 ATO). Jednak najważniejszym kryterium była możliwość ich użycia w procesie wytwarzania mikrosfer lipidowych. W tym celu zastosowano cztery różne emulgatory, których charakterystykę podsumowuje tabela 23.

Tabela 24. Właściwości emulgatorów

Emulgator	Liczba HLB	Typ emulsji którą tworzą	Temperatura topienia	Zalecane stężenie
Tego Care 450	12	O/W	ok. 55°C	2-3%
Axol C 62	12	O/W	ok. 60°C	1,5-2%
MSG	5,8	W/O	ok. 55°C	-
Tween 80	15	O/W	bd, rozpuszczalny w wodzie	1-20%

Trzy z zastosowanych emulgatorów mają wysokie wartości równowagi hydrofilowo-lipofilowej i tworzą emulsje O/W, stosowane są w kremach i balsamach. MSG jest natomiast emulgatorem tworzącym emulsje W/O, o wartości HLB 5,8. Tego Care 450, Axol C 62 i MSG są substancjami łączącymi się z fazą lipidową, Tween 80 rozpuszcza się w wodzie [informacja techniczna: AXOL® C 62 Pellets, 2012; TEGO® Care 450, 2015; Tween® 80, 2006].

W procesie otrzymywania mikrocząstek lipidowych jako podłoże lipidowe wykorzystano behenian glicerolu [Shah i in., 2015; Souto i in., 2006; Sznitowska i in.,

2017]. Jest on matrycą tłuszczową stałą w temperaturze pokojowej, a zakres jego temperatury topienia wynosi 65–77°C (<https://www.gattefosse.com/compritol-888-ato>). Dodatkowo, do fazy tłuszczowej formulacji dodawany był w stężeniu 1% konserwant Euxyl PE 9010. Jest on mieszaniną fenoksyetanolu i etyloheksylogliceryny w stosunku 9:1 o szerokim spectrum działania przeciwbakteryjnego i przeciwgrzybicznego. Użycie konserwantu miało na celu zachowanie czystości mikrobiologicznej otrzymanych formulacji. Bazując na wcześniejszym doświadczeniu i przeglądzie literatury podłoże tłuszczowe zastosowano w stężeniu 5%, a emulgator w stężeniu 2%. Wyniki badań otrzymywania stałych cząstek lipidowych zawierających roksytromycynę przy użyciu sonikacji, wskazują, że użycie takich stężeń jest odpowiednie do otrzymania cząstek o wielkościach około 200 nm [Wosicka-Frąckowiak i in., 2015].

Opisany tutaj proces wytwarzania cząstek lipidowych jakim jest sonikacja, stanowi najczęściej jedynie jeden z etapów uzyskiwania mikrosfer. Dzięki zastosowaniu jej jako niezależnego sposobu otrzymywania cząstek lipidowych, skrócono czas wytwarzania formulacji, a sam proces stał się mniej skomplikowany. Badania, w których porównano dwie metody otrzymywania cząstek: homogenizację szybkoobrotową na ciepło z użyciem ultradźwięków i samą sonikację wskazują, że dzięki zastosowaniu wyłącznie procesu sonikacji cząstki cechują się mniejszymi wymiarami, a otrzymane zawiesiny są bardziej jednorodne [Wosicka-Frąckowiak, 2014].

W procesie otrzymywania cząstek lipidowych wykorzystano dezintegrator ultradźwiękowy. Pozwala on na zastosowanie mocy między 50 a 300 W w 5 stopniowej skali. Zdecydowano się na użycie mocy najmniejszej, pośredniej i największej (50, 150 i 300 W). Celem takiego postępowania było znalezienie zależności pomiędzy różnymi wartościami mocy, a właściwościami stałych cząstek lipidowych. Założono, że czas prowadzenia sonikacji nie miał być długotrwały. W literaturze sonikacja niezależnie od tego, czy stosowana samodzielnie, czy jako etap dodatkowy otrzymywania mikrosfer, prowadzona jest od 5 do 15 minut [Ferreira i in., 2015; Lu i in., 2006; Schwarz i in., 2012; Sznitowska i in., 2017; Wosicka-Frąckowiak i in., 2015]. Stąd zdecydowano się zbadać wpływ prowadzenia procesu w czasie 5, 10 i 15 minut na właściwości stałych cząstek lipidowych.

W literaturze brak jest jednoznacznych informacji na temat wielkości, jakimi powinny charakteryzować się cząstki przenikające w głąb mieszków włosowych. Na przestrzeni ostatnich 15 lat doniesienia naukowe wskazywały na wartości od kilkudziesięciu nanometrów do kilku mikrometrów. W ostatnich latach ze względu na rozwój technologii zauważyć można znaczącą tendencję w kierunku stosowania mniejszych wielkości (100-300 nm). Takie postępowanie wydaje się uzasadnione ze względu na budowę włosa i średnicę otworu włosowego, która wynosi pomiędzy 90 a 170 μm . Małe cząstki z łatwością dostawałyby się do jednostki folikularnej. Niektórzy autorzy wskazują natomiast na wielkości niewiele większe dowodząc, że najgłębiej przenikają cząstki o wymiarach 643 nm (II. Część teoretyczna, 2. Przenikanie nanocząstek do mieszków włosowych, strona 19). Na podstawie tych doniesień, w celu otrzymania optymalnej formułacji mikrocząstek lipidowych przenikającej w głąb jednostki folikularnej, zdecydowano się określić maksymalną akceptowalną granicę wielkości cząstek na poziomie 650 nm.

Potencjał zeta, nazywany inaczej potencjałem elektrokinetycznym, jest parametrem opisującym napięcie na granicy faz dwóch układu. Zasadniczo nanocząstki o wartościach potencjału zeta większych niż 30 mV dodatnich lub mniejszych niż 30 mV ujemnych mają wysoki stopień stabilności. Dyspersje o wartości potencjału zeta mniejszej niż +25 mV lub większej niż -25 mV aglomerują z powodu interakcji międzycząsteczkowych, w tym oddziaływań van der Waalsa, hydrofobowych oraz wodorowych [Kumar i Kumar Dixit, 2017].

Współczynnik polidispersji pozwala opisać jakość uzyskanej zawiesiny mikrosfer lipidowych pod kątem rozkładu wielkości. Za maksymalną akceptowalną wartość współczynnika polidispersji przyjmują się 0,3 i im mniejsza jest jego wartość, tym otrzymana formułacja cechuje się większą homogennością, co wpływa również na jej stabilność [Danaei i in., 2018].

W przebiegu badań składających się na niniejszą rozprawę doktorską zbadano wpływ poszczególnych emulgatorów na właściwości mikrosfer. Analizując otrzymane dane (IV. Część doświadczalna, 5. Wyniki, strony 45-47, tabele 11-14) zaobserwowano, że najmniejsze cząstki otrzymano z użyciem emulgatora Tego Care 450. 50% cząstek formułacji 12-15 przyjmowało wielkości poniżej 100 nm. Ze względu na niewielkie wymiary cząstek (poniżej 1 μm) jakie uzyskano dla formułacji w badaniach wstępnych,

pomiary tego parametru zdecydowano się przeprowadzić za pomocą urządzenia Zetasizer Nano ZS firmy Malvern Instruments. Aparat ten umożliwia pomiary wielkości cząstek w zakresie wielkości od 0,3 nm do 10 μm .

Potencjał zeta dla wszystkich otrzymanych cząstek posiadał wartość ujemną, jednak dla cząstek otrzymanych przy zastosowaniu emulgatora Tween 80 wartości te były większe niż -25 mV, co sugerować może gorszą stabilność tych układów (IV. Część doświadczalna, 5. Dyskusja wyników, strona 72).

Farboud i jego zespół porównali wytwarzanie stałych cząstek lipidowych, przy użyciu 10 różnych substancji, emulgatorów i podłoży tłuszczowych, metodą homogenizacji wysokociśnieniowej. Najmniejsze formułacje udało się im uzyskać stosując 8% Tego Care 450 lub Tween 80 [Farboud i in., 2011]. Otrzymane cząstki miały wielkość około 100 nm (Z-Ave) dla zawiesin zawierających Tego Care 450. Parametr ten przyjmuje wartości mniejsze od tych, które udało się w tej rozprawie uzyskać (IV. Część doświadczalna, 4. Wyniki, strona 45-47, tabela 11-14). Należy jednak zauważyć, że cząstki otrzymywane były inną metodą i przy użyciu innego podłoża tłuszczowego – palmitynianu cetylu.

W przypadku niektórych formułacji wydłużenie czasu trwania procesu skutkowało zmniejszeniem wielkości cząstek. Dla formułacji o numerach od 4 do 6 zawierających Axol C 62 i wszystkich formułacji z emulgatorem Tween 80 (28-33) ta obserwacja okazała się zupełnie odwrotne. Wydłużenie czasu sonikacji skutkowało zwiększeniem wielkości cząstek. Również zastosowanie maksymalnej mocy aparatu (300 W) pozwoliło otrzymać mniejsze cząstki w przypadku użycia emulgatora Tego Care 450 i MSG. Dla Tween 80 i Axol C 62 prawidłowość ta nie została zaobserwowana a zwiększenie mocy urządzenia często prowadziło do wzrostu wymiarów cząstek (IV. Część doświadczalna, 4. Wyniki, strona 45-47, tabela 11-14). Zarówno wzrost czasu prowadzenia procesu jak i mocy urządzenia mogły mieć wpływ na temperaturę w jakiej prowadzony był proces otrzymywania mikrosfer. Podczas procesu sporządzania cząstek lipidowych obie fazy formułacji – wodna i tłuszczowa zostały podgrzane do temperatury około 80 °C i połączone. Następnie przeprowadzono sonikację, podczas której nie podgrzewano zawiesiny. Takie postępowanie mogło prowadzić do obniżenia temperatury prowadzenia procesu i otrzymania cząstek o większych rozmiarach. Jednak jak opisano powyżej, prawidłowość ta nie została zauważona dla

wszystkich użytych emulgatorów. Pod wpływem wzrostu mocy aparatu następował wzrost szybkości rozchodzenia się fal dźwiękowych przez co mogła podnieść się temperatura zawiesiny. Biorąc pod uwagę powyższe, stosowne mogłoby okazać się oznaczenie temperatury otrzymanej zawiesiny, bądź przeprowadzenie sonikacji utrzymując dodatkowo stałą temperaturę procesu. To zagadnienie nie było jednak przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej.

Analizując literaturę wymienioną w tabeli nr 3 (II. Część teoretyczna, 3. Nanocząstki lipidowe, strona 24) tylko w dwóch przypadkach natkniemy się na doniesienia, w których autorzy poświęcają uwagę temu zagadnieniu i podają dokładną temperaturę panującą w trakcie procesu sonikacji. Otrzymywali oni lipidowe nanocząstki utrzymując temperaturę co najmniej 5 - 10°C powyżej temperatury topnienia lipidu. Częstki przez nich sporządzone osiągały wielkości około 400 nm oraz nawet 1 μm , czyli były znacznie większe od tych otrzymanych w niniejszej rozprawie doktorskiej [Bose i in., 2013; Puglia i in., 2008].

Jako narzędzie ułatwiające zaplanowanie i przeprowadzenie doświadczeń składających się na tę rozprawę doktorską posłużyła metoda planowania doświadczeń. Na początku prac wyznaczona została losowa kolejność otrzymywania formulacji zaplanowanych w DoE w celu zminimalizowania błędu wynikającego z kolejności sporządzania zawiesin. W kolejnych etapach DoE przeanalizowane zostały otrzymane wyniki dla parametrów wejściowych i wyjściowych (IV. Część doświadczalna, 4. Metodyka, strona 35, rycina 5 oraz strona 8). W wyniku przeprowadzonej analizy FFD zaobserwowano zależności między poszczególnymi zmiennymi co pozwoliło na wskazanie formulacji, która najlepiej spełnia założone kryteria. W pierwszym etapie badań, w którym porównano wpływ rodzaju emulgatora na właściwości otrzymanych mikrosfer lipidowych jako najkorzystniejszy został wyznaczony emulgator Tego Care 450 oraz parametry procesowe: moc-300 W i czas-15 minut. Zaobserwowano, że czynniki takie jak rodzaj emulgatora i moc urządzenia miały największe wpływ na właściwości otrzymanych cząstek. W wyniku przeprowadzonej analizy można zaobserwować, że im większa moc aparatu została użyta, tym otrzymane cząstki lepiej odpowiadałyby założonym zakresom zmiennych wyjściowych. Natomiast niewielki wpływ czasu, w tym przypadku świadczyłby o możliwości ewentualnego jego skróceniu. Takie postępowanie dałoby możliwość jeszcze szybszego otrzymywania

zawiesin mikrosfer lipidowych i byłoby korzystne w przypadku inkorporacji substancji leczniczej. Po dokładnej analizie zależności występujących między rodzajem emulgatora, warunkami procesowymi i właściwościami otrzymanych cząstek, zdecydowano się przeprowadzić badania trwałości dla 18 formułacji zawierających Tego Care 450 i MSG (formułacje 10-18 i 19-27). Po 8 tygodniowym okresie przechowywania w temperaturze 2-8°C i w temperaturze pokojowej cząstki poddano badaniom ich właściwości. Tak uzyskane wartości zmiennych wyjściowych przeanalizowano statystycznie. Program wyodrębnił wartości parametrów wejściowych (czas, moc aparatu i rodzaj emulgatora), które pozwoliłyby otrzymać cząstki o najkorzystniejszych właściwościach. Ponownie jako preferowany emulgator wybrany został emulgator Tego Care 450 i maksymalna moc aparatu, natomiast optymalny czas wynosiłby około 5,9 minut.

Metoda planowania doświadczeń okazała się przydatnym narzędziem w procesie optymalizacji wytwarzania stałych cząstek lipidowych. Pozwoliła w łatwy sposób przeanalizować zależności pomiędzy zmiennymi wejściowymi i wyjściowymi, jak również bazując na założonych zakresach ich wartości, wybrać formułację optymalną. Przydatność tej metody w technologii farmaceutycznej została potwierdzona w wielu badaniach. Ferreira i jej zespół wykorzystali planowanie doświadczeń do optymalizacji wytwarzania cząstek lipidowych drugiej generacji NLCs. Zmiennymi, jakie różniły poszczególne formułacje były stężenie ciekłego lipidu, w tym przypadku Miglyol 812, stężenie surfaktantu - alkoholu poliwinylowego oraz ilość inkorporowanej substancji leczniczej: metotreksatu. Jako zmienne zależne, wyjściowe autorzy wybrali wymiary cząstek, które miały wynosić 250 nm, jak najmniejszy współczynnik polidispersji i maksymalną inkorporację substancji leczniczej w cząstkach. Autorom udało się dzięki metodzie planowania doświadczeń wybrać optymalny i odpowiadający ich wymaganiom skład formułacji [Ferreira i in., 2015].

Według informacji technicznej producenta emulgator Tego Care 450 powinno stosować się w stężeniu 2-3%. Należy jednak zauważyć, że zalecenia te odnoszą się do sporządzania tradycyjnych emulsji, których wielkości fazy rozproszonej znajdują się w granicach 1-5 μm [TEGO®Care 450, 2015]. Wykorzystanie tego emulgatora do wytwarzania nanocząstek nie jest postępowaniem standardowym, chociaż często spotykanym w literaturze naukowej. W 2002 roku R.H Müller, pionier rozwoju

lipidowych nanocząstek, użył Tego Care 450 w stężeniu zaledwie 1,2% w celu otrzymania SLN [Müller i in., 2002]. Takie dostępowanie, w którym stężenie tego emulgatora nie przekraczało 2%, było wiele razy naśladowane [Lohan i in., 2015; Sznitowska i in., 2017; Wissing i in., 2004]. Pomimo tego można napotkać doniesienia, w których autorzy opisują udane próby sporządzania cząstek przy użyciu Tego Care 450 w stężeniu aż 8%. Udało się im uzyskać metodą homogenizacji wysokociśnieniowej SLN o wymiarach nie przekraczających 100 nm [Farboud i in., 2011].

W rezultacie przeprowadzonych w tej rozprawie badań i wyborze Tego Care 450 jako emulgatora, który pozwolił otrzymać cząstki o najkorzystniejszych parametrach, w kolejnym etapie zdecydowano się sprawdzić wpływ stężenia tego emulgatora w formulacji na właściwości otrzymanych cząstek. Ponieważ w poprzednim badaniu moc aparatu okazała się parametrem istotnie wpływającym na właściwości mikrosfer lipidowych, wszystkie formułacje wykonano przy użyciu mocy 300 W, a zmiennymi był czas i stężenie emulgatora. Dzięki metodzie planowania doświadczeń, otrzymany profil przewidział, że modelowe stężenie emulgatora, pozwalające otrzymać mikrocząstki lipidowe o założonych właściwościach (kryteriach wyjściowych), wyniosłoby około 3,8%, a czas trwania procesu wytwarzania 12,4 minut. Taka procentowa zawartość Tego Care 450 w formulacji również znacznie przekracza rekomendowane 2%. Niemniej jednak to właśnie formułacje zawierające w składzie 2% tego emulgatora, niezależnie od czasu ich otrzymywania, charakteryzowały się najmniejszym rozrzutem wartości ich wielkości (od 260-340 nm – IV. Część doświadczalna, 5. Wyniki, strona 54, tabela 17).

Ze względu na najniższe wartości współczynnika polidispersji, jakimi cechowały się formułacje zawierające emulgator Tween 80 i najmniejsze wielkości, jakimi cechowały się cząstki otrzymane przy użyciu Tego Care 450 zdecydowano się połączyć te dwa emulgatory w różnych konfiguracjach stężeń i sprawdzić, czy takie działanie pozwoli uzyskać cząstki o korzystniejszych właściwościach. W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowano niestety, że zastosowanie mieszaniny tych emulgatorów w żadnym z wybranych układów stężeń nie przyniosło oczekiwanej poprawy właściwości mikrocząstek lipidowych, a efekt był całkowicie odwrotny (IV. Część doświadczalna, 4. Wyniki, strona 56, tabela 19). Otrzymane cząstki cechowały się wymiarami znacznie większymi niż cząstki otrzymane z zastosowaniem

Tego Care 450 bądź Tween 80 samodzielnie. W literaturze znajdziemy doniesienia o zastosowaniu Tween 80 w połączeniu z innymi emulgatorami takimi jak: Tween 20 i 60, Poloxamer 188. Tego Care 450 natomiast najczęściej występuje w formułacji samodzielnie [Beloqui i in., 2016; Doktorovová i in., 2016; Farboud i in., 2011; Lohan i in., 2015].

W zgromadzonym piśmiennictwie, z wyjątkiem jednej publikacji, nie znaleziono informacji na temat wpływu konserwantu na właściwości otrzymanych mikrosfer. W skład konserwantu Euxyl PE 9010, użytego w przebiegu badań, wchodzi substancje należące do związków amfifilowych, dzięki czemu może on mieć wpływ na napięcie powierzchniowe otrzymanych formułacji. Ze względu na te cechy, oznaczono wpływ Euxyl PE 9010 na właściwości cząstek lipidowych. Na podstawie wyników stwierdzono, że dodatek tego konserwantu powoduje dodatkowe zmniejszenie wielkości mikrosfer otrzymanych przy użyciu emulgatora Tego Care 450. Porównując właściwości otrzymanych zawiesin (IV. Część doświadczalna, 5. Wyniki, strona 57, tabela 20) z wynikami dla prób 13-15 (IV. Część doświadczalna, 5. Wyniki, strona 46, tabela 11) zaobserwowano wyraźne różnice w ich wartościach. Formułacje, w których nie zastosowano Euxyl PE 9010 charakteryzowały się wymiarami większymi o minimum 50%.

W badaniu z 2017, w którym zbadano wpływ użycia konserwantu Euxyl PE 9010 w połączeniu z emulgatorem Tween 80 na otrzymywanie cząstek lipidowych, nie stwierdzono zależności opisanej wcześniej, a obserwacje naukowców były wręcz odwrotne. Formułacje, w skład których wchodziły obydwie z wyżej wymienionych substancji cechowały się wymiarami większymi od cząstek zamierzających wyłącznie emulgator [Sznitowska i in., 2017].

Badania potencjału drażniącego *in vitro* zastąpiły testy *in vivo* wykonywane na królikach. Metoda ta została jako pierwsza opracowana przez naukowców grupy L'Oreal dla modelu *EpiSkin*[®]. Pozwoliła ona z dostateczną precyzją ocenić potencjał drażniący substancji chemicznych aplikowanych na skórę i przypisanie ich według klasyfikacji Unii Europejskiej jako drażniące (R38) i niedrażniące skórę (no-label). Model *EpiDerm*[®] jest to wielowarstwowa, wysoce zróżnicowana hodowla keratynocytów pochodzenia ludzkiego, zawierająca wszystkie cztery warstwy naskórka (warstwa podstawna, kolczysta, ziarnista i rogowa). W badaniu z jej użyciem jako

indykator przeżywalności komórek wykorzystuje się reakcję, która zachodzi pomiędzy żółtym roztworem soli tetrazoliowej i dehydrogenazą mitochondrialną obecną w żywych komórkach. Im bardziej fioletowe zabarwienie ma badany roztwór tym, przeżywalność komórek jest większa. Substancja uważana jest za drażniącą, jeżeli średnia względna żywotność trzech pojedynczych tkanek wystawionych na jej działanie wynosi poniżej 50% średniej żywotności kontroli negatywnych (Tab. 25). Kontrolę negatywną stanowi woda oczyszczona [informacja techniczna: In Vitro EpiDerm™ Skin Irritation Test, 2017]. Do badań przeżywalności komórek po aplikacji preparatu zawierającego mikrocząstki wybrano formułacje 15, 29 i 39. Wszystkie formułacje poddane badaniom *in vitro* cechowały się najmniejszymi, jakie udało się uzyskać, wielkościami cząstek – około 260 nm, natomiast różniły się rodzajem oraz stężeniem emulgatora (VIII. Załączniki, strona 95, tabela A). Otrzymane wyniki pokazują, że wszystkie formułacje możemy zakwalifikować do grupy niedrażniących (IV. Część doświadczalna, 4. Wyniki, strona 57). Należy jednak zaznaczyć, że formułacja zawierająca Tween 80 jako emulgator cechowała się znacznie niższą średnią przeżywalnością komórek (około 60%), podczas gdy pozostałe, zawierające emulgator Tego Care 450 w stężeniu 2 i 4% osiągnęły wartość tego wskaźnika na poziomie około 80%. W badaniach stałych cząstek lipidowych, w składzie których użyto emulgatora Poloxamer 188, średnia przeżywalność komórek wynosiła 81% [Wosicka-Fraćkowiak i in., 2015].

Tabela 25. Potencjalne działanie drażniące według klasyfikacji EU.

Wynik <i>in vitro</i>	Przewidywania <i>in vivo</i>
średnia przeżywalność komórek $\leq 50\%$	drażniące
średnia przeżywalność komórek $> 50\%$	niedrażniące

Potencjał drażniący formułacji można również badać metodą *in vivo*. W tym celu służy badanie płatkowe - *patch test*. Metoda ta jest szeroko wykorzystywana przez dermatologów i alergologów do diagnozowania alergii kontaktowych. *Patch testy* są również pierwszym badaniem, jakie przeprowadza się dla kosmetyków wprowadzanych na rynek. Pozwalają one producentowi ocenić ewentualny potencjał drażniący ich produktów. Jeżeli kosmetyk zakwalifikowany zostanie jako niedrażniący,

może zostać poddany badaniom skuteczności działania – badaniom aplikacyjnym. Badaniom *patch test* poddano dwie formułacje 15 i 39. W opisanym powyżej teście *in vitro* te dwie próby cechowały się znacznie wyższą średnią przeżywalnością komórek w porównaniu z formułacją 29. Wyniki testów *in vivo* przeprowadzonych w przebiegu pracy doktorskiej potwierdziły te otrzymane metodą *in vitro*. Preparaty okazały się być bezpieczne dla skóry niezmięconej chorobowo i można je ocenić jako niedrażniące i niegroźne dla skóry (IV. Część doświadczalna, 4. Wyniki, strona 58-59). Mandawage i jej zespół przeprowadzili testy płatkowe na królikach dla zawiesin zawierających tretynoinę. Konwencjonalne produkty zawierające ten związek jak żele i emulsje cechują się wysokim potencjałem drażniącym gdy stosowane są na skórę zmienioną chorobowo. Metodą testów płatkowych dowiedli, że inkorporowanie tretynoiny w stałe cząstki lipidowe w znaczny sposób zmniejsza podrażnienie skóry wywołane aplikacją produktu zawierającego ten lek [Mandawage i in., 2008].

Gdy dokonano analizy wpływu różnych czynników na właściwości mikrosfer lipidowych i oceniono potencjał drażniący wybranych formułacji, przystąpiono do zbadania przenikania cząstek do mieszków włosowych. Otrzymano mikrosfery lipidowe zawierające emulgator Tego Care 450, w które inkorporowano barwnik fluorescencyjny ester heksyłowy rodaminy B. W celu przeprowadzenia badań przygotowano dwie formułacje, które różniły się wielkością cząstek. Była to formułacja 52, której wymiary wynosiły 190 nm i formułacja 53 o wielkości 350 nm (IV. Część doświadczalna, 5. Wyniki, rycina 18, strona 59 i rycina 19, strona 60). Wybór dwóch wielkości cząstek miał na celu przeprowadzenie badań porównawczych zależności głębokości penetracji od wielkości. Do badań wykorzystano skórę ludzką z głowy, gdyż to właśnie w terapii chorób mieszków włosowych zastosowanie mogłyby znaleźć otrzymane formułacje. Wielu autorów wskazuje również na możliwość stosowania do tego typu badań łatwiej dostępnej skóry ze świńskiego ucha, której włosy budową przypominają ludzkie włosy terminalne [Lademann i in., 2011]. Ester heksyłowy rodaminy B jest barwnikiem posiadającym właściwości lipofilowe o maksimum wzbudzenia światła wynoszącym 556 nm i emisji 578 nm. Inkorporacja tego barwnika w mikrosfery umożliwiła zwiększenie kontrastu i obserwację cząstek w skórze i mieszkach włosowych pod mikroskopem fluorescencyjnym. Mikroskopia fluorescencyjna jest rodzajem mikroskopii świetłej wykorzystującej

zjawiska emisji światła przez badaną próbkę. W literaturze opisane są również inne metody mikroskopowe umożliwiające obserwację przenikania przez skórę w warunkach *in vitro*, są to: fluorescencyjny skanujący laserowy mikroskop konfokalny, skaningowy mikroskop elektronowy, transmisyjny mikroskop elektronowy czy mikroskop sił atomowych [Cal i in., 2009]. Ciekawą metodą badania przenikania przez skórę jest zastosowanie techniki spektroskopii ramanowskiej w połączeniu z mikroskopem konfokalnym [Böhling i in., 2014; Ascencio i in., 2016]. Umożliwia ona obserwacje *in vivo* w czasie rzeczywistym przenikania substancji w głąb skóry. Technika ta nie jest często stosowana i wymaga dalszego udoskonalenia, gdyż do jej praktycznego zastosowania konieczne jest przeprowadzenie skomplikowanej walidacji. Ponadto, metoda ta nie może być szeroko wykorzystywana w badaniu przenikania do mieszków włosowych z powodu możliwości obserwacji penetracji tylko do głębokości 350 μm (II. Część teoretyczna, 1.1 Budowa mieszka włosowego i włosa, strona 13, tabela 1).

Analizując zdjęcia wykonane mikroskopem fluorescencyjnym zaobserwowano, że cząstki zawierające inkorporowany barwnik penetrowały głębiej do jednostki folikularnej niż roztwór olejowy tegoż barwnika. Aplikacja RBHE w postaci roztworu olejowego skutkowałą gromadzeniem się formułacji na powierzchni skóry, natomiast cząstki lipidowe penetrowały znacznie głębiej. Obserwacje te potwierdzają opisane wcześniej badania przenikania hydrożelu zawierającego fluoresceinę w postaci nanocząstek (II. Część teoretyczna, 2. Przenikanie nanocząstek do mieszków włosowych, strona 17) .

W przebiegu pracy doktorskiej postanowiono również zbadać, czy dzięki wydłużeniu czasu inkubacji stałe cząstki lipidowe charakteryzować się będą głębszą penetracją w mieszki włosowe. Pięciogodzinna ekspozycja skóry na formułację nie spowodowała głębszej penetracji mikrosfer lipidowych. Obserwacja ta wskazuje, że proces przenikania do jednostki folikularnej jest szybki i nie wymaga wielogodzinnej aplikacji formułacji.

W badaniach wykorzystano również masaż jako etap promujący penetrację do mieszków włosowych. Procedura ta imituje naturalne ruchy włosa, które w warunkach *in vitro* nie występują. Dzięki ruchowi mechanicznemu dachówkowe ułożone komórki kutikuli tworzą swego rodzaju „pompę” zasysającą nanocząstki

do mieszka włosowego (II. Część teoretyczna, 2. Przenikanie nanocząstek do mieszków włosowych, strona 20). Wielu autorów uznaje ten etap za konieczny do przeprowadzenia badań przenikania do mieszków włosowych w warunkach *in vitro* [Lademann i in., 2007, 2009; Neubert, 2011; Prow i in., 2011; Trauer i in., 2014]. Innym zabiegiem, jaki można wykonać w celu zwiększenia penetracji do mieszków włosowych, który w tej pracy nie został wykorzystany, jest peeling. Metoda ta jest znacznie mniej inwazyjna niż biopsja cyjanoakrylowa. Pozwala oczyścić powierzchnię skóry i pozbyć się martwych komórek naskórka, co powoduje otwarcie zamkniętych mieszków włosowych (II. Część teoretyczna, 1.4 Aktywność włosów, strona 15) [Lademann i in., 2011; Wosicka i Cał, 2010].

W celu lepszego porównania przenikania stałych cząstek lipidowych do mieszków włosowych posłużono się pomiarem intensywności fluorescencji. Intensywność fluorescencji jest wskaźnikiem, który przyjmuje wartości od 0 do 250. Im wyższa jest jego wartość, tym większe jest stężenie substancji wykazującej właściwości fluorescencyjne w danym miejscu. Oznaczenie tego parametru pozwoliło zauważyć, że mikrocząstki zawierające barwnik fluorescencyjny RBHE penetrują w głąb mieszka włosowego znacznie lepiej niż roztwór olejowy tej substancji. Stałe cząstki lipidowe o wielkości 190 nm i 350 nm dobrze przenikały do mieszków włosowych i gromadziły się w ich górnych częściach. Biorąc pod uwagę powyższe obserwacje oraz grubość skóry (około 3 mm), która posłużyła do badań można stwierdzić, że formułacje 52 i 53 przenikały do mieszków włosowych i kumulowały się w regionie *infundibulum*, ujściu gruczołu łojowego i regionie *bulge*. Intensywność fluorescencji dla formułacji 53, w warstwie skóry A i gdzie czas inkubacji wynosił 5 godzin przyjęła znacznie mniejsze wartości niż pozostałe 7 przykładów. Wskaźnik ten wynosił 125 w porównaniu z 230 (IV. Część doświadczalna, 5. Wyniki, strona 68, tabela 23). Biorąc powyższe pod uwagę nasuwa się wniosek, że mieszek ten mógł być nieaktywny, zamknięty przez co możliwość penetracji w głąb została ograniczona. Zastosowanie dodatkowo wyżej wspomnianego już peelingu mogłoby umożliwić otwarcie zamkniętej jednostki folikularnej i spotęgować penetrację inkorporowanych barwnikiem mikrocząstek w głąb jednostki transfolikularnej (II. Część teoretyczna, 1.4 Aktywność włosów, strona 15).

7. WNIOSKI

1. Najkorzystniejszym emulgatorem wykorzystywanym do otrzymywania mikrosfer lipidowych metodą sonikacji jest Tego Care 450. Cząstki wytworzone z użyciem tej substancji charakteryzowały się wymiarami około 260 nm, współczynnikiem polidispersji o wartości 0,24 i potencjałem zeta -38 mV.
2. Metoda planowania doświadczeń wskazała na dużą rolę czynników wejściowych na parametry wyjściowe mikrocząstek lipidowych. W badaniu wpływu rodzaju emulgatora na właściwości otrzymanych mikrosfer, najbardziej znaczący był typ emulgatora i zastosowana moc aparatu. Najkorzystniejszym emulgatorem wybranym przez program był Tego Care 450, a optymalną moc stanowiło 300 W. Czas prowadzenia procesu nie miał większego wpływu na parametry otrzymywanych zawiesin.
3. W badaniu wpływu stężenia emulgatora Tego Care 450 na właściwości otrzymanych cząstek, większy wpływ wykazywał czas prowadzenia procesu niż samo jego stężenie. Jako optymalne parametry ustalono 12,4 minutowy czas prowadzenia procesu sonikacji i stężenie emulgatora 3,8%.
4. Formulacje mikrosfer lipidowych zawierające emulgator Tego Care 450 są niedrażniące dla skóry, co potwierdziły testy *in vitro* i *in vivo*.
5. Mikrosfery lipidowe o wymiarach 190 nm (formulacja 52) i 350 nm (formulacja 53) inkorporowane barwnikiem RBHE przenikają na głębokość około 1 mm mieszków włosowych docierając do regionu *infundibulum*, *bulge* i ujścia gruczoły łojowego, natomiast rozwór olejowy tego barwnika gromadzi się na powierzchni skóry.

V. PIŚMIENNICTWO

- Ajeet Kumar, Kumar-Dixit. C. Methods for characterization of nanoparticles. W *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids*, 2017, 43–58.
- Alvarez-Román, R., Naik, A., Kalia, Y. N., Guy, R. H. i Fessi, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 2004, 99(1), 53–62.
- AXOL® C 62 Pellets. Informacja Techniczna, Evonik Industries, 2012.
- Beloqui, A., Solinís, M. Á., Rodríguez-Gascón, A., Almeida, A. J. i Prétat, V. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2016, 12(1), 143–161.
- Blume-Peytavi, U., Bagot, M., Tennstedt, D., Aroman, M. Saint, Stock, E. i Zlotogorski, A. Dermatology today and tomorrow : from symptom control to targeted therapy, *European Academy of Dermatology and Venereology*, 2019, 33, 3–36.
- Böhling, A., Bielfeldt, S., Himmelmann, A., Keskin, M. i Wilhelm, K. P. Comparison of the stratum corneum thickness measured in vivo with confocal Raman spectroscopy and confocal reflectance microscopy. 2014, *Skin Research and Technology*, 20(1), 50–57.
- Bose, S. i Michniak-Kohn, B. Preparation and characterization of lipid based nanosystems for topical delivery of quercetin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, 48(3), 442–452.
- Cal, K., Stefanowska, J. i Zakowiecki, D. Current tools for skin imaging and analysis. *International Journal of Dermatology*, 2009, 48(12), 1283–1289.
- Clares, B., Calpena, A. C., Parra, A., Abrego, G., Alvarado, H., Figueiro, J. F. i Souto, E. B. Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: effect on skin permeation. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 473(1–2), 591–598.
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Davarani, F. H., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S. i Id, M. R. M. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems, *Pharmaceutics*, 2018, 10, 57, 1–17.
- Doktorovová, S., Kovačević, A. B., Garcia, M. L. i Souto, E. B. Preclinical safety of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Current evidence from in vitro and in vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2016, 108, 235–252.
- Fangueiro, J. F., Andreani, T., Egea, M. A., Garcia, M. L., Souto, S. B., Silva, A. M. i Souto, E. B. Design of cationic lipid nanoparticles for ocular delivery: Development, characterization and cytotoxicity. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 461(1–2), 64–73.
- Farboud, E. S., Nasrollahi, S. A. i Tabbakhi, Z. Novel formulation and evaluation of a Q10-loaded solid lipid nanoparticle cream: in vitro and in vivo studies. *International Journal of Nanomedicine*, 2011, 6, 611–617.
- Ferreira, M., Chaves, L. L., Lima, S. A. C. i Reis, S. Optimization of nanostructured lipid carriers loaded with methotrexate: A tool for inflammatory and cancer therapy. *International*

Journal of Pharmaceutics, 2015, 492(1–2), 65–72.

Ferreira, M., Silva, E., Barreiros, L., Segundo, M. A., Costa Lima, S. A. i Reis, S. Methotrexate loaded lipid nanoparticles for topical management of skin-related diseases: Design, characterization and skin permeation potential. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016, 512(1), 14–21.

Ganesan, P. i Narayanasamy, D. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 2017, 6(May), 37–56.

Garcês, A., Amaral, M. H., Sousa Lobo, J. M. i Silva, A. C. Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 112(November 2017), 159–167.

Gomes, M. J. i Martins, S. Lipid nanoparticles for topical and transdermal application for alopecia treatment : development , physicochemical characterization, and in vitro release and penetration studies, *International Journal of Nanomedicine*, 2014, 1231–1242.

Hamishehkar, H., Ghanbarzadeh, S., Sepehran, S., Javadzadeh, Y., Adib, Z. M. i Kouhsoltani, M. Histological assessment of follicular delivery of flutamide by solid lipid nanoparticles: Potential tool for the treatment of androgenic alopecia. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2016, 42(6), 846–853.

Hamishehkar, H., Shokri, J., Fallahi, S., Jahangiri, A., Ghanbarzadeh, S. i Kouhsoltani, M. Histopathological evaluation of caffeine-loaded solid lipid nanoparticles in efficient treatment of cellulite. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2015, 41(10), 1640–1646.

<https://www.gattefosse.com/compritol-888-ato>, 22.09.2019, 21.35

Hueber, F., Wepierre, J., Schaefer, H. Role of transepidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of hydrocortisone and testosterone: In vivo study in the hairless rat. *Skin Pharmacology.*, 1992, 5(2), 99–107.

Illel, B., Schaefer, H., Wepierre, J., Doucet, O. Follicles play an important role in percutaneous absorption. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1991, 80(5), 424-7.

In Vitro EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), Informacja Techniczna, MatTek Corporation, 2017

Jensen, L. B., Petersson, K. i Nielsen, H. M. In vitro penetration properties of solid lipid nanoparticles in intact and barrier-impaired skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2011, 79(1), 68–75.

Jose, S., Anju, S. S., Cinu, T. A., Aleykutty, N. A., Thomas, S. i Souto, E. B. In vivo pharmacokinetics and biodistribution of resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles for brain delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 474(1–2), 6–13.

Keck, C. M. i Müller, R. H. Nanotoxicological classification system (NCS) - A guide for the risk-benefit assessment of nanoparticulate drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2013, 84(3), 445–448.

Khezri, K., Saeedi, M. i Maleki Dizaj, S. Application of nanoparticles in percutaneous delivery of

- active ingredients in cosmetic preparations. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2018, 106(April), 1499–1505.
- Knorr, F., Lademann, J., Patzelt, A., Sterry, W., Blume-Peytavi, U. i Vogt, A. Follicular transport route - Research progress and future perspectives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2009, 71(2), 173–180.
- Knorr, F., Patzelt, A., Meinke, M. C., Vogt, A., Blume-peytavi, U., Rühl, E. i Lademann, J. Interactions of Nanoparticles with Skin. *Springer International Publishing*, 2019, rozdział 13, 329-339
- Kumar, M., Kakkar, V., Mishra, A. K., Chuttani, K. i Kaur, I. P. (Intranasal delivery of streptomycin sulfate (STRS) loaded solid lipid nanoparticles to brain and blood. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 461(1–2), 223–233.
- Lademann, J., Knorr, F., Richter, H., Jung, S., Meinke, M. C., Rühl, E., Alexiev, U., Calderon, M. i Patzelt, A. Hair follicles as a target structure for nanoparticles. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2015, 08(04), 1530004.
- Lademann, J., Richter, H., Schanzer, S., Knorr, F., Meinke, M., Sterry, W. i Patzelt, A. Penetration and storage of particles in human skin: Perspectives and safety aspects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2011, 77(3), 465–468.
- Lademann, Juergen, Patzelt, A., Richter, H., Antoniou, C., Sterry, W. i Knorr, F. Determination of the cuticula thickness of human and porcine hairs and their potential influence on the penetration of nanoparticles into the hair follicles. *Journal of Biomedical Optics*, 2009, 14(2), 021014.
- Lademann, Juergen, Richter, H., Teichmann, A., Otberg, N., Blume-Peytavi, U., Luengo, J., Weiss, B., Schaefer, U. F., Lehr, C. M., Wepf, R. i Sterry, W. Nanoparticles - An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2007, 66(2), 159–164.
- Lademann, J., Weigmann, H. J., Rickmeyer, C., Barthelmes, H., Schaefer, H., Mueller, G. i Sterry, W. Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 1999, 12(5), 247–256.
- Lademann, J., Otberg, N., Richter, H., Weigmann, H. J., Lindemann, U., Schaefer, H. i Sterry, W. Investigation of follicular penetration of topically applied substances. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 2001, 14(SUPPL. 1), 17–22.
- Lauterbach, A. i Mueller-Goymann, C. C. Development, formulation, and characterization of an adapalene-loaded solid lipid microparticle dispersion for follicular penetration. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 466(1–2), 122–132.
- Leonardi, A., Bucolo, C., Romano, G. L., Platania, C. B. M., Drago, F., Puglisi, G. i Pignatello, R. Influence of different surfactants on the technological properties and in vivo ocular tolerability of lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 470(1–2), 133–140.
- Lohan, S. B., Bauersachs, S., Ahlberg, S., Baisaeng, N., Keck, C. M., Müller, R. H., Witte, E., Wolk, K., Hackbarth, S., Röder, B., Lademann, J. i Meinke, M. C. (2015). Ultra-small lipid nanoparticles promote the penetration of coenzyme Q10 in skin cells and counteract oxidative stress. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2015, 89,

201–207.

- Lohan, S. B., Saeidpour, S., Solik, A., Schanzer, S., Richter, H., Dong, P., Darvin, M. E., Bodmeier, R., Patzelt, A., Zoubari, G., Unbehauen, M., Haag, R., Lademann, J., Teutloff, C., Bittl, R. i Meinke, M. C. Investigation of the cutaneous penetration behavior of dexamethasone loaded to nano-sized lipid particles by EPR spectroscopy, and confocal Raman and laser scanning microscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2017, 116, 102–110.
- Lohani, A., Verma, A., Joshi, H., Yadav, N. i Karki, N. Nanotechnology-Based Cosmeceuticals. *Hindawi Publishing Corporation, ISRN Dermatology*, 2014, 14
- Lu, B., Xiong, S. Bin, Yang, H., Yin, X. D. i Chao, R. B. Solid lipid nanoparticles of mitoxantrone for local injection against breast cancer and its lymph node metastases. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, 28(1–2), 86–95.
- Meidan, V. M., Bonner, M. C., Michniak B. B. Transfollicular drug delivery—Is it a reality. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, 306, 1–14.
- Mandawgade, S. D. i Patravale, V. B. Development of SLNs from natural lipids : Application to topical delivery of tretinoin, *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 363, 132–138.
- Montenegro, L., Lai, F., Offerta, A., Sarpietro, M. G., Micicché, L., Maccioni, A. M., Valenti, D. i Fadda, A. M. From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2016, 32, 100–112.
- Mujica Ascencio, S., Choe, C. S., Meinke, M. C., Müller, R. H., Maksimov, G. V., Wigger-Alberti, W., Lademann, J. i Darvin, M. E. Confocal Raman microscopy and multivariate statistical analysis for determination of different penetration abilities of caffeine and propylene glycol applied simultaneously in a mixture on porcine skin ex vivo. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2016, 104, 51–58.
- Müller R. H., Mäder K., Gohla, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000, 50(1), 161–177.
- Müller, R. H., Radtke, M. i Wissing, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 54(SUPPL.), 131–155.
- Neubert, R. H. H. Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2011, 77(1), 1–2.
- Ossadnik, M., Richter, H., Teichmann, A., Koch, S., Schäfer, U., Wepf, R., Sterry, W. i Lademann, J. Investigation of differences in follicular penetration of particle- and nonparticle-containing emulsions by laser scanning microscopy. *Laser Physics*, 2006, 16(5), 747–750.
- Otberg, N., Richter, H., Knuttel, A., Schaefer, H., Sterry, W. i Lademann, J. Laser spectroscopic methods for the characterization of open and closed follicles. *Laser Physics Letters*, 2004, 1(1), 46–49.
- Otberg, N., Teichmann, A., Rasuljev, U., Sinkgraven, R., Sterry, W. i Lademann, J. Follicular penetration of topically applied caffeine via a shampoo formulation. *Skin Pharmacology and Physiology*, 2007, 20(4), 195–198.

- Otberg, Nina, Richter, H., Schaefer, H., Blume-Peytavi, U., Sterry, W. i Lademann, J. Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. *Journal of Investigative Dermatology*, 2004, 122(1), 14–19.
- Pardeike, J., Hommoss, A. i Müller, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 366(1–2), 170–184.
- Patzelt, A., Knorr, F., Blume-Peytavi, U., Sterry, W. i Lademann, J. Hair follicles, their disorders and their opportunities. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 2008, 5(2), 173–181.
- Patzelt, A., Richter, H., Buettemeyer, R., Huber, H. J. R., Blume-Peytavi, U., Sterry, W. i Lademann, J. Differential stripping demonstrates a significant reduction of the hair follicle reservoir in vitro compared to in vivo. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, 70(1), 234–238.
- Patzelt, A., Richter, H., Knorr, F., Schäfer, U., Lehr, C. M., Dähne, L., Sterry, W. i Lademann, J. (2011). Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. *Journal of Controlled Release*, 2011, 150(1), 45–48.
- Pereira, I., Zielińska, A., Ferreira, N. R., Silva, A. M. i Souto, E. B. Optimization of linalool-loaded solid lipid nanoparticles using experimental factorial design and long-term stability studies with a new centrifugal sedimentation method. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018, 549(1–2), 261–270.
- Pietkiewicz, J., Sznitowska, M. The choice of lipids and surfactants for injectable extravenous microspheres. *Pharmazie*, 2004, 59, 325–326.
- Politis, S. N., Colombo, P., Colombo, G i Rekkas, D. M. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2017, 43(6), 889–901.
- Prow, T. W., Grice, J. E., Lin, L. L., Faye, R., Butler, M., Becker, W., Wurn, E. M. T., Yoong, C., Robertson, T. A., Soyer, H. P. i Roberts, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2011, 63(6), 470–491.
- Puglia, C., Blasi, P., Rizza, L., Schoubben, A., Bonina, F., Rossi, C. i Ricci, M. Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: An in vitro and in vivo investigation. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 357(1–2), 295–304.
- Roberts, M. S., Mohammed, Y., Pastore, M. N., Namjoshi, S., Yousef, S., Alinaghi, A., Haridass, I. N., Abd, E., Leite-Silva, V. R., Benson, H. A. E. i Grice, J. E. Topical and cutaneous delivery using nanosystems. *Journal of Controlled Release*, 2017, 247, 86–105.
- Rolland, A., Wagner, N., Chatelus, A., Shroot, B. i Schaefer, H. Site-specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres. *Pharm Research*, 1993.
- Sala, M., Diab, R., Elaissari, A. i Fessi, H. Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018, 535(1–2), 1–17.
- Sánchez-López, E., Espina, M., Doktorovova, S., Souto, E. B. i García, M. L. Lipid nanoparticles (SLN, NLC): Overcoming the anatomical and physiological barriers of the eye – Part II - Ocular drug-loaded lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and*

Biopharmaceutics, 2017, 110, 58–69.

Schäfer-Korting, M., Mehnert, W. i Korting, H. C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 59(6), 427–443.

Schwarz, J. C., Weixelbaum, A., Pagitsch, E., Löw, M., Resch, G. P. i Valenta, C. Nanocarriers for dermal drug delivery: Influence of preparation method, carrier type and rheological properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, 437(1–2), 83–88.

Shah, B., Khunt, D., Bhatt, H., Misra, M. i Padh, H. Application of quality by design approach for intranasal delivery of rivastigmine loaded solid lipid nanoparticles: Effect on formulation and characterization parameters. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 78, 54–66.

Shah, M. i Pathak, K. Development and Statistical Optimization of Solid Lipid Nanoparticles of Simvastatin by Using 23 Full-Factorial Design. *AAPS PharmSciTech*, 2019, 11(2), 489–496.

Shim, J., Kang, H. S., Park, W., Han, S., Kim, J. i Chang, I. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles, *Journal of Controlled Release*, 2004, 97, 477–484.

Souto, E. B., Mehnert, W. i Müller, R. H. Polymorphic behaviour of Compritol®888 ATO as bulk lipid and as SLN and NLC. *Journal of Microencapsulation*, 2006, 23(4), 417–433.

Souto, E. B., Wissing, S. A., Barbosa, C. M. i Müller, R. H. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, 278(1), 71–77.

Sznitowska, M., Wolska, E., Baranska, H., Cal, K. i Pietkiewicz, J. The effect of a lipid composition and a surfactant on the characteristics of the solid lipid microspheres and nanospheres (SLM and SLN). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2017, 110, 24–30.

Takeda, K., Suzuki, K., Ishihara, A., Kubo-Irie, M., Fujimoto, R., Tabata, M., Oshio, S., Nihei, Y., Ihara, T. i Sugamata, M. Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems. *Journal of Health Science*, 2009, 55(1), 95–102.

TEGO® Care 450. Informacja Techniczna, Evonik Industries, 2015.

Teichmann, A., Jacobi, U., Ossadnik, M., Richter, H., Koch, S., Sterry, W. i Lademann, J. Differential stripping: Determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. *Journal of Investigative Dermatology*, 2005, 125(2), 264–269.

Teichmann, A., Otberg, N., Jacobi, U., Sterry, W. i Lademann, J. Follicular penetration: Development of a method to block the follicles selectively against the penetration of topically applied substances. *Skin Pharmacology and Physiology*, 2006, 19(4), 216–223.

Toll, R., Jacobi, U., Richter, H., Lademann, J., Schaefer, H. i Blume-Peytavi, U. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. *Journal of Investigative Dermatology*, 2004, 123(1), 168–176.

Trauer, S., Richter, H., Kuntsche, J., Büttemeyer, R., Liebsch, M., Linscheid, M., Fahr, A., Schäfer-Korting, M., Lademann, J. i Patzelt, A. Influence of massage and occlusion on the

- ex vivo skin penetration of rigid liposomes and invasomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2014, 86(2), 301–306.
- Trombino, S., Cassano, R., Muzzalupo, R., Pingitore, A., Cione, E. i Picci, N. Stearyl ferulate-based solid lipid nanoparticles for the encapsulation and stabilization of β -carotene and α -tocopherol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2009, 72(2), 181–187.
- Tween[®] 80. Informacja Techniczna, MP Biomedicals, 2006.
- Vitorino, C., Carvalho, F. A., Almeida, A. J., Sousa, J. J. i Pais, A. A. C. C. The size of solid lipid nanoparticles: An interpretation from experimental design. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011, 84(1), 117–130.
- Vogt, A., Hadam, S., Deckert, I., Schmidt, J., Stroux, A., Afraz, Z., Rancan, F., Lademann, J., Combadiere, B. i Blume-Peytavi, U. Hair follicle targeting, penetration enhancement and Langerhans cell activation make cyanoacrylate skin surface stripping a promising delivery technique for transcutaneous immunization with large molecules and particle-based vaccines. *Experimental Dermatology*, 2015, 24(1), 73–75.
- Vogt, A., Hadam, S., Heiderhoff, M., Audring, H., Lademann, J., Sterry, W. i Blume-Peytavi, U. Morphometry of human terminal and vellus hair follicles. *Experimental Dermatology*, 2007, 16(11), 946–950.
- Vogt, A., McElwee, K. J. i Blume-Peytavi, U. Biology of the hair follicle. *Hair, Hair Growth and Hair Disorders*, 2008, 1–22.
- Wissing, S. A. i Müller, R. H. The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity - In vivo study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2003, 56(1), 67–72.
- Wissing, S. A., Müller, R. H., Manthei, L. i Mayer, C. Structural characterization of Q10-loaded solid lipid nanoparticles by NMR spectroscopy. *Pharmaceutical Research*, 2004, 21(3), 400–405.
- Wissing, S.A., Kayser, O., Müller, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004, 56, 1257–1272.
- Wosicka-Frackowiak, H. Praca doktorska, Mikro- i nanocząstki lipidowe jako nośniki roksytromycyny do mieszków włosowych. Gdański Uniwersytet Medyczny, 2014
- Wosicka-Fraćkowiak, H., Cal, K., Stefanowska, J., Główska, E., Nowacka, M., Struck-Lewicka, W., Govedarica, B., Pasikowska, M., Dębowska, R., Srčić, S., Markuszewski, M. J. Roxithromycin-loaded lipid nanoparticles for follicular targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 495(2), 807–815.
- Wosicka, H. i Cal, K. Targeting to the hair follicles: Current status and potential. *Journal of Dermatological Science*, 2010, 57(2), 83–89.
- Zoubari, G., Staufenbiel, S., Volz, P., Alexiev, U., i Bodmeier, R. Effect of drug solubility and lipid carrier on drug release from lipid nanoparticles for dermal delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2017, 110, 39–46.

VI. SPIS RYCIN

Rycina 1. Przekrój poprzeczny przez włos ludzki.	11
Rycina 2. Budowa jednostki folikularnej.	12
Rycina 3. Struktura wewnętrzna SLN (A), struktura wewnętrzna NLC (B).	22
Rycina 4. Modele inkorporacji substancji leczniczej do cząstek lipidowych SLN.....	23
Rycina 5. Parametry wejściowe (różnicujące poszczególne formułacje) procesu otrzymywania mikrosfer lipidowych.	35
Rycina 6. Schemat procesu otrzymywania mikrosfer lipidowych.....	37
Rycina 7. Insert	40
Rycina 8. Przekrój poprzeczny	40
Rycina 9. Plastry przygotowane do aplikacji na skórę (lewa strona) i plaster zaaplikowany na skórę przedramienia (prawa strona).	42
Rycina 10. Skóra ludzka z głowy przygotowana do aplikacji formułacji.....	44
Rycina 11. Proces masowania materiału biologicznego.....	44
Rycina 12. Profil wpływu zmiennych wejściowych na zmienne wyjściowe. Wpływ rodzaju emulgatora i parametrów procesowych na właściwości stałych cząstek lipidowych. Pojęcie desirability oznacza funkcje użyteczności czyli związek pomiędzy przewidywanymi odpowiedziami wielkości wyjściowej a użytecznością odpowiedzi. Przyjmuje ona wartości od 0,00 dla wartości niepożądanych do 1,00 dla wartości użyteczności bardzo pożądaných.	50
Rycina 13. Profil wpływu zmiennych wejściowych na zmienne wyjściowe. Badania trwałości stałych cząstek lipidowych.	52
Rycina 14. A-Profil wpływu zmiennych wejściowych na zmienne wyjściowe. Wpływ stężenia emulgatora na właściwości mikrosfer lipidowych, B-Wykresy powierzchni odpowiedzi ukazujące wpływ stężenia emulgatora i czasu na takie właściwości cząstek jak wielkość, współczynnik polidispersji i potencjał zeta.	55
Rycina 15. Średnia przeżywalność komórek dla formułacji 15, 29, 39 oraz prób kontrolnych. ..	57
Rycina 16. Obszary badania po upływie 48 godzin od aplikacji plastrów z formułacjami, 15 minut od zdjęcia plastra.....	58
Rycina 17. Obszary badania po upływie 24 godzin od zdjęcia plastrów.....	59
Rycina 18. Rozkład wielkości cząstek dla formułacji 52.....	59
Rycina 19. Rozkład wielkości cząstek dla formułacji 53.....	60

Rycina 20. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji roztworu olejowego barwnika RBHE i godzinnej inkubacji, warstwa A skóry.....	60
Rycina 21. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji roztworu olejowego barwnika RBHE i godzinnej inkubacji, warstwa B skóry.....	61
Rycina 22. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 52 i godzinnej inkubacji, warstwa A skóry.....	61
Rycina 23. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 52 i godzinnej inkubacji, warstwa B skóry.....	61
Rycina 24. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 53 i godzinnej inkubacji, warstwa A skóry.....	62
Rycina 25. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 53 i godzinnej inkubacji, warstwa B skóry.....	62
Rycina 26. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji roztworu olejowego barwnika RBHE i pięciogodzinnej inkubacji, warstwa A skóry.....	62
Rycina 27. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 52 i pięciogodzinnej inkubacji, warstwa A skóry.....	63
Rycina 28. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 52 i pięciogodzinnej inkubacji, warstwa B skóry.....	63
Rycina 29. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 53 i pięciogodzinnej inkubacji, warstwa A skóry.....	63
Rycina 30. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 53 i pięciogodzinnej inkubacji, warstwa B skóry.....	64
Rycina 31. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji roztworu olejowego RBHE i godzinnej inkubacji. Wykres I przedstawia intensywność fluorescencji wzdłuż linii białej, wykres II wzdłuż linii niebieskiej. Warstwa A skóry.....	64
Rycina 32. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji roztworu olejowego RBHE i godzinnej inkubacji. Wykres przedstawia intensywność fluorescencji wzdłuż linii białej. Warstwa B skóry.....	65
Rycina 33. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 52 i godzinnej inkubacji. Wykres I przedstawia intensywność fluorescencji wzdłuż linii białej, wykres II wzdłuż linii niebieskiej. Warstwa A skóry.....	65
Rycina 34. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 52 i godzinnej inkubacji. Wykres I przedstawia intensywność fluorescencji wzdłuż linii białej, wykres II wzdłuż linii niebieskiej. Warstwa B skóry.....	65

Rycina 35. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 53 i godzinnej inkubacji. Wykres I przedstawia intensywność fluorescencji wzdłuż linii białej, wykres II wzdłuż linii niebieskiej. Warstwa A skóry.....	66
Rycina 36. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 53 i godzinnej inkubacji. Wykres I przedstawia intensywność fluorescencji wzdłuż linii białej, wykres II wzdłuż linii niebieskiej. Warstwa B skóry.....	66
Rycina 37. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji roztworu olejowego RBHE i pięciogodzinnej inkubacji. Wykres przedstawia intensywność fluorescencji wzdłuż linii białej. Warstwa A skóry.....	66
Rycina 38. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 52 i pięciogodzinnej inkubacji. Wykres I przedstawia intensywność fluorescencji wzdłuż linii białej, wykres II wzdłuż linii niebieskiej. Warstwa A skóry.....	67
Rycina 39. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 52 i pięciogodzinnej inkubacji. Wykres I przedstawia intensywność fluorescencji wzdłuż linii białej, wykres II wzdłuż linii niebieskiej. Warstwa B skóry.....	67
Rycina 40. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 53 i pięciogodzinnej inkubacji. Wykres I przedstawia intensywność fluorescencji wzdłuż linii białej, wykres II wzdłuż linii niebieskiej. Warstwa A skóry.....	67
Rycina 41. Przekrój poprzeczny skóry ludzkiej po aplikacji formułacji 53 i pięciogodzinnej inkubacji. Wykres I przedstawia intensywność fluorescencji wzdłuż linii białej, wykres II wzdłuż linii niebieskiej. Warstwa B skóry.....	68

VII. SPIS TABEL

Tabela 1. Wielkości opisujące regiony mieszków włosowych.	13
Tabela 2. Przykłady cząstek przenikających do mieszków włosowych.	18
Tabela 3. Przykłady formułacji otrzymanych metodą sonikacji.....	24
Tabela 4. Podłoża tłuszczowe i emulgatory używane do wytwarzania SLN do podania na skórę.	26
Tabela 5. Skład i warunki otrzymywania formułacji 1-36.....	36
Tabela 6. Skład i czas prowadzenia procesu otrzymywania zawiesin mikrosfer lipidowych dla formułacji nr. 37-45.	39
Tabela 7. Stężenia emulgatorów w formułacjach 46-48.	39
Tabela 8. Skala oceny reakcji skóry.....	41
Tabela 9. Skala klasyfikacji produktu kosmetycznego.....	42
Tabela 10. Parametry procesu otrzymywania formułacji 52 i 53 oraz stężenie użytego emulgatora.	43
Tabela 11. Średnie parametry opisujące cząstki otrzymane przy użyciu emulgatora Axol C 62.	45
Tabela 12. Średnie parametry opisujące cząstki otrzymane przy użyciu emulgatora Tego Care 450.	46
Tabela 13. Średnie parametry opisujące cząstki otrzymane przy użyciu emulgatora MSG.	47
Tabela 14. Średnie parametry opisujące cząstki otrzymane przy użyciu emulgatora Tween 80.....	47
Tabela 15. Wartości potencjału zeta dla formułacji przygotowanych przy użyciu różnych emulgatorów.	49
Tabela 16. Parametry opisujące cząstki po ośmiotygodniowym przechowywaniu w lodówce i temperaturze pokojowej.....	51
Tabela 17. Średnie parametry opisujące cząstki otrzymane przy użyciu różnych stężeń emulgatora Tego Care 450.	54
Tabela 18. Wartości potencjału zeta dla formułacji przygotowanych przy użyciu różnych stężeń emulgatorów, mieszaniny emulgatorów i formułacji bez użycia konserwantu.	54
Tabela 19. Właściwości cząstek otrzymanych przy użyciu mieszaniny emulgatorów	56
Tabela 20. Właściwości cząstek otrzymanych bez użycia konserwantu Euxyl PE 9010	57
Tabela 21. Wyniki odczytu reakcji skórnej	58
Tabela 22. Wartości średniej intensywności fluorescencji dla długości fali światła czerwonego w dwóch warstwach skóry dla 3 różnych formułacji po jednogodzinnej inkubacji.	68

Tabela 23. Wartości średniej intensywności fluorescencji dla długości fali światła czerwonego w dwóch warstwach skóry dla 3 różnych formułacji po pięciogodzinnej inkubacji.....	68
Tabela 24. Właściwości emulgatorów.....	70
Tabela 25. Potencjalne działanie drażniące według klasyfikacji EU.....	78

VIII. ZAŁĄCZNIKI

Tabela A. Podsumowanie składów i warunków procesowych otrzymywania mikrosfer lipidowych metodą sonikacji.

Nr	Skład formulacji [%]							Moc [W]	Czas [min]
	Compritol 888 ATO	Axol C 62	Tego Care 450	MSG	Tween 80	Euxyl PE 9010	Woda		
1	5	2	-	-	-	1	92	150	5
2	5	2	-	-	-	1	92	150	10
3	5	2	-	-	-	1	92	150	15
4	5	2	-	-	-	1	92	300	5
5	5	2	-	-	-	1	92	300	10
6	5	2	-	-	-	1	92	300	15
7	5	2	-	-	-	1	92	50	5
8	5	2	-	-	-	1	92	50	10
9	5	2	-	-	-	1	92	50	15
10	5	-	2	-	-	1	92	150	5
11	5	-	2	-	-	1	92	150	10
12	5	-	2	-	-	1	92	150	15
13	5	-	2	-	-	1	92	300	5
14	5	-	2	-	-	1	92	300	10

15	5	-	2	-	-	1	92	300	15
16	5	-	2	-	-	1	92	50	5
17	5	-	2	-	-	1	92	50	10
18	5	-	2	-	-	1	92	50	15
19	5	-	-	2	-	1	92	150	5
20	5	-	-	2	-	1	92	150	10
21	5	-	-	2	-	1	92	150	15
22	5	-	-	2	-	1	92	300	5
23	5	-	-	2	-	1	92	300	10
24	5	-	-	2	-	1	92	300	15
25	5	-	-	2	-	1	92	50	5
26	5	-	-	2	-	1	92	50	10
27	5	-	-	2	-	1	92	50	15
28	5	-	-	-	2	1	92	150	5
29	5	-	-	-	2	1	92	150	10
30	5	-	-	-	2	1	92	150	15
31	5	-	-	-	2	1	92	300	5
32	5	-	-	-	2	1	92	300	10
33	5	-	-	-	2	1	92	300	15
34	5	-	-	-	2	1	92	50	5

35	5	-	-	-	2	1	92	50	10
36	5	-	-	-	2	1	92	50	15
37	5	-	4	-	-	1	91	300	5
38	5	-	4	-	-	1	91	300	10
39	5	-	4	-	-	1	91	300	15
40	5	-	2,5	-	-	1	92,5	300	5
41	5	-	2,5	-	-	1	92,5	300	10
42	5	-	2,5	-	-	1	92,5	300	15
43	5	-	1	-	-	1	94	300	5
44	5	-	1	-	-	1	94	300	10
45	5	-	1	-	-	1	94	300	15
46	5	-	1,5	-	0,5	1	92	300	15
47	5	-	1	-	1	1	92	300	15
48	5	-	0,5	-	1,5	1	92	300	15
49	5	-	2	-	-	-	93	300	5
50	5	-	2	-	-	-	93	300	10
51	5	-	2	-	-	-	93	300	15
52*	5		2			1	92	300	15
53*	5		2			1	92	150	5

* formułacje zawierały barwnik fluorescencyjny w stężeniu 0,005 mg/ml.