

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KAJA ŠEGA

**DIPLOMSKA NALOGA**

**PROUČEVANJE VPLIVA VRSTE LIPIDOV V  
NANOSISTEMIH NA TRANSEPIDERMALNO IZGUBO  
VODE IN HIDRATACIJO KOŽE**

UN KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2013



UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KAJA ŠEGA

DIPLOMSKA NALOGA

**PROUČEVANJE VPLIVA VRSTE LIPIDOV V  
NANOSISTEMIH NA TRANSEPIDERMALNO IZGUBO  
VODE IN HIDRATACIJO KOŽE**

**A STUDY OF THE INFLUENCE OF LIPID TYPE IN  
NANOSYSTEMS ON TRANSEPIDERMAL WATER LOSS  
AND SKIN HYDRATION**

Ljubljana, 2013



Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc.dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag.farm.

Za pomoč pri pisanju diplomske naloge bi se rada zahvalila mentorici doc.dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag.farm., ki mi je s svojimi nasveti pomagala in me usmerjala pri delu. Zahvalila bi se tudi družini in fantu Gašperju za podporo in potrpežljivost med mojim delom v laboratoriju in med pisanjem diplomske naloge.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc.dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.



# Vsebina

<b>1. Uvod</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Nanosistemi</b>	<b>1</b>
1.1.1. Trdni lipidni nanodelci	1
1.1.2. Nanostrukturirani lipidni sistemi	2
1.1.3. Nanoemulzije	3
<b>1.2. Izdelava nanodelcev in vrednotenje stabilnosti</b>	<b>4</b>
1.2.1. Visokostrižna homogenizacija	4
1.2.2. Vrednotenje nanodelcev	4
1.2.3. Fizikalna stabilnost nanodelcev po vgradnji v hidrogel	5
<b>1.3. Transepidermalna izguba vode in hidratacija kože</b>	<b>6</b>
1.3.1. TEWL in hidratacija kože	6
1.3.2. Vpliv različnih lipidov na TEWL in hidratacijo kože	8
<b>2. Namen dela</b>	<b>11</b>
<b>3. Materiali in metode</b>	<b>12</b>
<b>3.1. Materiali</b>	<b>12</b>
3.1.1. Lipidne komponente	12
3.1.2. Površinsko aktivne snovi	13
3.1.3. Reagenti in topila	13
3.1.4. Sestavine za izdelavo hidrogela	13
<b>3.2. Aparature</b>	<b>13</b>
<b>3.3. Izdelava nanosistemov</b>	<b>14</b>
3.3.1. Izdelava trdnih lipidnih nanodelcev	14
3.3.2. Izdelava nanostrukturiranih lipidnih sistemov	14
3.3.3. Izdelava nanoemulzije	15
<b>3.4. Vrednotenje fizikalne stabilnosti nanosistemov</b>	<b>15</b>
3.4.1. Merjenje velikosti delcev in polidisperznega indeksa	16
3.4.2. Merjenje zeta potenciala	16
<b>3.5. Izdelava hidrogela</b>	<b>16</b>
<b>3.6. Klinična študija</b>	<b>17</b>
3.6.1. Meritve s Tewametrom	19
3.6.2. Meritve s Corneometrom	19

<b>4. Rezultati in razprava</b>	<b>20</b>
<b>4.1. Izbira lipidov za izdelavo nanosistemov</b>	<b>20</b>
<b>4.2. Vrednotenje fizikalne stabilnosti nanosistemov</b>	<b>21</b>
4.2.1. Vpliv staranja na velikost nanostruktur	22
4.2.2. Vpliv staranja na PDI nanostruktur	23
4.2.3. Vpliv staranja na ZP nanostruktur	23
<b>4.3. Vrednotenje nanosistemov po vgradnji v hidrogel</b>	<b>24</b>
4.3.1. Povprečni premer nanostruktur po vgradnji v hidrogel	24
4.3.2. Polidisperzni indeks nanostruktur po vgradnji v hidrogel	25
4.3.3. Zeta potencial nanostruktur po vgradnji v hidrogel	27
<b>4.4. Vpliv vrste lipidov v nanosistemi vgrajeni v hidrogel na TEWL</b>	<b>28</b>
4.4.1. Vpliv praznega hidrogela in hidrogelov z vgrajenimi disperzijami nanosistemov na TEWL pri 5 prostovoljkah	28
4.4.2. Primerjava vpliva hidrogela z vgrajeno disperzijo NLC 20% glicerol monostearat in hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN glicerol monostearat na TEWL	31
4.4.3. Primerjava vpliva hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN Dynasan <sup>®</sup> 118, hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN Compritol <sup>®</sup> in hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN glicerol monostearat na TEWL	32
4.4.4. Vpliv vrste lipida v nanosistemi na TEWL	33
<b>4.5. Vpliv vrste lipidov v nanosistemi vgrajeni v hidrogel na hidratacijo kože</b>	<b>34</b>
4.5.1. Vpliv praznega hidrogela in hidrogelov z vgrajenimi disperzijami nanosistemov na hidratacijo kože pri 5 prostovoljkah	34
4.5.2. Primerjava vpliva hidrogela z vgrajeno disperzijo NLC 20% glicerol monostearat in hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN glicerol monostearat na hidratacijo kože	38
4.5.3. Primerjava vpliva hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN Dynasan <sup>®</sup> 118, hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN Compritol <sup>®</sup> in hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN glicerol monostearat na hidratacijo kože	39
4.5.4. Vpliv vrste lipida v nanosistemi na hidratacijo kože	40
<b>5. Sklep</b>	<b>42</b>
<b>6. Literatura</b>	<b>43</b>



## Povzetek

Na področju kozmetične industrije je v zadnjem času priljubljena uporaba novih koloidnih dostavnih sistemov, predvsem trdnih lipidnih nanodelcev, nanostrukturiranih lipidnih sistemov in nanoemulzij. Nanostrukturirani lipidni sistemi so izboljšana verzija trdnih lipidnih nanodelcev. Omenjeni nanosistemi imajo ugoden vpliv na zmanjšanje transepidermalne izgube vode in višjo hidratacijo kože. Zaradi njihove nanometrskve velikosti na koži naredijo okluziven film, ki zmanjša izhlapevanje vode in posledično poveča hidratacijo kože.

V diplomski nalogi smo izdelali trdne lipidne nanodelce, nanostrukturirane lipidne sisteme in nanoemulzijo iz različnih vrst lipidov. Z meritvami povprečnega premera nanostruktur, polidisperznega indeksa in zeta potenciala smo vrednotili fizikalno stabilnost nanosistemov skozi daljše časovno obdobje. Fizikalno stabilne disperzije nanostruktur smo vgradili v hidrogelne ter jim vrednotili fizikalno stabilnost v daljšem časovnem obdobju. Izvedli smo klinično študijo vpliva različnih vrst lipidov v nanosistemi na transepidermalno izgubo vode in hidratacijo kože.

Nanosistemi so se izkazali kot uspešni v zvišanju hidratacije kože. Hidratacija kože se je največ zvišala po aplikaciji hidrogela z nanoemulzijo, najmanj pa po aplikaciji hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN Dynasan<sup>®</sup> 118. Glede na rezultate klinične študije in velike variabilnosti rezultatov, ne moremo trditi, da vrsta lipida v disperziji SLN oziroma vrsta disperzije vpliva različno na hidratacijo kože.

Glede na rezultate klinične študije ne moremo trditi, kako vrsta lipida v nanosistemu vpliva na transepidermalno izgubo vode. V nekaterih primerih smo dobili vrednosti TEWL 60 minut po nanosu hidrogelov nižje od začetnih vrednosti, vendar zaradi velike variabilnosti rezultatov ne moremo trditi, kakšen je njihov vpliv na TEWL. Prav tako zaradi velike variabilnosti rezultatov ne moremo trditi, da vrsta nanosistema (SLN ali NLC) ali vrsta lipida v SLN vpliva na TEWL.

Ključne besede: Nanosistemi, transepidermalna izguba voda, hidratacija kože, hidrogeli

Key words: Nanosystems, transepidermalna water loss, skin hydration, hydrogels

## Seznam okrajšav

COM	Compritol <sup>®</sup> 888 ATO
D118	Dynasan <sup>®</sup> 118
GM	glicerol monostearat
KAS	kozmetično aktivna sestavina
KI	kozmetični izdelek
LD	laserska difrakcija
NE	nanoemulzija
NLC	nanostrukturirani lipidni sistemi
NLC 20 %	nanostrukturirani lipidni sistemi, kjer je 20% lipidne faze iz tekočega lipida
NLC 40 %	nanostrukturirani lipidni sistemi, kjer je 40% lipidne faze iz tekočega lipida
O/V	olje v vodi
PCS	fotonska korelacijska spektroskopija
PDI	polidisperzni indeks
SLN	trdni lipidni nanodelci
TEWL	transepidermalna izguba vode
ZP	zeta potencial

## 1. Uvod

Nanomateriali se uporabljajo v različnih kozmetičnih izdelkih (KI), od vlažilnih KI, KI za nego las do KI za zaščito pred soncem. Skoraj vsi glavni svetovni proizvajalci kozmetičnih izdelkov v svoje izdelke vgrajujejo nanomateriale. Evropska komisija je leta 2006 ocenila, da so kar v 5 % KI prisotni nanomateriali. Njihova varnost je pod drobnogledom že več let, saj so si rezultati raziskav nasprotujoči. Pojavlja se vprašanje, ali so nanomateriali toksični ali so varni. Kljub temu pa so med proizvajalci priljubljeni. V kozmetični industriji se jih uporablja več vrst. Glavna je uporaba nanomaterialov kot UV filtrov in za dostavo kozmetično aktivnih sestavin (KAS). Glavna UV filtra, ki sta lahko prisotna v nanometrskih velikostih, sta titanov dioksid in cinkov oksid. Nanosistemi za dostavo KAS so liposomi, niosomi, trdni lipidni nanodelci in nanostrukturirani lipidni sistemi. (1)

### 1.1. Nanosistemi

Poznamo različne vrste nanodelcev. Izkazujejo nove lastnosti in funkcije, ki so drugačne kot pri delcih iz istih sestavin, a večjega velikostnega razreda. Nanodelci so koloidni nosilci KAS. Koloidno disperzni sistem je sestavljen iz vsaj dveh komponent, od katerih je ena dispergirana v drugi (disperznem mediju) v obliki delcev, velikih od 1 nm do 1000 nm. Koloidi se od pravih raztopin razlikujejo po sipanju svetlobe na koloidnih delcih. Pojav imenujemo Tyndallov efekt.(2) Mednje med drugim spadajo tudi trdni lipidni nanodelci, nanostrukturirani lipidni sistemi in nanoemulzije.

#### 1.1.1. Trdni lipidni nanodelci

V začetku devetdesetih let prejšnjega stoletja so znanstveniki razvili trdne lipidne nanodelce (ang. Solid lipid nanoparticles-SLN) kot alternativni dostavni sistem emulzijam, liposomom in polimernim nanodelcem. Idejo za izdelavo SLN so dobili od emulzij O/V, tako da so tekoč lipid zamenjali s trdnim lipidom. Trdni lipid je v trdnem agregatnem stanju pri sobni in telesni temperaturi. Povprečna velikost SLN je med 40 in 1000 nm. Sestavljeni so iz trdnega lipida (od 0,1 % (m/m) do 30 % (m/m)) dispergirane v vodnem mediju. Običajno je sistem stabiliziran z 0,5% (m/m) do 5% (m/m) površinsko aktivne snovi. Trdni lipidi, ki se uporabljajo so trigliceridi (npr. glicerol tristearat, glicerol tripalmitat, glicerol trimiristat), parcialni gliceridi (npr. Imwitor<sup>®</sup>), maščobne kisline (npr.

stearinska kislina), steroidi (npr. holesterol) in voski (npr. cetilpalmitat). Za stabilizacijo sistema uporabljamo površinsko aktivne snovi, običajno različne poloksamere, polisorbate, lecitin in žolčne kisline. Možna je tudi uporaba kombinacije površinsko aktivnih snovi, kar omogoča večjo učinkovitost stabilizatorjev. (3, 4)

Trdni lipidni nanodelci imajo številne prednosti v primerjavi s starejšimi dostavnimi sistemi. SLN zaščitijo vgrajene sestavine pred razgradnjo, povečajo stabilnost vgrajenih aktivnih sestavin v daljšem časovnem obdobju, z vgradnjo kozmetično aktivne sestavine v SLN lahko dosežemo kontrolirano sproščanje, omogočena je ciljana dostava sestavin in večja vsebnost KAS v sistemu, izboljša pa se tudi penetracija v stratum corneum. SLN imajo tudi okluzivno delovanje, zaradi česar so idealni za uporabo v dnevnikih kremah, saj povečajo hidratacijo kože. Ugotovili pa so tudi, da imajo na UV svetlobo odporne lastnosti. Velika prednost SLN je tudi možnost istočasnega vgrajevanja lipofilnih in hidrofilnih kozmetično aktivnih sestavin. Pri izdelavi SLN kot dostavnih sistemov ni uporabe organskih topil in ne pojavljajo se težave pri veliki proizvodnji. (1, 4, 5)

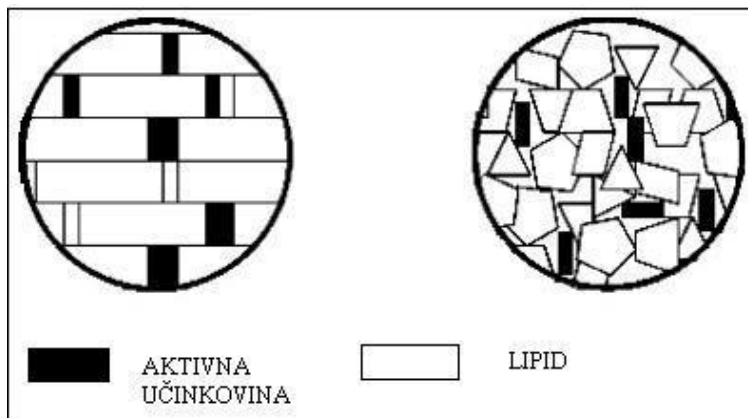
Kljub obetavnim možnostim za uporabo SLN v kozmetičnih izdelkih se pojavljajo pomanjkljivosti. Problematična je visoka vsebnost vode v disperziji SLN, saj lahko pride do kontaminacije z mikroorganizmi. Potrebna je izboljšava proizvodnega procesa, da bo le-ta omogočal večjo vgradnjo KAS v sistem in onemogočal izgubo KAS med shranjevanjem, kar je povezano s polimorfnimi prehodi lipidov. (1)

### **1.1.2. Nanostrukturirani lipidni sistemi**

Nanostrukturirani lipidni sistemi (ang. Nanostructured lipid carriers-NLC) so lipidni nanodelci druge generacije. Sestavljeni so iz zmesi trdnega in tekočega lipida, ki je pri telesni temperaturi v trdnem agregatnem stanju. Običajno razmerje med trdnim in tekočim lipidom v zmesi je od 70:30 do 99,9:0,1. (3, 6)

NLC so izboljšana verzija SLN. Razviti so bili z namenom, da odpravijo potencialne pomanjkljivosti SLN. V primerjavi s SLN nanostrukturirani nosilni sistemi kažejo večjo učinkovitost vgrajevanja KAS, manjšo vsebnost vode v disperziji delcev in zmanjšujejo oziroma preprečujejo izgubo kozmetično aktivnih sestavin med shranjevanjem. Razlika med SLN in NLC je v kristaliničnosti sistema. Pri pripravi delcev iz trdnega lipida, zlasti iz visoko prečiščenega trdnega lipida, tvori lipid relativno popolno kristalno mrežo, kar zmanjša učinkovitost vgrajevanja aktivnih sestavin v disperzijo SLN. V nasprotju pa

uporaba zmesi trdnega in tekočega lipida z različno strukturo molekul onemogoča tvorbo popolne kristalne mreže. Nepravilnosti v kristalni strukturi omogočajo večjo učinkovitost vgrajevanja KAS in manjšo možnost izrivanja KAS iz delcev v času shranjevanja. (1,3,6)



Slika 1: Levo: struktura SLN z bolj ali manj urejeno kristalno strukturo, ki ima omejeno učinkovitost vgrajevanja KAS. Desno: struktura NLC z neurejeno kristalno strukturo z vmesnimi praznimi prostori, kar omogoča večjo učinkovitost vgrajevanja ter manjšo možnost izrivanja KAS. (6)

### 1.1.3. Nanoemulzije

Nanoemulzije (NE) so disperzije kapljic nanovelikostnega razreda ene tekočine v drugi. V primerjavi z emulzijami večjega velikostnega razreda imajo številne prednosti. So stabilnejše kot emulzije. Posledica stabilnosti nanoemulzij je kasnejše penjenje izdelka, kar podaljša rok uporabe KI. Kapljice v nanoemulziji imajo zaradi majhne velikosti večjo površino. Ugotovili so, da manjša velikost kapljic pomeni večjo stabilnost sistema in boljše pogoje za stabilno vgrajevanje aktivnih sestavin. (1)

Sestavine nanoemulzij so ponavadi GRAS (ang. generally recognized as safe) sestavine, zaradi česar se nanoemulzije štejejo pod varne dostavne sisteme. (1)

## 1.2. Izdelava nanodelcev in vrednotenje stabilnosti

### 1.2.1. Visokostrižna homogenizacija

Visokostrižna homogenizacija z rotor stator homogenizatorjem je enostavna metoda za izdelavo disperzij nanodelcev. Metoda se široko uporablja. Z rotor stator homogenizatorjem iz staljenih komponent sistema izdelamo emulzijo. Z ohlajanjem se oljne kapljice strdijo in nastanejo disperzije nanosistemov. Parametri, ki vplivajo na velikost delcev, polidisperzni indeks in zeta potencial, so čas emulgiranja, hitrost vrtenja in postopek ohlajanja disperzije. (4)

Najpogostejša metoda za izdelavo disperzij nanodelcev je visokotlačna homogenizacija. Za izdelavo nanodelcev se uporabljata dva načina homogenizacije, in sicer vroča ter hladna homogenizacija.

### 1.2.2. Vrednotenje nanodelcev

Najpomembnejši parametri, ki jih vrednotimo pri nanodelcih, so velikost in oblika delcev, stopnja kristaliničnosti in lipidne modifikacije, površinski naboj ali zeta potencial ter prisotnost dodatnih koloidnih struktur (miceli, liposomi, podhlajena talina, nanodelci učinkovine). (4,7)

#### 1.2.2.1. Merjenje velikosti delcev

Najpogostejši tehniki za rutinsko merjenje velikosti nanodelcev sta fotonska korelacijska spektroskopija (ang. Photon correlation spectroscopy - PCS) in laserska difrakcija (ang. Laser Diffraction – LD). Obe tehniki ne merita neposredno velikosti delcev, ampak sipanje svetlobe na delcih, iz česar naprave izračunajo velikost delcev. (4)

Fotonska korelacijska spektroskopija je metoda za merjenje velikosti delcev manjših od 1 $\mu$ m. Temelji na Brownovem gibanju, to je naključno gibanje zaradi trkov molekul topila z delci. Za velike delce je značilno počasno, za majhne delce pa hitro Brownovo gibanje. Odvisno je tudi od temperature in viskoznosti disperznega medija. Hitrost Brownovega gibanja in s tem velikost delcev je v povezavi s translacijskim difuzijskim koeficientom (D). Če predpostavimo, da so delci sferični in med njimi ni interakcij, izračunamo povprečno hidrodinamsko velikost delcev s pomočjo Stokes Einsteinove enačbe:  $d_H = kT / (3\pi\eta D)$  (6), kjer je  $d_H$  hidrodinamski premer, D translacijski difuzijski koeficient, k Boltzmannova konstanta, T absolutna temperatura in  $\eta$  viskoznost. S PCS dobimo

povprečno velikost delcev v disperziji in polidisperzni indeks, ki predstavlja merilo za širino porazdelitve velikosti delcev. PDI vrednosti so od 0 do 1, kjer PDI blizu 0 pomeni monodisperzni vzorec, PDI blizu 1 pa polidisperzni vzorec. (6,8)

Laserska difrakcija deluje na principu uklona svetlobe. Delci, ki jih osvetli laserski žarek, sipajo svetlobo pod kotom, ki je direktno v povezavi z velikostjo delcev. Manjši delci sipajo svetlobo pod večjim kotom sipanja, intenziteta sipanja je nizka. Veliki delci pa sipajo svetlobo pod manjšim kotom sipanja in z visoko intenziteto sipanja.

#### **1.2.2.2. Merjenje zeta potenciala**

Merjenje zeta potenciala omogoča napoved fizikalne stabilnosti koloidnih disperzij. Na splošno je združevanje delcev manj verjetno pri nabitih delcih, ki imajo visoko absolutno vrednost zeta potenciala. Absolutna vrednost zeta potenciala pri stabilnih disperzijah mora biti višja od 30 mV. Pri teh delcih pride do močnega odboja, kar onemogoča združevanje in posledično fizikalno nestabilnost disperzije. Pri sistemih, ki vsebujejo sterični stabilizator, se to pravilo ne uporablja vedno. Adsorpcija steričnega stabilizatorja na površino delcev zniža zeta potencial zaradi spremembe v strižni ravnini delca. (4)

Zeta potencial merimo z elektroforezo. Meritev temelji na merjenju hitrosti gibanja delcev v električnem polju. Le-ta je odvisna od jakosti električnega polja, dielektrične konstante medija, viskoznosti medija in zeta potenciala delcev. Faktorji, ki vplivajo na ZP, so sprememba pH, prevodnost medija (koncentracija in vrsta soli) in koncentracija določenih pomožnih snovi.

#### **1.2.3. Fizikalna stabilnost nanodelcev po vgradnji v hidrogel**

Za lokalno uporabo disperzij nanodelcev morajo biti le-ti vgrajeni v primerno obliko s poltrdno konsistenco. Kadar so nanodelci vgrajeni v poltrdno obliko, kot je na primer hidrogel, lahko pride do sprememb fizikalno-kemijskih lastnosti SLN ali NLC, kar je posledica interakcij med sestavinami končne formulacije. Te spremembe lahko ocenimo z reološkimi meritvami, fizikalno stabilnost pa lahko ocenimo tudi z meritvami velikosti delcev in zeta potenciala. (8)

Souto in sod. so pri vrednotenju fizikalne stabilnosti SLN in NLC pred in po vgradnji v hidrogel ugotovili, da se velikost in zeta potencial po vgradnji disperzije nanodelcev v hidrogel spremenita. Za študijo so z vročo visokotlačno homogenizacijo izdelali disperzije

SLN in NLC, sestavljene iz 20 % (m/m) lipidne faze in 5 % (m/m) emulgatorja. Lipidna faza SLN je bila sestavljena iz 100 % Dynasana<sup>®</sup> 116, lipidna faza NLC pa iz 70 % Dynasana<sup>®</sup> 116 in 30 % Miglyola<sup>®</sup> 812. Disperzije nanodelcev so vgradili v štiri različne hidrogelne. Kot tvorilce gelov so uporabili Carbopol<sup>®</sup> 934, ksantan, hidroksietilcelulozo 4000 (HEC) in hitosan. Po 3 mesecih shranjevanja na sobni temperaturi so izvedli meritve velikosti delcev, zeta potenciala in reološke meritve. Ugotovili so, da se velikost delcev po vgradnji v hidrogel s časom bistveno ne spremeni. Razlike so majhne, pri hidrogelih iz ksantana, HEC 4000 in Carbopola<sup>®</sup> 934 so delci po 3 mesecih manjši kot ob izdelavi, pri hidrogelu iz hitosana pa večji. Njihova ugotovitev je bila, da vgradnja nanodelcev v hidrogelne ne povzroča združevanja delcev. Polidisperzni indeks je višji le pri hidrogelih iz ksantana in hitosana. Trdni lipidni nanodelci in nanostrukturirani lipidni nosilci so negativno nabiti po vgradnji v hidrogelne iz ksantana, HEC 4000 in Carbopola 934 zaradi njihovega anionskega značaja, po vgradnji v hidrogel iz hitosana pa so nabiti pozitivno, kar je posledica kationskega značaja hitosana. Pozitivno nabite amino skupine hitosana so sposobne nevtralizirati negativni naboj na površini delcev in ga spremeniti. (8)

### 1.3. Transepidermalna izguba vode in hidratacija kože

#### 1.3.1. TEWL in hidratacija kože

Transepidermalna izguba vode (ang. Transepidermal water loss-TEWL) je pasivna izguba vode skozi nepoškodovano roženo plast. Proces je kontinuiran in odvisen od relativne vlažnosti okolja, temperature, letnega časa in hidratacije kože. TEWL je dober pokazatelj okvarjene barierne funkcije rožene plasti. Povečana TEWL kaže na motnje rožene plasti in izgubo medceličnih lipidov. (9)

TEWL lahko merimo s Tewametrom TM 300 (Courage & Khazake GmbH, Köln, Nemčija), ki meri gostoto toka vodnih hlapov v zraku nad kožo. Merilna celica je odprta in ima dva senzorja vlage in temperature. Iz meritev aparatura izračuna difuzijski gradient. Celica je občutljiva na pogoje okolja, predvsem na gibanje zraka, relativno vlažnost in temperaturo.



Preglednica I: Interpretacija izmerjenih vrednosti transepidermalne izgube vode s Tewametrom TM 300. (10,11)

<b>Vrednost</b> <b>g/m<sup>2</sup>/h</b>	<b>Enota</b>	<b>Interpretacija</b>
0-8	0-4	Zelo zdrava bariera
8-14	5-9	Zdrava bariera
14-20	10-12	Normalna bariera
20-24	13-16	Omejena bariera
25+	17-20	Kritično stanje

Hidracija kože vpliva na njeno barierno funkcijo in mehanske lastnosti ter vpliva na penetracijo spojin v kožo. Na hidracijo vpliva prisotnost naravnega vlažilnega faktorja, uporaba vlažilcev, uporaba negovalnih KI, zdravila, zdravstvena stanja ter poklicna in okoljska izpostavljenost škodljivim snovem in pogojem.

Meritev hidracije kože poteka v zgornjih plasteh kože. Temelji na predpostavki, da se električne lastnosti kože spreminjajo v odvisnosti od hidratiranosti le-te. Meritve lahko izvajamo s Corneometrom CM 825 (Courage & Khazake GmbH, Köln, Nemčija). Merimo kapacitivnost dielektrika, to je kože. Merilna sonda je iz zlatih žic na keramični površini, ki so pokrite s tanko stekleno ploščo za zaščito sonde.

Preglednica II: Interpretacija meritev s Corneometrom CM 825 (11,12)

<b>Interpretacija</b>	<b>Vrednosti</b>
Zelo suha koža	<30 CM 825 arbitrarnih enot
Suha koža	30-40 CM 825 arbitrarnih enot
Normalna koža	>40 CM 825 arbitrarnih enot

### 1.3.2. Vpliv različnih lipidov na TEWL in hidratacijo kože

Trdni lipidni nanodelci in nanostrukturirani lipidni sistemi imajo pri lokalni uporabi okluzivne lastnosti zaradi nastajanja filma na površini kože. Le-ta zmanjšuje transepidermalno izgubo vode in posledično zvišuje penetracijo aktivnih sestavin skozi bolj hidratiran stratum corneum. (8)

Prva krema, ki je vsebovala NLC, se je na prodajnih policah pojavila leta 2005. To je Cutanova Nanorepair Q10 krema (Dr. Rimpler GmbH, Wedemark, Nemčija), katere vpliv na hidratacijo kože so *in vivo* vrednotili J. Pardeike in sod. Izdelali so kremo, ki je vsebovala disperzijo NLC in kontrolno kremo brez disperzije NLC. Prostovoljke so si obe kremi nanašale 6 tednov. Prvi dan po začetku študije ni bilo opaznih razlik v hidrataciji kože med obema kremama. Po sedemdnevni aplikaciji kreme z disperzijo NLC in brez NLC je že bila opazna razlika, saj se je pri kremi z NLC hidratacija povečala za dobrih 20 %, pri kremi brez NLC pa za dobrih 15 %. Po 28 dneh aplikacije je bila razlika manjša. V obeh primerih se je hidratacija zmanjšala glede na sedemdnevno aplikacijo. Pri kremi z NLC je bila hidratacija za 18 % višja od začetnih vrednosti, pri kremi brez NLC pa je bila za 13 % višja od začetne vrednosti. Po 42 dneh aplikacije obeh krem so razlike največje. Pri kremi z NLC se je hidratacija povečala za več kot 25 %, pri kremi brez NLC pa za 20 %. Po šestih tednih študije so prenehali z aplikacijo obeh krem in po enem tednu ponovno izmerili hidratacijo. Hidratacija kože je bila za 5 % višja od začetne vrednosti po uporabi kreme z NLC in le za 2 % višja po uporabi kreme brez NLC. Ugotovili so, da razlike niso bistvene. Boljši vpliv kreme z disperzijo NLC na hidratacijo kože je posledica tako okluzivnega delovanja disperzije NLC kot tudi boljše penetracije koencima Q10 v stratum corneum iz NLC. (9)

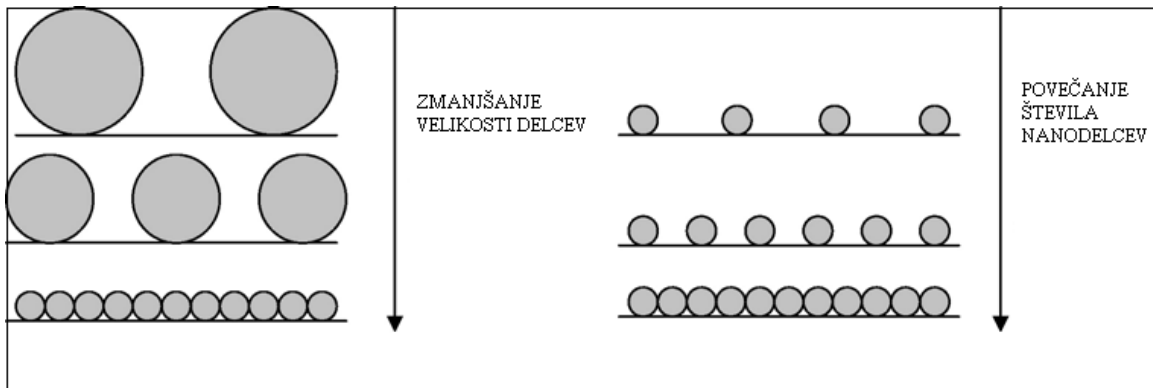
S. A. Wissing in R. H. Müller sta vrednotila vpliv SLN na hidratacijo kože. Za študijo sta uporabila kremo O/V ter kremo O/V, v kateri je bilo 40 % vodne faze nadomeščene z disperzijo SLN. Študijo sta izvedla na 25 prostovoljkah z zdravo kožo. Tri dni pred začetkom študije sta izvajala osnovne meritve. Prostovoljke so 28 dni dvakrat na dan uporabljale testne formulacije na podlahti. Po 28 dneh sta s Corneometrom izvedla meritve hidratacije kože, ki so pokazale spremembe v hidrataciji kože po nanosu obeh formulacij. Ugotovila sta, da O/V krema z vgrajeno disperzijo SLN bolje učinkuje na hidratacijo kože. Hidratacija je bila po nanosu O/V kreme višja za 24 %, po nanosu O/V kreme z disperzijo SLN pa za 31 %. (13)

C. H. Loo in sod. so proučevali učinek različne sestave NLC, predvsem vsebnost lipidov in vlažilcev, na hidratacijo kože in njihovo okluzivno delovanje ter posledično vpliv na TEWL. Izdelali so 5 formulacij NLC z različnimi sestavami, katere so teden dni nanašali prostovoljkam. Pred nanosom so izmerili kontrolne vrednosti, s katerimi so primerjali rezultate meritev po tednu dni. Aplikacija formulacije z NLC je privedla do znatnega povišanja hidratacije kože po sedmih dneh, medtem ko aplikacija kontrolne formulacije ni povzročila sprememb. Ugotovili so, da uporaba NLC privede do povečanja hidratacije kože zaradi okluzivnega delovanja trdnih in tekočih lipidov prisotnih v NLC. Na koži se tvori koherenten film, kar zmanjša izhlapevanje vode iz kože. Njihove ugotovitve so identične ugotovitvam raziskovalne skupine J. Pardeoke in sodelavcev. Glavni namen njihovega raziskovanja je bil vpliv različne sestave NLC na hidratacijo kože. Boljši učinek na hidratacijo kože je imela formulacija z višjo vsebnostjo lipidov in formulacije z dodanimi sestavinami z okluzivnim delovanjem (lecitin) ali vlažilci (propilenglikol). Učinek formulacije z NLC na zmanjšanje izhlapevanja vode se kaže tudi v nižji transepidermalni izgubi vode. Vzrok je majhna velikost delcev v disperziji NLC, saj imajo delci zaradi svoje velikosti večjo površino in zato tvorijo enotno kompaktno plast na koži, ki preprečuje izhlapevanje vode. Ugotovili so, da se TEWL najbolj zniža, če formulaciji z NLC dodamo sestavino z okluzivnim delovanjem ali vlažilec. Do zmanjšanja TEWL pa pride tudi pri formulacijah z NLC z različnim razmerjem med trdnim in tekočim lipidom. Prav tako kot pri hidrataciji kože je tudi pri TEWL učinkovitejša formulacija z višjo vsebnostjo lipidov. (14)

Splošna lastnost nanomaterialov je povečana lepljivost na površine, le-ta se povečuje s zmanjšanjem velikosti delcev. Lepljivost nanodelcev na površine izkoriščajo pri izdelavi KI, ki na koži tvorijo film in zato povečajo okluzivni učinek ter tako zmanjšajo TEWL. R. H. Müller in sod. so za dokaz okluzivnega delovanja nanodelcev izbrali in vitro tehniko z okluzivnim testom po de Vringer in de Ronde. Čašo z vodo so prekrili s filter papirjem, na papir nanесли formulacijo in v določenih časovnih točkah vrednotili izhlapevanje vode, ki je bila segreta na telesno temperaturo. Za kontrolni vzorec so imeli čašo napolnjeno z vodo in prekrito s filter papirjem, brez dodane formulacije. Kontrolni vzorec brez oviranega izhlapevanja vode je imel okluzijski faktor 0 %, vzorec brez možnosti izhlapevanja pa 100 %. Dokazali so, da imajo večji delci manjši okluzijski faktor kot delci nanovelikostnega razreda. Ugotovili so, da uporaba kreme z vgrajeno disperzijo SLN poveča okluzivni

učinek, le-ta se s časom še povečuje. S tem se zmanjša TEWL. Uporaba nanodelcev je zato priljubljena pri lahkih dnevni kremah, saj se njihov okluzivni učinek poveča do okluzije nočnih krem, ohranijo pa značilno lahkotnost dnevni krem. (6)

Okluzivno delovanje SLN in NLC je mogoče nadzorovati. Obstajata dve možnosti, ali z zmanjšanjem velikosti delcev pri dani koncentraciji lipidov ali pri določeni velikosti delcev s povečanjem števila delcev. (6)



Slika 2: Nadzorovano okluzivno delovanje nanodelcev. Levo: okluzivno delovanje nanodelcev je mogoče izboljšati z zmanjšanjem velikosti delcev pri enaki koncentraciji lipida (iz večjih delcev nastane več manjših delcev, ki bolje pokrivajo površino in tako izboljšajo okluzivno delovanje). Desno: okluzivno delovanje nanodelcev je mogoče izboljšati s povečanjem števila nanodelcev (s povečanjem koncentracije lipida). (6)

R. H. Müller in sod. so izvedli tudi študijo vpliva SLN na hidracijo kože *in vivo*. Izdelali so kremo, identično kremi dostopni na tržišču ter identično kremo, pri kateri so del oljne faze nadomestili s SLN. Krema dostopna na tržišču je bila krema visoke kakovosti z dobrimi vlažilnimi lastnostmi. Po dodatku SLN so se vlažilne lastnosti kreme še izboljšale in hidracija kože je narasla. To dokazuje pozitiven vpliv SLN in NLC na hidracijo kože. (6)

## 2. Namen dela

Namen diplomske naloge je proučevanje vpliva različnih lipidov v nanosistemi na transepidermalno izgubo vode (TEWL) in hidratacijo kože.

Z rotor-stator homogenizatorjem bomo izdelali trdne lipidne nanodelce (SLN), nanostrukturirane lipidne sisteme (NLC) in nanoemulzije iz različnih lipidov. Kot trden lipid bomo uporabili Dynasan<sup>®</sup> 118, Compritol<sup>®</sup> 888 ATO ali glicerol monostearat, tekoči lipid pa bo Miglyol<sup>®</sup> 812. Disperzijam nanosistemov bomo izmerili povprečni premer, polidisperzni indeks (PDI) in zeta potencial (ZP). Meritve bomo izvedli na dan izdelave, čez en teden in po 7 tednih ter s tem vrednotili fizikalno stabilnost disperzij nanosistemov. Izdelali bomo hidrogel, v katere bomo vgradili fizikalno stabilne disperzije nanosistemov. Fizikalno stabilnost nanosistemov v hidrogelih bomo spremljali z merjenjem povprečnega premera, PDI in ZP na dan izdelave, čez en teden in po 7 tednih. Na podlagi rezultatov se bomo odločili, katere hidrogel bomo uporabili za proučevanje vpliva na TEWL in hidratacijo kože. V klinični študiji bo sodelovalo 5 prostovoljk, starih med 21 in 23 let. Področja nanosa hidrogelov s površino 4 cm<sup>2</sup> bodo na notranji strani leve in desne podlahti. S Tewametrom TM 300 in Corneometrom CM 825 bomo izvedli meritve transepidermalne izgube vode in hidratacije kože pred nanosom hidrogelov ter 30 in 60 minut po nanosu.

## 3. Materiali in metode

### 3.1. Materiali

#### 3.1.1. Lipidne komponente

##### *Trdni lipidi:*

- *Dynasan<sup>®</sup> 118* je glicerol tristearat (Hüls AG).  
Je triglicerid stearinske kisline (C18). Temperatura tališča: 70-73 °C. (15)
- *Compritol<sup>®</sup> 888 ATO* je glicerol behenat (Gattefossé, Francija).  
Je trden lipid v obliki finega belega prahu. Sestavljen je iz zmesi monogliceridov, digliceridov in trigliceridov behenojske (C22) kisline. Uporablja se v kozmetiki, prehrani in peroralnih farmacevtskih izdelkih. V kozmetičnih izdelkih se uporablja kot zgoščevalo, stabilizator, emulgator in površinsko aktivna snov. FDA ga uvršča med varne substance (GRAS). Temperatura tališča: 65-77 °C. (16)
- *Glicerol monostearat (GMS 35-50 %)* je monoglicerid stearinske kisline (C18) (Lex, Slovenija).  
Je higroskopnen, brez barve in vonja ter sladkega okusa.. Uporablja se v prehranski, kozmetični in farmacevtski industriji, kot emulgator, zgoščevalo, sredstvo proti strjevanju, konzervans in drsilo. Temperatura tališča: 58-59 °C. (17)
- *Stearinska kislina* ali oktadekanojska kislina (C18) (Lek, Slovenija).  
Je bel ali blede rumen prašek z blagim vonjem in okusom po loju. Temperatura tališča: 69,9 °C. (18)
- *Cetilpalmitat* (Lex, Slovenija).  
Je v obliki belih voskastih kosmičev, rahlega vonja. Pridobiva se iz cetilnega alkohola in palmitinske kisline. Temperatura tališča: 50 °C. (19)

##### *Tekoči lipid:*

- *Miglyol<sup>®</sup> 812* je triglicerid kaprinske kisline (Sasol, Nemčija).  
Je brezbarvna, srednje viskozna tekočina.

### 3.1.2. Površinsko aktivne snovi

- *Phospholipon<sup>®</sup> 80H* je hidrogeniran fosfatidilholin (Phospholipid GmbH, Nemčija). Pri izdelavi nanodelcev ima vlogo emulgatorja, prisotni negativno nabiti fosfolipidi pa delcem dajejo tudi naboj.
- *Lutrol<sup>®</sup> F68* je poloksamer 188 (BASF, Nemčija). Poloksamer 188 je kopolimer polioksietilena in polioksipropilena in spada med neionogene površinsko aktivne snovi. Njegov HLB je višji od 24, temperatura tališča je 52 °C. Je bel voskast prašek, brez vonja in okusa, dobro topen v vodi in alkoholu. (20)

### 3.1.3. Reagenti in topila

- *Prečiščena in bidestilirana voda*: pripravljena na Fakulteti za farmacijo Ljubljana

### 3.1.4. Sestavine za izdelavo hidrogela

- *Hidroksietilceluloza* (Merck, Nemčija)  
Je bel prašek, brez vonja. Pri izdelavi hidrogela se uporablja kot sredstvo za geliranje.
- *Glicerol (85 %)* (Fagron, Nizozemska).  
Je brezbarvna viskozna tekočina. V hidrogelu se uporablja kot vlažilec.
- *Natrijev benzoat* (Kemika Zagreb, Hrvaška).  
Bel prašek, ki se uporablja kot konzervans.
- *Prečiščena in bidestilirana voda*: pripravljena na Fakulteti za farmacijo Ljubljana

## 3.2. Aparature

- Precizna tehtnica XS205 DualRange (Metler Toledo, Švica)
- Mešalo Lab dancer (IKA Werke GmbH & Co. KG, Nemčija)
- Rotor-stator homogenizator Omni PDH (Omni International, Združene države Amerike)
- PCS naprava Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Velika Britanija)

- Tewameter TM 300 (Courage & Khazake GmbH, Köln, Nemčija)
- Corneometer CM 825 (Courage & Khazake GmbH, Köln, Nemčija)
- Brizge, 5ml (BD, Nemčija)

### 3.3. Izdelava nanosistemov

#### 3.3.1. Izdelava trdnih lipidnih nanodelcev

Pri izdelavi SLN smo uporabili trdni lipid, emulgator oziroma stabilizator, sterični stabilizator in prečiščeno vodo. Trdni lipid je bil Dynasan<sup>®</sup> 118, Compritol<sup>®</sup> 888 ATO ali glicerol monostearat, kot emulgator oziroma stabilizator smo uporabili Phospholipon<sup>®</sup> 80H, kot sterični stabilizator pa Lutrol<sup>®</sup> F68. S precizno tehtnico smo v eno epruveto natehtali trdni lipid in emulgator (lipidna faza), v drugo epruveto pa sterični stabilizator in prečiščeno vodo (vodna faza). Vodno fazo smo mešali z mešalom, dokler se Lutrol<sup>®</sup> F68 ni raztopil v vodi in pokrili s parafilmom.

Lipidno fazo smo na vodni kopeli segreli na približno 10 °C višjo temperaturo od temperature tališča lipida, da se je le-ta raztalil. Ko smo kot lipid uporabili Dynasan<sup>®</sup> 118 ali Compritol<sup>®</sup> 888 ATO je bila temperatura vodne kopeli  $80 \pm 2$  °C, pri glicerol monostearatu pa  $70 \pm 2$  °C. Lipidni fazi smo dodali na enako temperaturo segreto vodno fazo in z rotor-stator homogenizatorjem izdelali emulzijo O/V. Med homogeniziranjem je bil vzorec ves čas v vodni kopeli, s katero smo vzdrževali temperaturo. Homogenizirali smo 10 minut pri 20000 obratih na minuto. Po končanem homogeniziranju smo disperzije ohladili na sobni temperaturi.

Izdelali smo 3g disperzij SLN po sledeči recepturi:

Trdni lipid	3,5 %
Phospholipon <sup>®</sup> 80H	1,0 %
Lutrol <sup>®</sup> F68	1,5 %
Prečiščena voda	do 100 %

#### 3.3.2. Izdelava nanostrukturiranih lipidnih sistemov

Postopek izdelave nanostrukturiranih lipidnih sistemov je enak postopku izdelave SLN. Pri izdelavi NLC smo zamenjali del trdnega lipida s tekočim lipidom. Izdelali smo dve različni



vrsti NLC. V prvem primeru smo 20 % trdega lipida zamenjali s tekočim, v drugem primeru pa 40 % trdnega lipida. Izdelali smo 3g disperzij NLC po sledečih recepturah:

- *NLC 20 %*

Trdni lipid	2,8 %
Miglyol <sup>®</sup> 812	0,7 %
Phospholipon <sup>®</sup> 80H	1,0 %
Lutrol <sup>®</sup> F68	1,5 %
Prečiščena voda	do 100 %

- *NLC 40 %*

Trdni lipid	2,1 %
Miglyol <sup>®</sup> 812	1,4 %
Phospholipon <sup>®</sup> 80H	1,0 %
Lutrol <sup>®</sup> F68	1,5 %
Prečiščena voda	do 100 %

### **3.3.3. Izdelava nanoemulzije**

Pri izdelavi nanoemulzije smo uporabili le tekoč lipid Miglyol<sup>®</sup> 812, emulgator, sterični stabilizator in prečiščeno vodo. V prvo epruveto smo natehtali tekoč lipid in emulgator, v drugo pa sterični stabilizator in prečiščeno vodo. Obe fazi smo segreli na  $80 \pm 2$  °C. Nadaljnji postopek izdelave je bil enak kot pri SLN in NLC.

Izdelali smo 3g nanoemulzije po sledeči recepturi:

Miglyol <sup>®</sup> 812	3,5 %
Phospholipon <sup>®</sup> 80H	1,0 %
Lutrol <sup>®</sup> F68	1,5 %
Prečiščena voda	do 100 %

### **3.4. Vrednotenje fizikalne stabilnosti nanosistemov**

Z aparaturo Zetasizer Nano ZS smo izdelanim nanosistemom izmerili povprečni premer, polidisperzni indeks in zeta potencial. Spremljali smo tudi spreminjanje izgleda disperzij nanodelcev (sprememba barve, večji vidni delci, pojav usedline...).

### 3.4.1. Merjenje velikosti delcev in polidisperznega indeksa

Za merjenje velikosti delcev in PDI smo uporabili plastično kiveto, v katero smo polnili nerazredčene vzorce.

*Pogoji merjenja:*

- Kiveta: DTS 0012
- Temperatura (T): 25 °C
- Čas merjenja: 120 s
- Viskoznost disperznega medija ( $\eta$ ): 0,8872 mPas
- Valovna dolžina laserske svetlobe ( $\lambda$ ): 633 nm
- Lomni količnik disperznega medija (RI): 1,330
- Kot merjenja: 173°

### 3.4.2. Merjenje zeta potenciala

Disperzije smo pred meritvijo razredčili z vodo, tako da smo dobili transparentne vzorce.

*Pogoji merjenja:*

- Kapilarna celica DTS 1060C
- Model: Smoluchowski
- Temperatura (T): 25 °C
- Viskoznost disperznega medija ( $\eta$ ): 0,8872 mPas
- Lomni količnik disperznega medija (RI): 1,330
- dielektrična konstanta disperznega medija ( $\epsilon$ ): 78,5

## 3.5. Izdelava hidrogela

V pateno smo natehtali enako količino glicerola (85 %) in hidroksietilceluloze (HEC) ter raztrli s pestilom. Zmes smo pustili nabrekati in med tem večkrat premešali. V čašo smo natehtali predpisano količino vode oziroma disperzije nanosistema in ji med mešanjem dodali konzervans (Na-benzoat). Vodo oziroma disperzijo nanosistema s konzervansom smo med stalnim mešanjem počasi dodajali v pateno. Pateno smo pokrili s parafilmom in pustili nabrekati 24 ur. Med tem časom smo nastajajoči hidrogel večkrat premešali.

Za vrednotenje fizikalne stabilnosti nanosistemov v hidrogelih smo izdelali po približno 10 g posameznega hidrogela. Za izdelavo smo potrebovali po 4 izdelane disperzije

nanosistemov. Vsem vzorcem smo izmerili povprečni premer, PDI in ZP. Pred meritvami smo hidrogel redčili z vodo, in sicer s konico steklene palčke smo vzeli malo hidrogela in ga razredčili v 25 ml vode.

Za izdelavo hidrogelov za vrednotenje TEWL in hidratacije kože smo potrebovali po 9 vzorcev disperzij nanosistemov (vsak po 3 g). Izdelali smo po 25 g posameznega hidrogela. Hidrogele smo izdelali po sledeči recepturi:

- *Hidrogel*

HEC 4000	2,5 %
Glicerol (85 %)	2,5 %
Na-benzoat	0,1 %
Prečiščena voda ali disperzija nanodelcev	do 100 %



Slika 3: Izdelani hidrogeli. Od leve proti desni: prazen hidrogel, hidrogel z NLC 20 % GM, hidrogel z nanoemulzijo, hidrogel s SLN D118, hidrogel s SLN GM in hidrogel s SLN COM.

### 3.6. Klinična študija

Klinično študijo smo izvedli na 5 prostovoljkah, starih med 21 in 23 let. Prostovoljke so se strinjale s pogoji testiranja. Za testno mesto smo izbrali notranjo stran leve in desne podlahti. Prostovoljke si 2 dni pred študijo niso negovale podlahti s kremami ali drugimi KI.

Klinično študijo smo izvajali v laboratoriju, v katerem se temperatura in relativna vlažnost okolja nista bistveno spreminjali med samim procesom študije. Temperatura se je gibala

med 23 in 26 °C, relativna vlažnost pa je bila od 47 do 51 %. V prostoru smo poskušali zagotoviti kar se da enake pogoje.

Prostovoljke so prihajale na določeno uro, v razmiku dveh ur. Po prihodu so se v laboratoriju klimatizirale. Odstranili smo oblačila s testnega mesta in jim zagotovili udoben položaj, kjer so sedele in se 15 minut klimatizirale.

Po 15 minutah smo na vsaki podlahti označili območja s površino 4 cm<sup>2</sup>, kjer smo kasneje izvedli meritve. Območja so bila na neporaščenih delih kože in ne neposredno nad velikimi žilami. Na vsaki podlahti so bila tri območja, torej na obeh rokah skupno šest območij.



Slika 4: Aplikacija posameznih hidrogelov na testna mesta.

Najprej smo na vseh območjih izmerili osnovne vrednosti transepidermalne izgube vode in hidratacije kože. Meritve smo izvedli najprej s Tewametrom TM 300 in nato s Corneometrom CM 825. Nato smo na posamezna območja nanesli hidrogel. Nanesli smo 0,5 ml hidrogelov, kar smo odmerili z žličko. Na območja na levi roki, ki so si sledila od zapestja proti komolcu smo nanesli prazen hidrogel, hidrogel z NLC 20 % glicerol monostearat in hidrogel z nanoemulzijo. Na desni roki smo od zapestja proti komolcu nanesli hidrogel s SLN Dynasan<sup>®</sup> 118, hidrogel s SLN glicerol monostearat in hidrogel s SLN Compritol<sup>®</sup> 888 ATO.

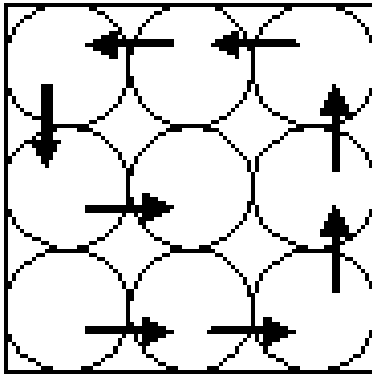
Po 30 minutah smo odstranili preostanke hidrogelov, ki se niso vpili v kožo in izvedli meritve na posameznem območju. Najprej smo izmerili TEWL s Tewametrom TM 300, nato pa še hidratacijo s Corneometrom CM 825. Počakali smo še 30 minut in po 1 uri ponovno izmerili TEWL in hidratacijo kože.

### 3.6.1. Meritve s Tewametrom

Meritve TEWL smo izvajali s Tewameterom TM 300 (Courage & Khazake GmbH, Köln, Nemčija). Pred meritvijo smo sondo namestili na območje, kjer smo želeli izvesti meritev. Poskrbeti smo morali, da je roka prostovoljke mirovala, saj sonde med meritvijo ne smemo premikati. Čas merjenja TEWL je bil 30 sekund.

### 3.6.2. Meritve s Corneometrom

Meritve hidratacije kože smo izvajali s Corneometrom CM 825 (Courage & Khazake GmbH, Köln, Nemčija). S sondo smo izvedli 9 meritev. Meritve so potekale v smeri urinega kazalca. Sondo smo pritiskali na kožo, počakali eno sekundo in jo premaknili.



Slika 5: Potek zaporednih meritev hidratacije kože s Corneometrom CM 825.

## 4. Rezultati in razprava

### 4.1. Izbira lipidov za izdelavo nanosistemov

Prvi korak pri našem eksperimentalnem delu je bila izbira lipidov, ki smo jih v obliki nanosistemov kasneje vgradili v hidrogelne in vrednotili njihov učinek na hidracijo kože in TEWL. Na izbiro smo imeli Dynasan<sup>®</sup> 118, Compritol<sup>®</sup> 888 ATO, glicerol monostearat, stearinsko kislino in cetilpalmitat. Iz vseh naštetih lipidov smo izdelali disperzije SLN in disperzije NLC, v katerih je bilo 20 % oziroma 40 % lipidne faze iz tekočega lipida Miglyola<sup>®</sup> 812.

Po izdelavi disperzij nanosistemov smo na aparaturi Zetasizer Nano ZS izmerili povprečni premer, polidisperzni indeks in zeta potencial posameznih disperzij. Na podlagi dobljenih rezultatov, ki so prikazani v preglednici III, smo se odločili za nadaljnjo uporabo Dynasana<sup>®</sup> 118, Compritola<sup>®</sup> 888 ATO in glicerol monostearata.

Preglednica III: Vpliv vrste lipida na povprečni premer, PDI in ZP nanostruktur.

Vrsta lipida v nanosistemu	d (nm)	PDI	ZP (mV)
SLN Dynasan <sup>®</sup> 118	411,9	0,588	-46,9
NLC 20 % Dynasan <sup>®</sup> 118	303	0,426	-41,1
NLC 40 % Dynasan <sup>®</sup> 118	272,9	0,369	-42,4
SLN Compritol <sup>®</sup> 888 ATO	261,3	0,362	-40,0
NLC 20 % Compritol <sup>®</sup> 888 ATO	236,9	0,356	-40,9
NLC 40 % Compritol <sup>®</sup> 888 ATO	225,6	0,298	-39,9
SLN glicerol monostearat	331,3	0,474	-36,8
NLC 20 % glicerol monostearat	249,9	0,429	-43,8
NLC 40 % glicerol monostearat	182,4	0,407	-41,5
SLN stearinska kislina	4760	1,0	-45,7
NLC 20 % stearinska kislina	625,1	0,826	-46,0
NLC 40 % stearinske kislina	359,3	0,747	-40,4
SLN cetilpalmitat	383,8	0,427	-40,7

NLC 20 % cetilpalmitat	323,3	0,403	-39,7
NLC 40 % cetilpalmitat	363,2	0,472	-40,9
nanoemulzija	210,7	0,260	-43,5

Rezultati v preglednici III prikazujejo povprečni premer, PDI in ZP nanostruktur. Povprečni premer nanostruktur je pri večini lipidov med 180 nm in 420 nm, le pri stearinski kislini so delci večji. Polidisperzni indeks se je običajno gibal med 0,2 in 0,6, odstopal je le pri stearinski kislini. Absolutna vrednost zeta potenciala vseh izdelanih nanosistemov je bila višja od 30 mV, kar je nakazovalo na njihovo fizikalno stabilnost. Povprečni premer, PDI in ZP so ustrezali zahtevam za nanosisteme. Po pričakovanjih sta bila tako povprečni premer kot tudi PDI najnižja v primeru nanoemulzije, ki je vsebovala le tekoč lipid.

Prisotnost tekočega lipida v nanosistemu vpliva na povprečni premer in PDI nanostruktur. V primeru štirih lipidov od skupno petih se povprečni premer nanostruktur zmanjšuje od trdnih lipidnih nanodelcev preko NLC 20 % do NLC 40 %. Največji nanodelci so pri SLN iz posameznega lipida. Večji je odstotek tekočega lipida v nanostrukturah, manjši so delci. Tudi PDI se v štirih primerih zmanjšuje od SLN preko NLC 20 % do NLC 40 %. Tekoč lipid torej zmanjša velikost nanostruktur in jih poenoti v velikosti.

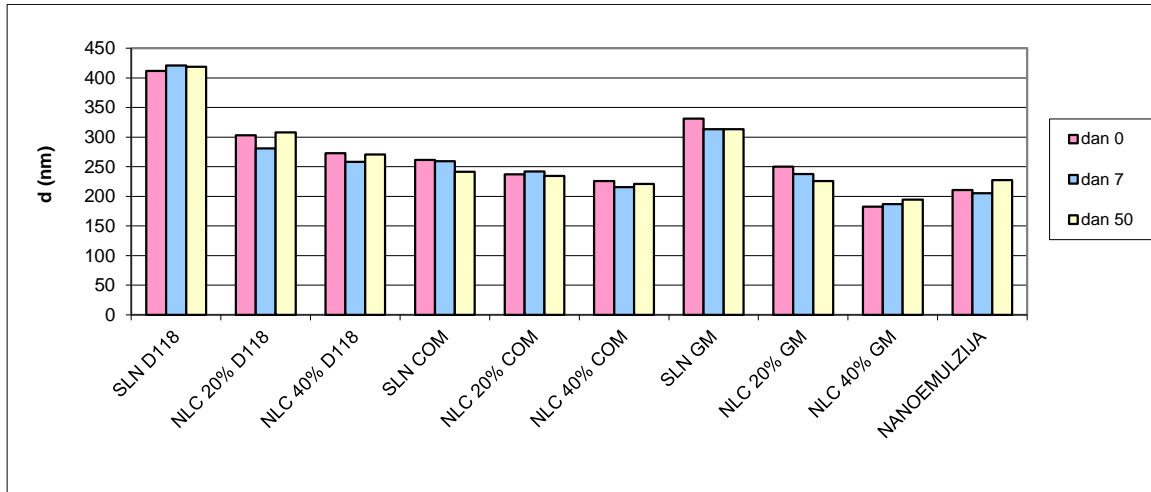
Pri izbiri primernih lipidov za izdelavo nanostruktur za vrednotenje vpliva na TEWL in hidratacijo kože smo ocenjevali tudi sprejemljivost izgleda. Disperzije s stearinsko kislino so bile po izdelavi sive barve s kovinskim leskom. Tak izgled ni primeren za vgradnjo v KI, zato smo jih izločili iz izbora. Pri disperzijah iz cetilpalmitata se je po tednu dni na površini pojavila bela mrena, zato tudi ti niso bili primerni za nadaljnjo uporabo. To ni bilo v skladu z našimi pričakovanji, saj smo pričakovali, da bodo nanodelci iz cetilpalmitata primerni za testiranje, saj so večkrat omenjeni v literaturi. (9,12,13)

#### **4.2. Vrednotenje fizikalne stabilnosti nanosistemov**

Predpogoj za izdelavo fizikalno stabilnih hidrogelov z vgrajenimi disperzijami nanosistemov je izbira primernih lipidov in iz njih izdelanih disperzij nanosistemov. Izbira primernih lipidov je opisana pod točko 4.1. Iz izbranih lipidov smo izdelali disperzije SLN, NLC 20 % in NLC 40 % ter jih pustili na sobni temperaturi 50 dni. Ob določenih časovnih

točkah smo vrednotili povprečni premer, PDI in ZP ter s tem spremljali fizikalno stabilnost disperzij.

#### 4.2.1. Vpliv staranja na velikost nanostruktur



Slika 6: Vpliv vrste lipida na povprečni premer nanostruktur (d) in časovna odvisnost povprečnega premera nanostruktur (d) v disperzijah. n=3

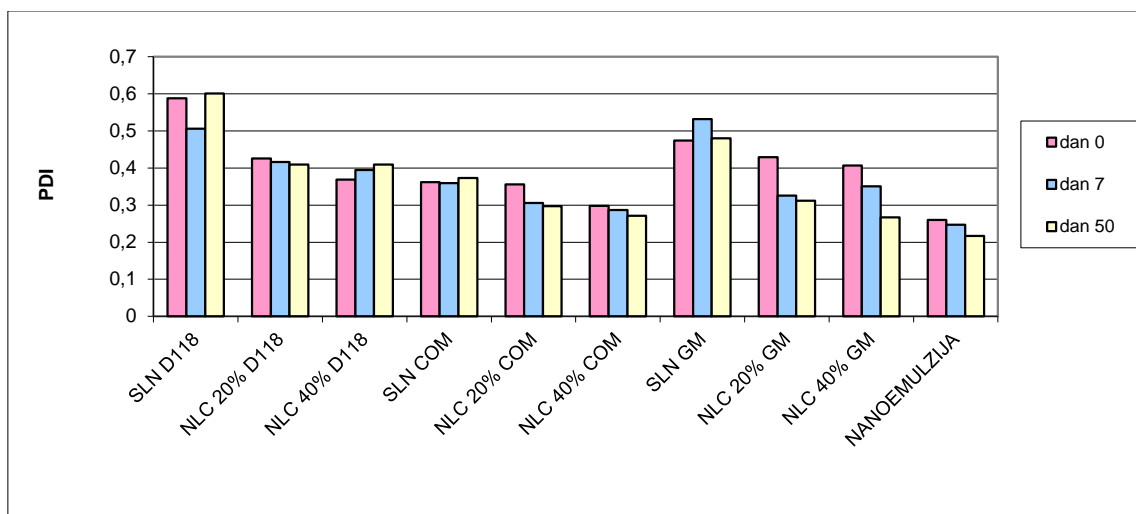
Slika 6 prikazuje, da so največji nanodelci nastali iz Dynasana<sup>®</sup> 118. Velikost delcev v disperzijah Dynasana je bila običajno za približno 100 nm večja v primerjavi z disperzijami Compritola in glicerol monostearata.

Povprečni premer nanostruktur je bil pri večini vzorcev po tednu dni in 50 dneh primerljiv s povprečnim premerom delcev na dan izdelave. To dokazuje fizikalno stabilnost izdelanih disperzij, saj s časom ni prišlo do povečanja ali razpada nanostruktur.

Pri vseh vrstah lipidov je povprečni premer večji pri trdnih lipidnih nanodelcih kot pri nanostrukturiranih lipidnih sistemih. Razlika med NLC 20 % in NLC 40 % ni bistvena.



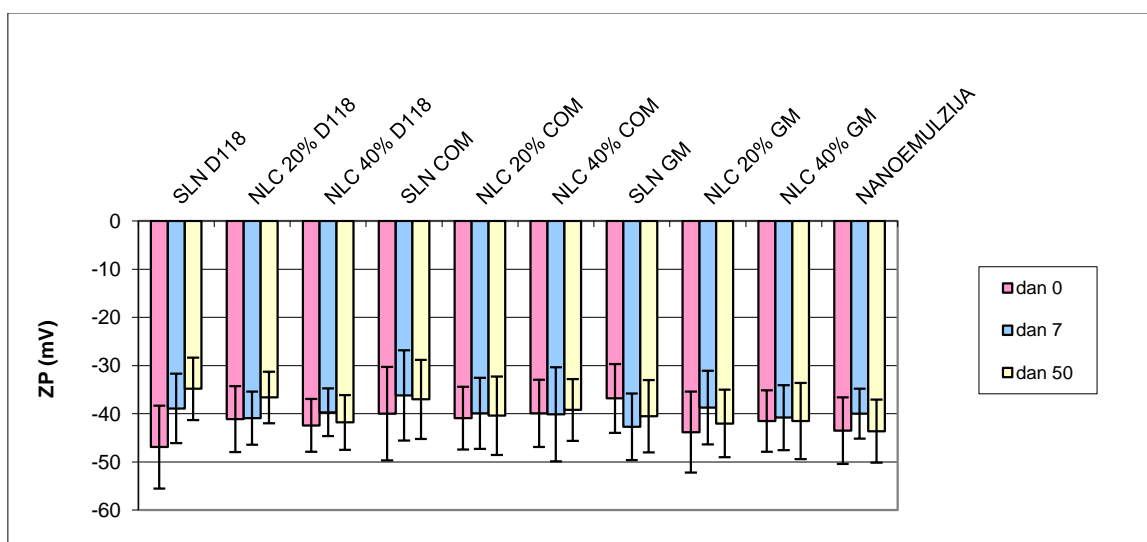
#### 4.2.2. Vpliv staranja na PDI nanostruktur



Slika 7: Vpliv vrste lipida na PDI in časovna odvisnost PDI v nanosistemih. n=3

Na sliki 7 je prikazan vpliv vrste lipida in vrste disperzije na polidisperzni indeks ter časovna odvisnost PDI. Opazimo lahko, da je bil najnižji PDI pri nanoemulziji, ki sestoji samo iz tekočega lipida. Med disperzijami SLN je imela najnižji PDI disperzija iz Compritola, najvišji PDI pa disperzija iz Dynasana<sup>®</sup> 118. Disperzije SLN so imele višji PDI kot disperzije NLC. Polidisperzni indeksi se med disperzijami NLC iz istega lipida, a z drugačno vsebnostjo tekočega lipida niso bistveno razlikovali.

#### 4.2.3. Vpliv staranja na ZP nanostruktur



Slika 8: Vpliv vrste lipida na zeta potencial in časovna odvisnost ZP v nanosistemih. n=3

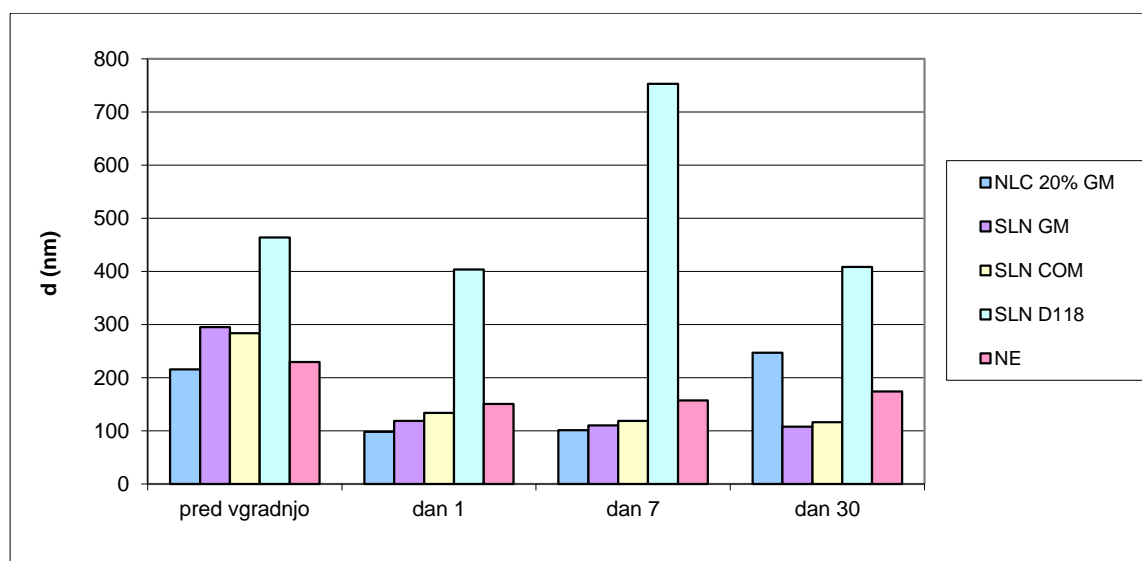
Zeta potencial vseh izdelanih disperzij je bil nižji od -30 mV, kar pomeni, da so disperzije fizikalno stabilne. Negativni zeta potencial je posledica anionskega značaja komponent Phospholipona® 80H, ki ima vlogo stabilizatorja. Najvišjo absolutno vrednost zeta potenciala ob izdelavi je imela disperzija SLN Dynasan® 118, najnižjo pa SLN glicerol monostearat.

S časom se ZP ni veliko spreminjal, tudi po 50 dneh je pri vseh disperzijah ostal nižji od -30 mV. Največja sprememba ZP je bila pri disperziji SLN Dynasan® 118.

Na podlagi izmerjenih povprečnih premerov nanostruktur, polidisperznih indeksov in zeta potencialov smo se odločili za izdelavo hidrogelov z vgrajenimi disperzijami SLN Dynasan® 118, SLN Compritol®, SLN glicerol monostearat, NLC 20 % glicerol monostearat in z nanoemulzijo.

### 4.3. Vrednotenje nanosistemov po vgradnji v hidrogel

#### 4.3.1. Povprečni premer nanostruktur po vgradnji v hidrogel



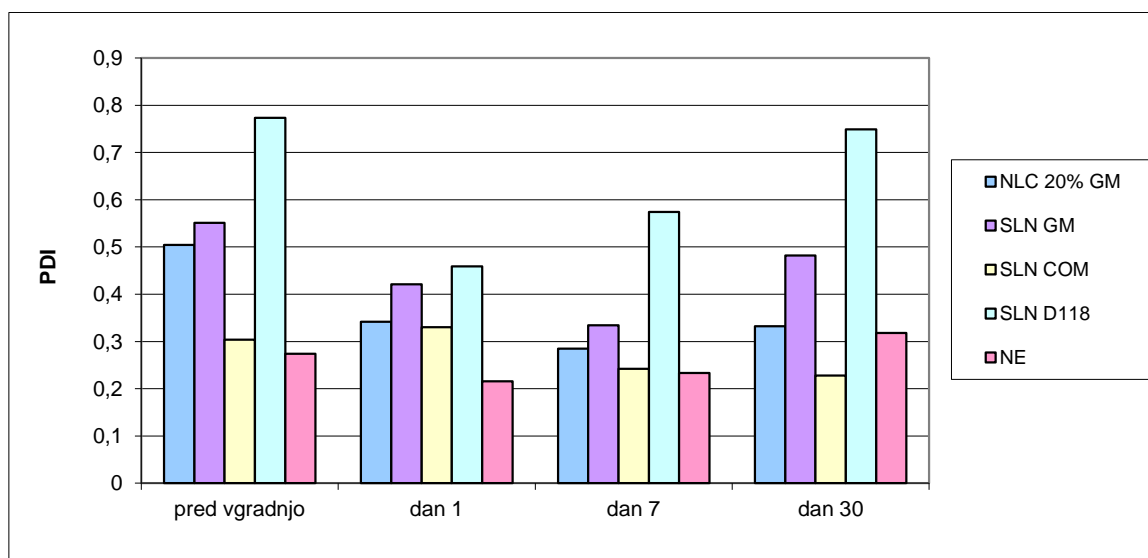
Slika 9: Povprečni premer nanostruktur pred in po vgradnji disperzij v hidrogel in časovna odvisnost. n=1

Rezultati na sliki 9 kažejo, da se povprečni premer nanostruktur pred in po vgradnji disperzij v hidrogel razlikuje. Po vgradnji v hidrogel se je povprečni premer zmanjšal, kar je verjetno posledica interakcij med sestavinami formulacije. Zmanjšanje velikosti je v skladu z raziskavami raziskovalne skupine Souta in sod. (8), vendar so bile v našem

primeru razlike večje. Povprečni premer nanostruktur se je največ zmanjšal po vgradnji disperzij SLN glicerol monostearat v hidrogel (za 177 nm), najmanj pa po vgradnji disperzije SLN Dynasan® 118 v hidrogel (za 60 nm).

S shranjevanjem hidrogelov v hladilniku smo želeli preprečiti mikrobiološko kontaminacijo izdelkov, saj smo meritve izvajali tudi po 7 in 30 dneh. Slika 9 prikazuje vpliv časa shranjevanja hidrogelov na povprečni premer nanostruktur. Pri hidrogelih s SLN glicerol monostearat, SLN Compritol® in nanoemulzijo se velikosti nanostruktur bistveno niso spremenile. Pri hidrogelu s SLN Dynasan® 118 pa se je po 7 dneh velikost delcev nepričakovano močno povečala, vendar je bila po 30 dneh spet enaka kot na dan izdelave. Vzrok za tako veliko spremembo v povprečnem premeru delcev po 7 dneh je najverjetneje nehomogenost disperzije, kar pomeni, da so se v merilnem območju pojavili sicer redki izkristalizirani skupki lipidov. Pri hidrogelu z NLC 20 % glicerol monostearatom se je po 30 dneh povprečni premer delcev zvišal za približno 150 nm.

#### 4.3.2. Polidisperzni indeks nanostruktur po vgradnji v hidrogel

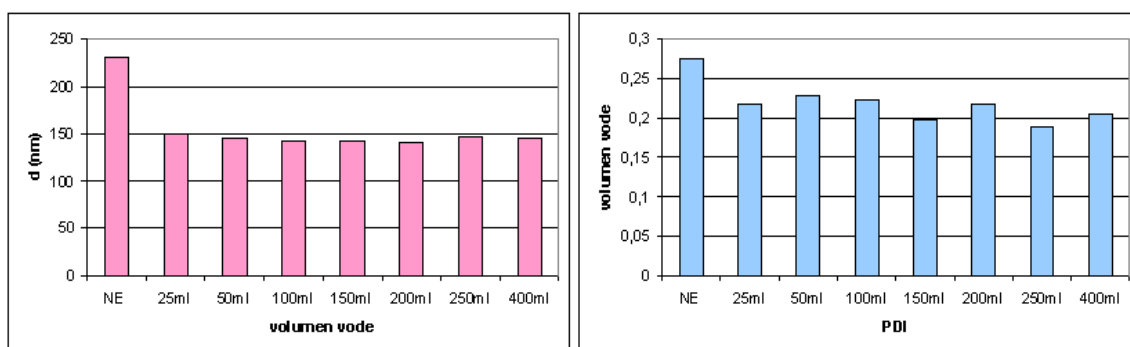


Slika 10: Polidisperzni indeks pred in po vgradnji nanostruktur v hidrogel in časovna odvisnost. n=1

Po vgradnji disperzij nanostruktur v hidrogel se je PDI znižal, le pri hidrogelu s SLN Compritol® je ostal enak. Med shranjevanjem vzorcev so se vrednosti PDI nekoliko spreminjale, vendar so v večini primerov ostale manjše od 0,5. Izjema je le vzorec SLN D118, kjer je bila vrednost PDI po 30 dneh 0,75. (slika 10)

Souto in sod. so dokazali, da se velikost in PDI po vgradnji v hidrogel iz HEC s časom shranjevanja znižujeta. (8) Ker je bilo zmanjšanje velikosti in PDI po vgradnji v hidrogel večje kot v primeru predhodnih raziskav, smo izvedli poskus razredčevanja hidrogela z vodo in ugotavljanja vpliva redčenja na rezultate meritev.

Izdelali smo hidrogel z vgrajeno nanoemulzijo ter ugotavljali vpliv redčenja na rezultate meritev velikosti. Hidrogelu z nanoemulzijo smo po redčenju v 50 ml, 100 ml, 150 ml, 200 ml, 250 ml in 400 ml vode izmerili povprečni premer kapljic in PDI. Rezultate smo primerjali s premerom in PDI izdelane nanoemulzije.

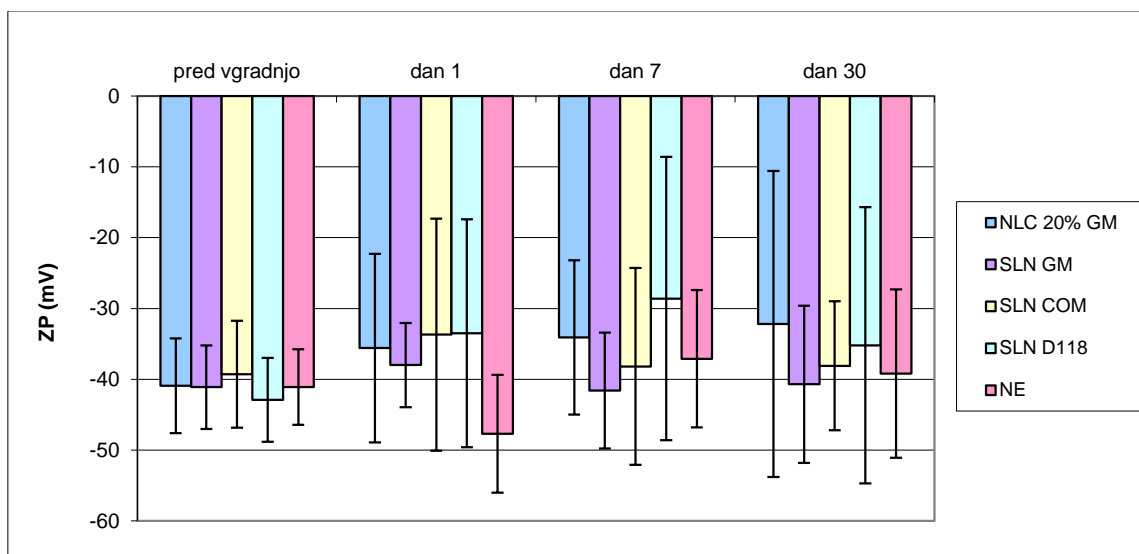


Slika 11: Vpliv redčenja hidrogela z vgrajeno nanoemulzijo (volumen dodane vode) na povprečni premer kapljic (d) (levo) in polidisperzni indeks (desno). n=1

Na sliki 11 vidimo, da je velikost kapljic v nanoemulziji po izdelavi za 80 nm večja kot po vgradnji v hidrogel in redčenju v vodi. Tudi PDI se je nekoliko zmanjšal. Hidrogel ima poltrdno konsistenco, kar onemogoča direktno merjenje velikosti nanostruktur in PDI, zato je potrebno redčenje v vodi, vse dokler ne dosežemo viskoznosti vode, saj sta izmerjena velikost in PDI odvisna od viskoznosti vzorca. Viskoznost vpliva na hitrost gibanja delcev, saj meritve temeljijo na Brownovem gibanju. (6,8) Na podlagi rezultatov lahko ugotovimo, da je zadostno že redčenje s 25 ml vode, nadaljnje redčenje namreč ne vpliva na rezultate velikosti in PDI.

S poskusom smo dokazali, da se velikost in PDI zmanjšata po vgradnji nanoemulzije v hidrogel, kar so dokazali že Souto in sod. (8). Njihovi in naši rezultati so primerljivi, saj smo disperzije nanodelcev vgradili v hidrokele iz HEC 4000, kar je opisano tudi v članku.

### 4.3.3. Zeta potencial nanostruktur po vgradnji v hidrogel



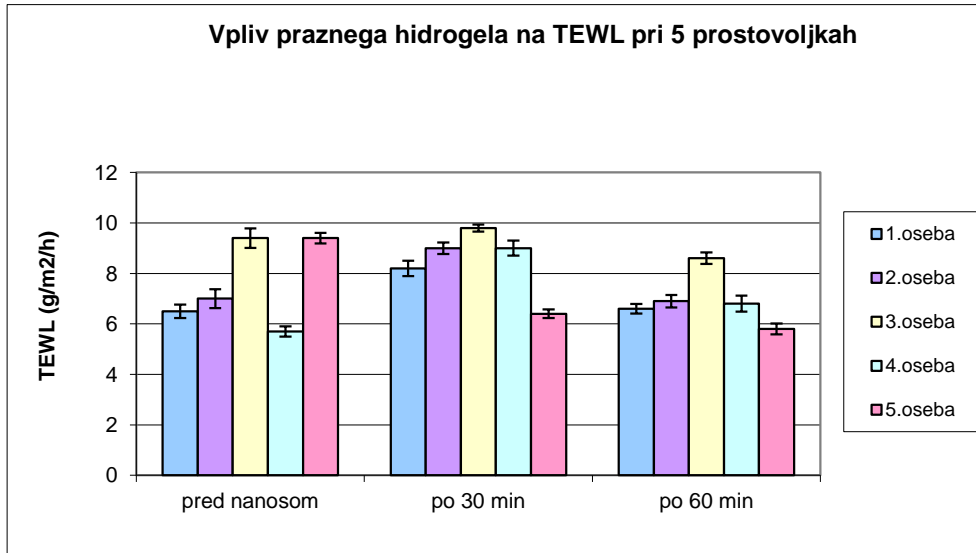
Slika 12: Zeta potencial pred in po vgradnji nanostruktur v hidrogel in časovna odvisnost. n=1

Po vgradnji nanodisperzij v hidrogel je zeta potencial ostal negativen, v vseh primerih nižji od -30 mV, kar pomeni, da so bili hidrogeli fizikalno stabilni. V vseh primerih, z izjemo hidrogela z nanoemulzijo, se je absolutna vrednost ZP znižala glede na vrednosti pred vgradnjo. (slika 12)

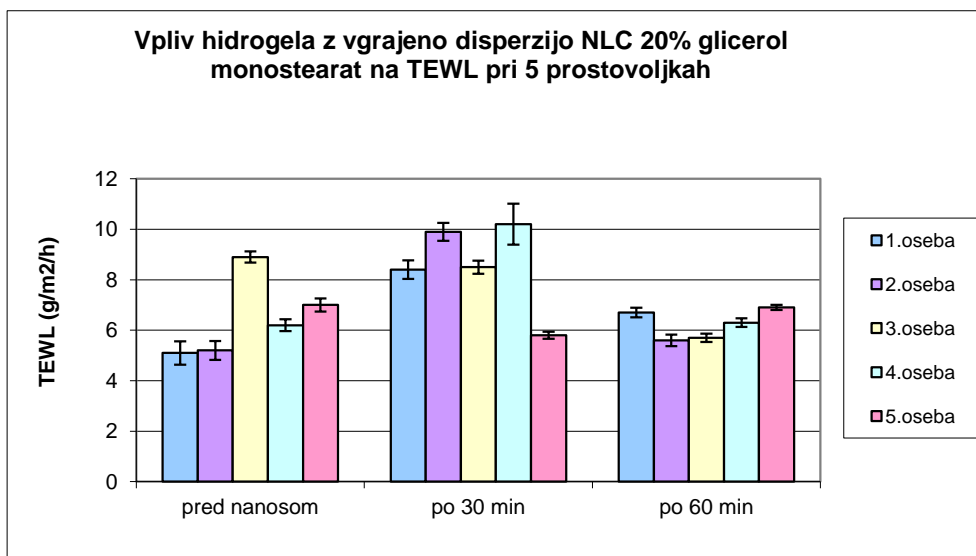
V času shranjevanja hidrogelov ni prišlo do bistvenih sprememb v vrednostih ZP, so pa izmerjene vrednosti zelo nihale. (slika 12)

#### 4.4. Vpliv vrste lipidov v nanosistemih vgrajenih v hidrogel na TEWL

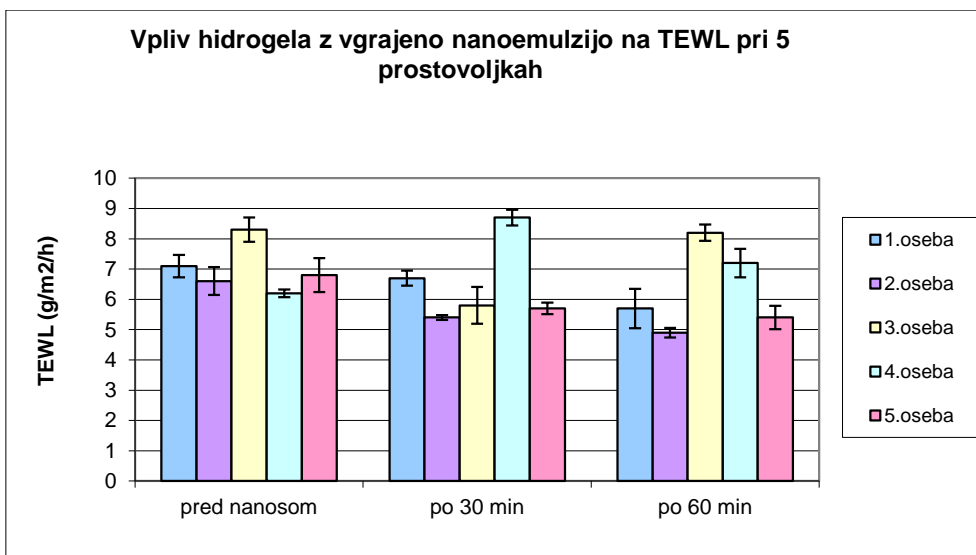
##### 4.4.1. Vpliv praznega hidrogela in hidrogelov z vgrajenimi disperzijami nanosistemov na TEWL pri 5 prostovoljkih



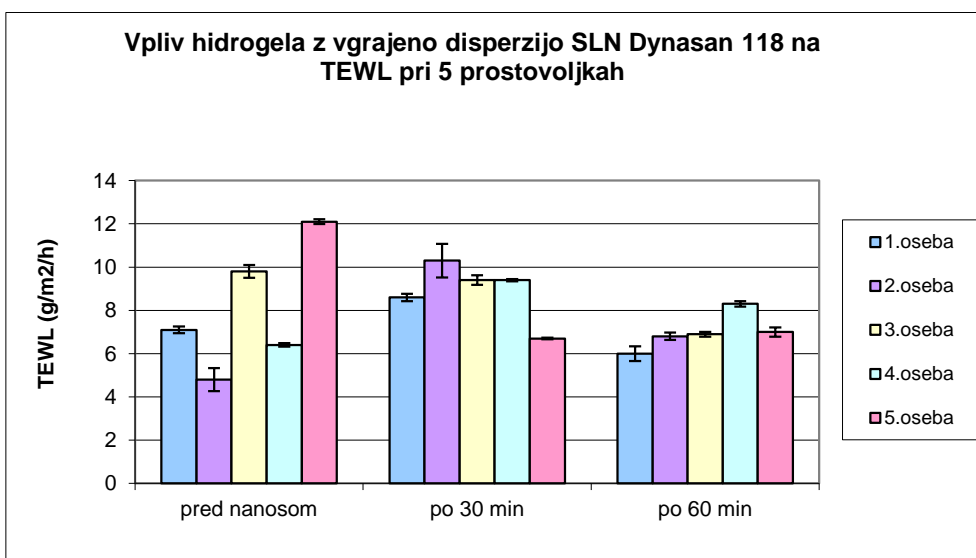
Slika 13: Vpliv praznega hidrogela na TEWL pri 5 prostovoljkih in časovna odvisnost.



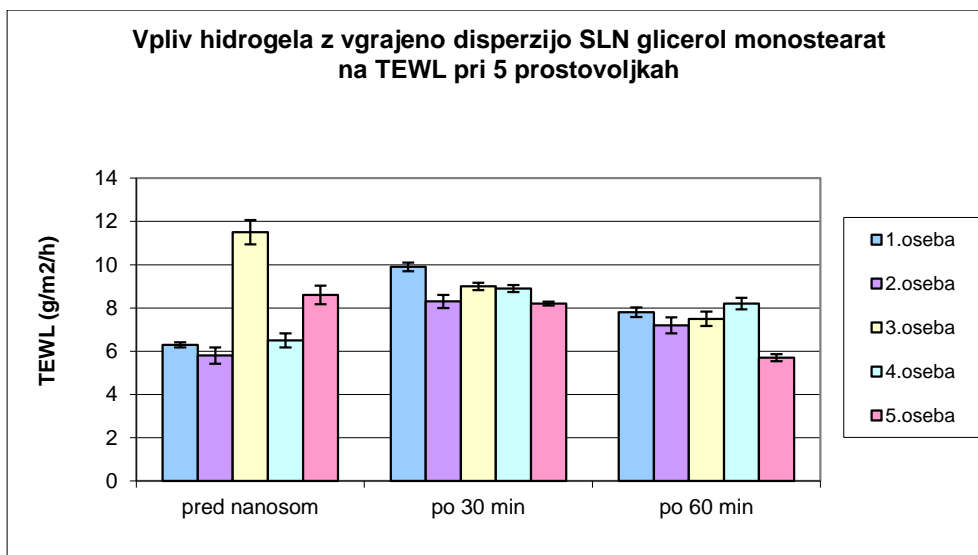
Slika 14: Vpliv hidrogela z vgrajeno disperzijo NLC 20% glicerol monostearat na TEWL pri 5 prostovoljkih in časovna odvisnost.



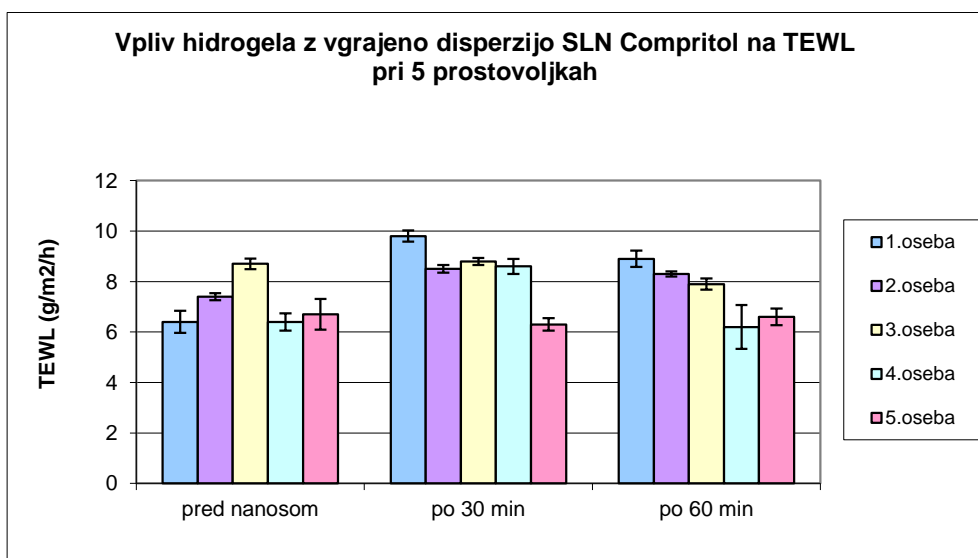
Slika 15: Vpliv hidrogela z vgrajeno nanoemulzijo na TEWL pri 5 prostovoljkih in časovna odvisnost.



Slika 16: Vpliv hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN Dynasan<sup>®</sup> 118 na TEWL pri 5 prostovoljkih in časovna odvisnost.



Slika 17: Vpliv hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN glicerol monostearat na TEWL pri 5 prostovoljkah in časovna odvisnost.



Slika 18: Vpliv hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN Compritol® na TEWL pri 5 prostovoljkah in časovna odvisnost.

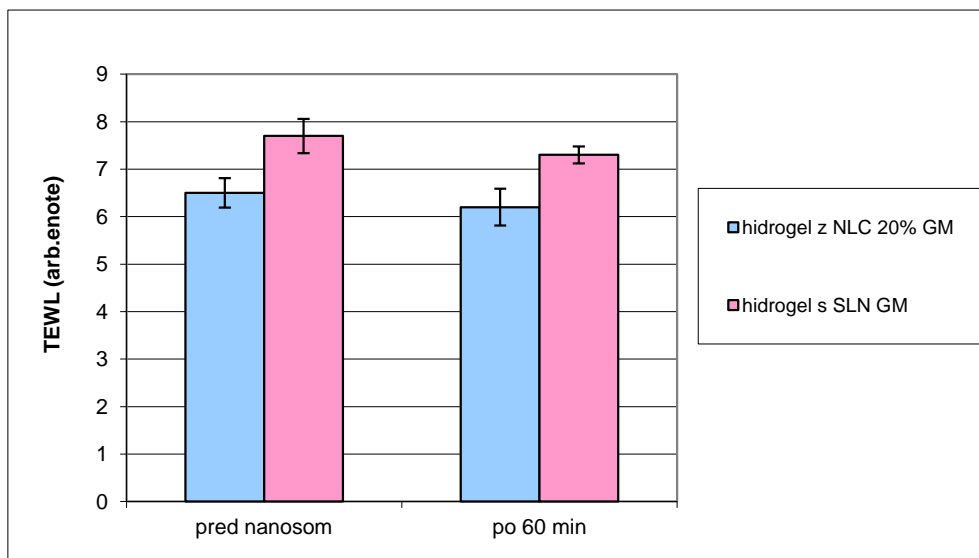
Na slikah od 13 do 18 je prikazan vpliv praznega hidrogela in hidrogelov z vgrajenimi različnimi nanostrukturami na transepidermalno izgubo vode pri 5 prostovoljkah. Predstavljena je primerjava med TEWL pred nanosom hidrogela, 30 minut po nanosu in 60 minut po nanosu za vsako prostovoljko. Variabilnost med posameznimi prostovoljkami je bila velika. Vrednosti TEWL pred nanosom hidrogelov so znašale od 4,8 do 12,1.

V primeru vseh hidrogelov se je pri posameznih prostovoljkah TEWL 30 minut po nanosu presenetljivo občutno povečal v primerjavi z vrednostmi pred nanosom. Le-to je lahko



posledica predhodne odstranitve gela s kože, kar je lahko kožo razdražilo. Po 60 minutah pa so v večini primerov vrednosti TEWL nižje glede na začetne vrednosti.

#### 4.4.2. Primerjava vpliva hidrogela z vgrajeno disperzijo NLC 20% glicerol monostearat in hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN glicerol monostearat na TEWL

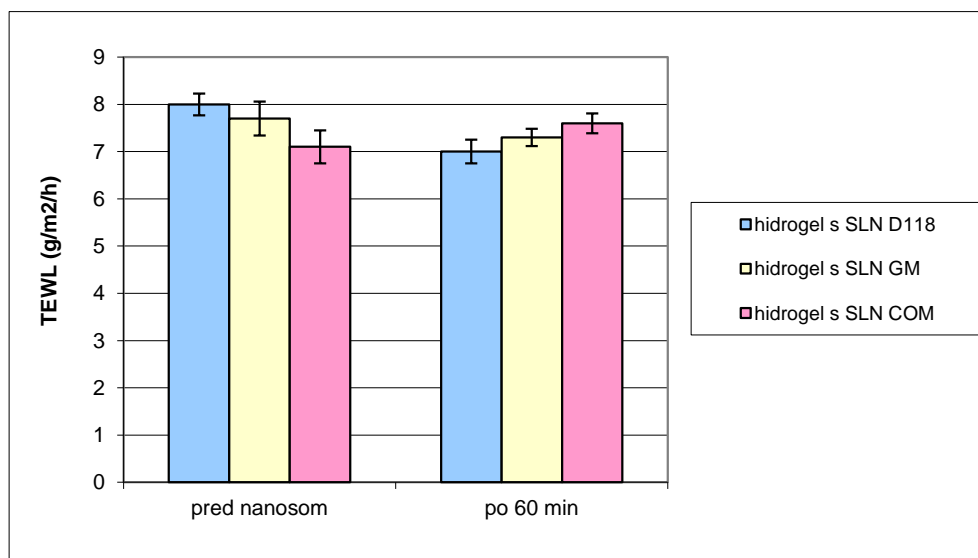


Slika 19: Vpliv hidrogela z vgrajeno disperzijo NLC 20 % glicerol monostearat in hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN glicerol monostearat na TEWL in časovna odvisnost.

Na sliki 19 je prikazana razlika med vplivom hidrogela z vgrajeno disperzijo NLC in hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN na TEWL. 60 minut po nanosu se je TEWL v obeh primerih zmanjšal za 5 %, torej v našem primeru ni bilo razlike med NLC in SLN.

Glede na ugotovitve raziskovalcev (14,16), da manjši delci na koži tvorijo bolj koherentno plast kot večji, smo pričakovali večje zmanjšanje TEWL po nanosu hidrogela z NLC kot po nanosu hidrogela s SLN. Nanodelci v hidrogelu z vgrajeno disperzijo NLC so imeli povprečni premer 99 nm, v hidrogelu z vgrajeno disperzijo SLN pa 119 nm. Pričakovali smo, da bo imela disperzija NLC boljši okluzivni učinek, ki se bo kazal v večjem zmanjšanju TEWL v primerjavi z disperzijo SLN. V naši klinični študiji tega nismo dokazali, vzrok pa je lahko bil v premajhnem številu prostovoljk in prekratnem času študije.

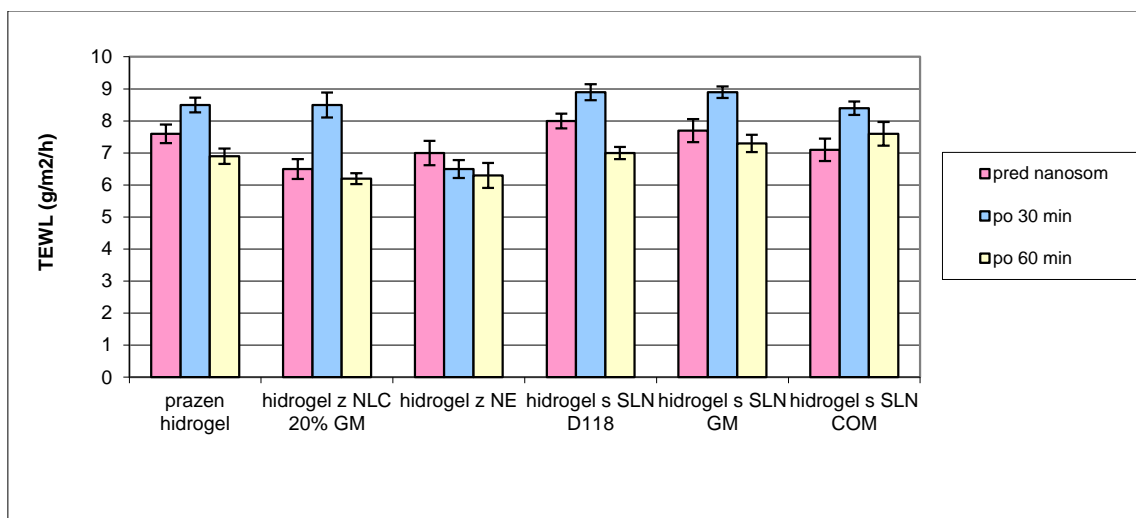
#### 4.4.3. Primerjava vpliva hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN Dynasan<sup>®</sup> 118, hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN Compritol<sup>®</sup> in hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN glicerol monostearat na TEWL



Slika 20: Vpliv hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN Dynasan<sup>®</sup> 118, hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN Compritol<sup>®</sup> in hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN glicerol monostearat na TEWL in časovna odvisnost.

Na sliki 20 je prikazan vpliv hidrogelov z vgrajenimi disperzijami trdnih lipidnih nanodelcev iz različnih vrst lipidov na TEWL. 60 minut po aplikaciji hidrogelov z disperzijo SLN Dynasan<sup>®</sup> 118 in disperzijo SLN glicerol monostearat se je TEWL zmanjšal (pri Dynasanu za 13 %, pri glicerol monostearatu za 5 %), po nanosu hidrogela z disperzijo SLN Compritol<sup>®</sup> pa se je TEWL povečal za 7 %. V vseh primerih so razlike zelo majhne, zato ne moremo trditi, da vrsta lipida v SLN vpliva na zmanjšanje transepidermalne izgube vode. Tudi v literaturi (16) je dokazano le okluzivno delovanje SLN in s tem zmanjšanje TEWL, ni pa dokazov o vplivu vrste lipida na TEWL.

#### 4.4.4. Vpliv vrste lipida v nanosistemih na TEWL



Slika 21: Vpliv vrste lipida v nanosistemih na transepidermalno izgubo vode in časovna odvisnost TEWL.

Na sliki 21 je predstavljen vpliv vrste lipidov v nanosistemih vgrajenih v hidrogel na transepidermalno izgubo vode in časovna odvisnost. Rezultati meritev TEWL po 30 minutah so presenetljivi, saj smo pričakovali, da se bo TEWL po nanosu hidrogelov zmanjšal, a se je le ta povečal. Pričakovali smo trend zniževanja TEWL, kot je le-ta pri hidrogelu z nanoemulzijo. Takšni rezultati bi bili namreč v skladu z ugotovitvami raziskovalnih skupin na področju okluzivnega delovanja nanodelcev in posledično vpliva na TEWL. (6,14)

Vrednosti TEWL 30 minut po nanosu hidrogelov so občutno nad vrednostmi TEWL pred nanosom hidrogelov. Vzrok za to je bila verjetno količina nanesenih hidrogelov. 30 minut po nanosu se količina nanesenega hidrogela še ni v celoti vpila v kožo. Preostanek hidrogela smo morali pred meritvami odstraniti, saj bi v nasprotnem primeru merili izhlapevanje vode iz hidrogela in ne transepidermalne izgube vode. Vzrok za višji TEWL pa je lahko tudi razdraženost kože, saj smo z odstranjevanjem hidrogela najverjetneje rahlo poškodovali del rožene plasti.

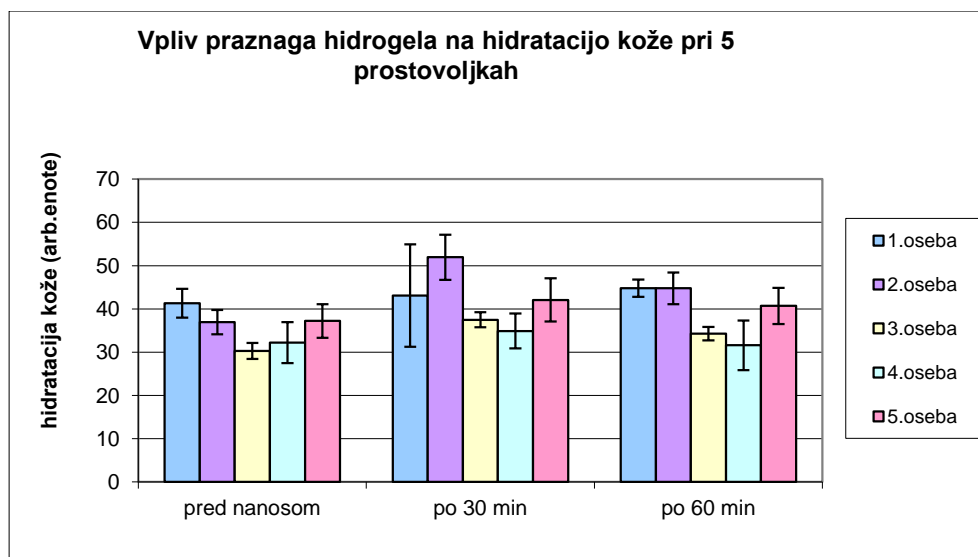
Rezultati meritev TEWL, ki smo jih dobili 60 minut po nanosu hidrogelov, so bili v skladu s predhodnimi ugotovitvami raziskovalcev (6,14), saj je bila transepidermalna izguba vode nižja kot pred nanosom hidrogelov. To dokazuje, da imajo disperzije nanodelcev in nanoemulzije okluziven učinek in posledično učinkujejo na zmanjšanje TEWL.

Le pri hidrogelu z vgrajeno disperzijo SLN Compritol<sup>®</sup> je bila meritev po 60 minutah v povprečju višja kot pred nanosom hidrogela (za 7 %). Vzrok je lahko slaba odstranitev preostanka hidrogela s kože posamezne prostovoljke. (slika 21)

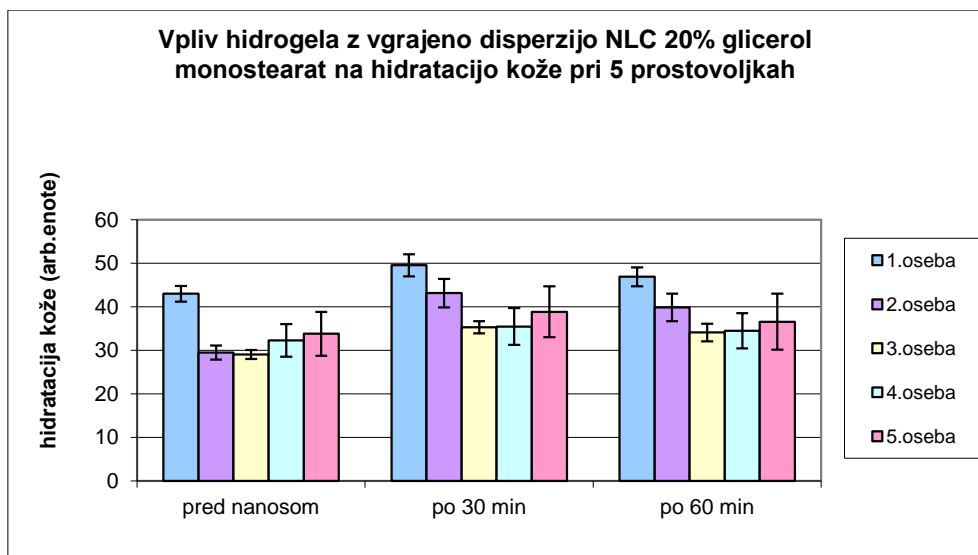
60 minut po nanosu je do največjega znižanja TEWL prišlo po nanosu hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN Dynasan<sup>®</sup> 118 (za 13 %). TEWL se je po 60 minutah najmanj zmanjšal po aplikaciji hidrogela z disperzijo NLC 20 % glicerol monostearat (za 4,6 %). (slika 21)

#### 4.5. Vpliv vrste lipidov v nanosistemi vgrajeni v hidrokele na hidracijo kože

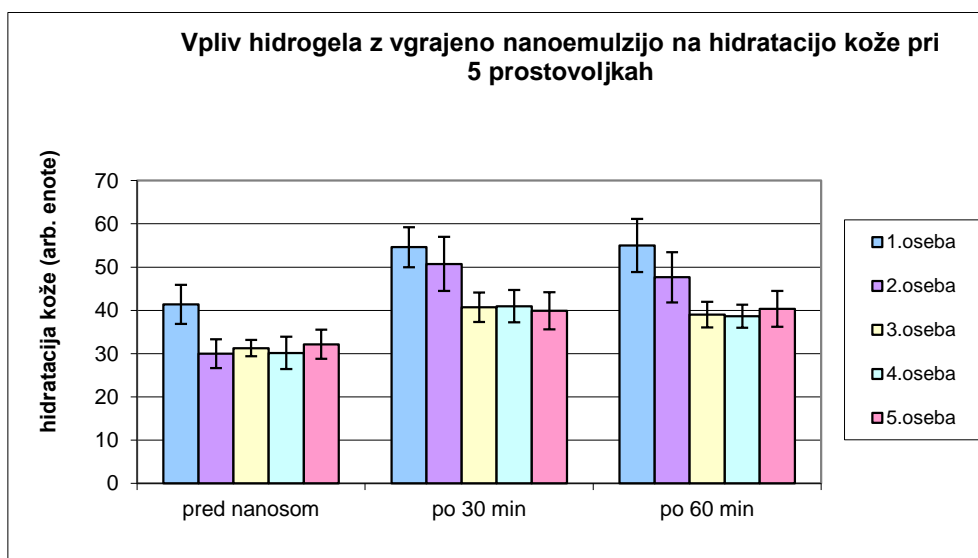
##### 4.5.1. Vpliv praznega hidrogela in hidrogelov z vgrajenimi disperzijami nanosistemov na hidracijo kože pri 5 prostovoljkah



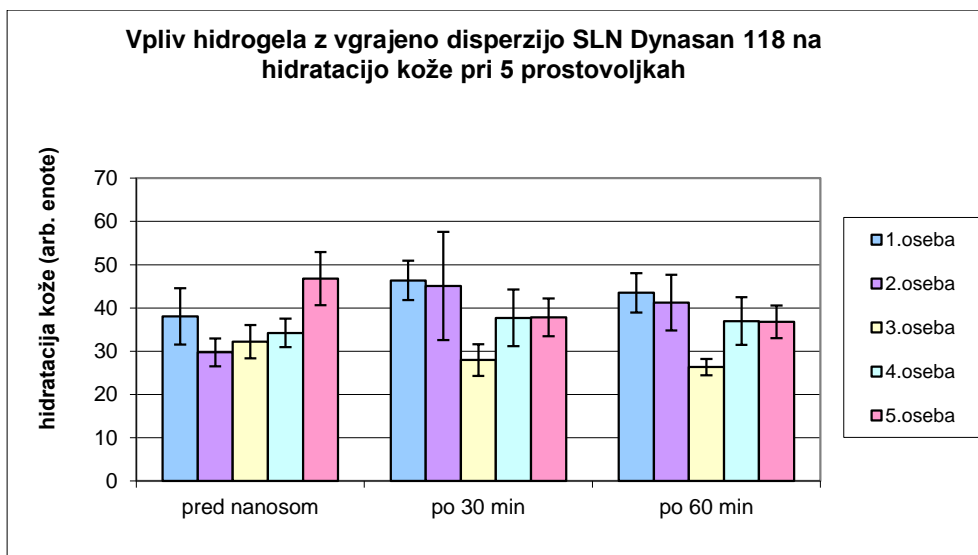
Slika 22: Vpliv praznega hidrogela na hidracijo kože pri 5 prostovoljkah in časovna odvisnost.



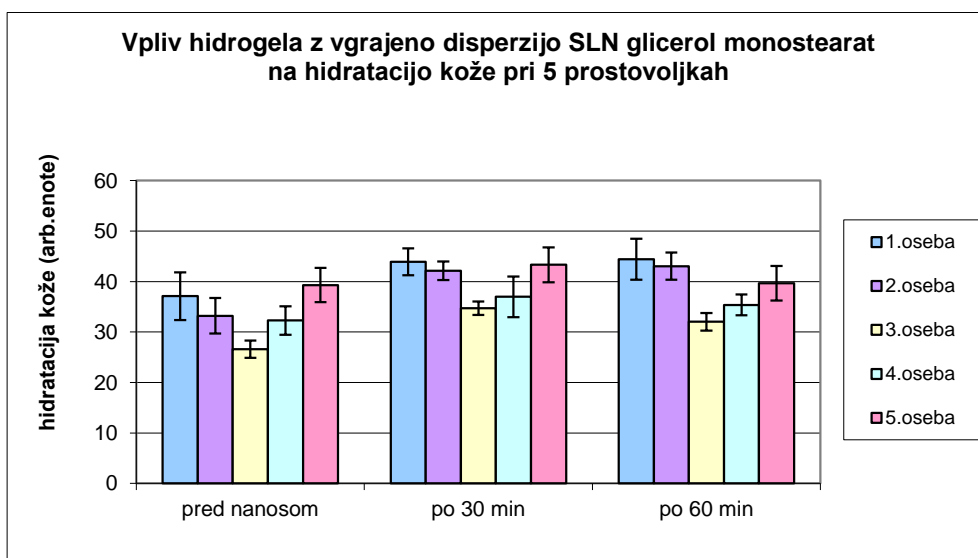
Slika 23: Vpliv hidrogela z vgrajeno disperzijo NLC 20 % glicerol monostearat na hidracijo kože pri 5 prostovoljkih in časovna odvisnost.



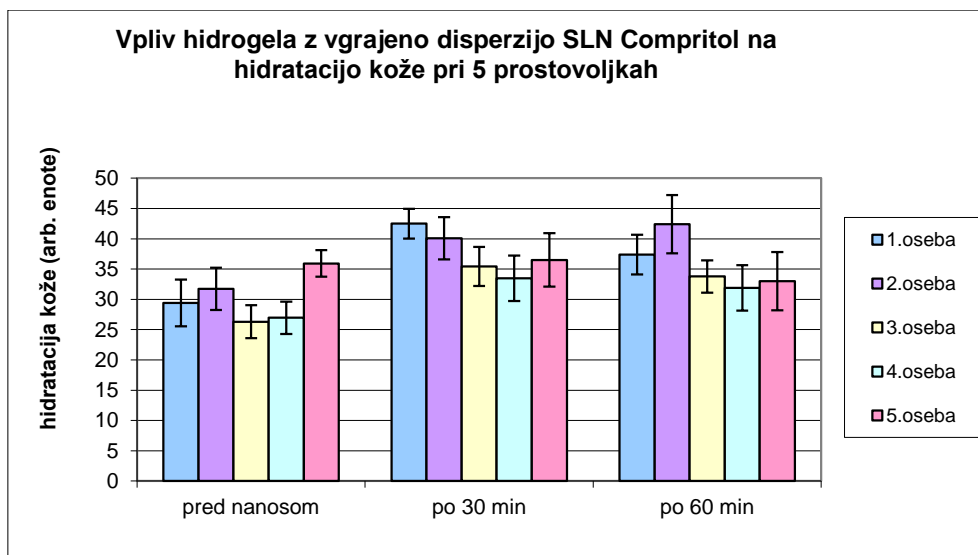
Slika 24: Vpliv hidrogela z vgrajeno nanoemulzijo na hidracijo kože pri 5 prostovoljkih in časovna odvisnost.



Slika 25: Vpliv hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN Dynasan<sup>®</sup> 118 na hidratacijo kože pri 5 prostovoljkih in časovna odvisnost.



Slika 26: Vpliv hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN glicerol monostearat na hidratacijo kože pri 5 prostovoljkih in časovna odvisnost.



Slika 27: Vpliv hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN Compritol<sup>®</sup> na hidratacijo kože pri 5 prostovoljkah in časovna odvisnost.

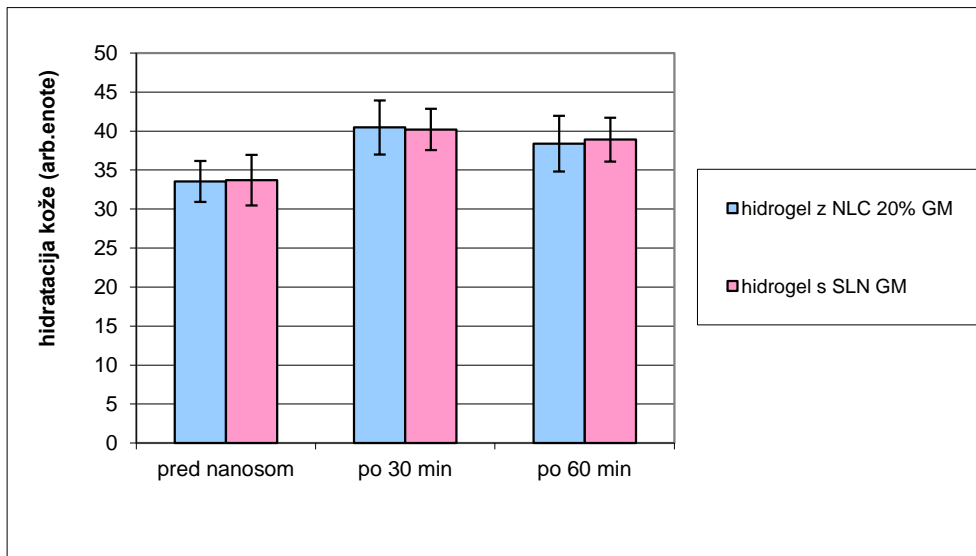
Na slikah od 22 do 27 je prikazan vpliv praznega hidrogela in hidrogelov z vgrajenimi nanosistemi na hidratacijo kože za posamezno prostovoljko. Variabilnost med posameznimi prostovoljkami je bila velika. Vrednosti hidratacije kože pred nanosom hidrogelov so znašale od 32,17 do 46,81.

Presenetljivo dobro je na hidratacijo kože učinkoval prazen hidrogel in sicer že po 30 minutni aplikaciji. Hidratacija kože se je pri posamezni prostovoljki zvišala za od 4 % do 41 % glede na začetne vrednosti. Pri večini oseb je bila hidratacija kože povečana tudi še po 60 minutah. To nakazuje na vlažilno delovanje že samega hidrogela, brez vgrajenih aktivnih učinkovin oziroma nanodelcev. (slika 22)

Na sliki 24 je prikazan vpliv hidrogela z vgrajeno nanoemulzijo na hidratacijo kože, ki se je pri vseh prostovoljkah po aplikaciji občutno izboljšala. 30 minut po aplikaciji se je hidratacija zvišala za od 24 % do 69 %. Tudi 60 minut po aplikaciji je bila hidratacija še vedno občutno višja (od 25 % do 59 %) kot pred aplikacijo hidrogelov in primerljiva s tisto po 30 minutah. S tem smo dokazali dobro okluzivno delovanje nanoemulzij in njihovo učinkovito zviševanje hidratacije kože.

Na slikah 22-27 vidimo, da se je hidratacija kože izboljšala po 30 minutni aplikaciji posameznega hidrogela z nanodelci pri večini prostovoljk. Tudi 60 minut po nanosu je bila hidratacija v večini primerov višja od hidratacije pred nanosom.

#### 4.5.2. Primerjava vpliva hidrogela z vgrajeno disperzijo NLC 20% glicerol monostearat in hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN glicerol monostearat na hidratacijo kože



Slika 28: Primerjava vpliva hidrogela z vgrajeno disperzijo NLC 20 % glicerol monostearat in hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN glicerol monostearat na hidratacijo kože in časovna odvisnost.

Na sliki 28 je prikazana primerjava med vplivom hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN in hidrogelom z vgrajeno disperzijo NLC na hidratacijo kože in časovna odvisnost. Razlike med hidrogeloma praktično ni. 30 minut po nanosu se je hidratacija kože v obeh primerih zvišala. Po nanosu hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN se je zvišala za 19 %, po nanosu hidrogela z vgrajeno disperzijo NLC pa se je hidratacija zvišala za 21 % glede na vrednosti pred nanosom. 60 minut po aplikaciji obeh hidrogelov se je hidratacija kože v obeh primerih zvišala za 15 % glede na začetno hidratacijo kože. Zaradi velike variabilnosti rezultatov, ne moremo trditi, da vrsta nanosistema vpliva na hidratacijo kože.

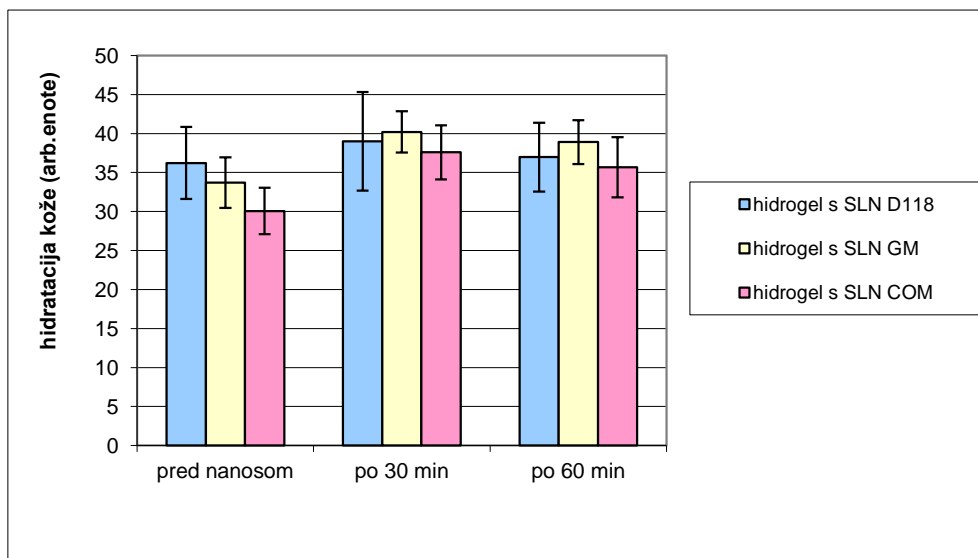
Z našo klinično študijo nismo dokazali razlike med vplivom SLN in NLC na hidratacijo kože. Pričakovali smo občutno zvišanje hidratacije kože po nanosu formulacije z vgrajeno disperzijo NLC, kot so to dokazali J. Pardeike in sod. (9)

Zaradi občutno manjše velikosti nanodelcev v disperziji NLC smo pričakovali boljši vpliv na zvišanje hidratacije kože po aplikaciji hidrogela z NLC. Manjši delci tvorijo koherentnejši film na koži, posledica česar je boljše okluzivno delovanje in zato boljši vpliv na hidratacijo kože. (6) Naši rezultati se ne ujemajo s predhodnimi ugotovitvami



raziskovalcev, kar je najverjetneje posledica premajhnega števila prostovoljcev in prekratkega časa poteka klinične študije.

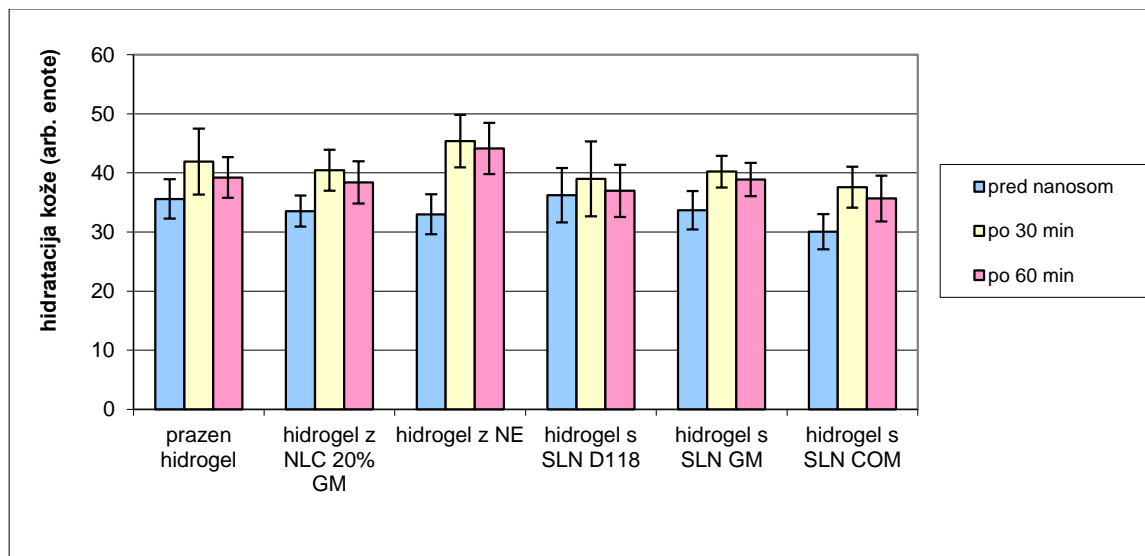
#### 4.5.3. Primerjava vpliva hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN Dynasan<sup>®</sup> 118, hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN Compritol<sup>®</sup> in hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN glicerol monostearat na hidratacijo kože



Slika 29: Primerjava vpliva hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN Dynasan<sup>®</sup> 118, hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN Compritol<sup>®</sup> in hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN glicerol monostearat na hidratacijo kože in časovna odvisnost.

Na sliki 29 je prikazana primerjava vplivov hidrogelov z vgrajenimi SLN iz različnih vrst lipidov na hidratacijo kože in časovna odvisnost. 30 minut po nanosu se je hidratacija kože v vseh primerih zvišala, največ v primeru hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN Compritol<sup>®</sup> (za 25 % glede na začetne vrednosti), najmanj pa v primeru hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN Dynasan<sup>®</sup> 118 (za 8 %). Tudi po 60 minutah je bila hidratacija višja glede na vrednosti pred nanosom hidrogelov, vendar se je v primerjavi s hidratacijo kože po 30 minutni aplikaciji znižala. Kljub rezultatom klinične študije, ki kažejo na boljši vpliv posameznega lipida na hidratacijo kože, zaradi velike variabilnosti rezultatov ne moremo trditi, da vrsta lipida v SLN vpliva na hidratacijo.

#### 4.5.4. Vpliv vrste lipida v nanosistemih na hidratacijo kože



Slika 30: Vpliv vrste lipidov v nanosistemih vgrajenih v hidrogel na hidratacijo kože.

Na sliki 30 je prikazan vpliv hidrogelov z vgrajenimi različnimi disperzijami nanosistemov na hidratacijo kože. 30 minut po aplikaciji vseh hidrogelov se je hidratacija kože povečala, po 60 minutah se je nekoliko znižala, a je bila še vedno večja kot pred nanosom hidrogela na kožo. Najboljši vpliv je v povprečju imel hidrogel z nanoemulzijo (zvišanje hidratacije kože za 38 % po 30 minutah in za 34 % po 60 minutah), najslabše pa je na hidratacijo vplival hidrogel z disperzijo SLN Dynasan 118® (8 % zvišanje hidratacije po 30 minutah in 2 % zvišanje hidratacije po 60 minutah).

Hidrogel smo s kože odstranili po 30 minutah, to je tik pred prvo meritvijo. Predvidevamo, da bi bila hidratacija kože po 60 minutah višja kot po 30 minutah, če bi hidrogel pustili na koži. Vendar pa bi bili rezultati meritev v tem primeru napačni, saj bi merili hidratacijo hidrogelov in ne kože.

Najmanjša razlika med hidratacijo kože pred in po nanosu hidrogela je bila pri hidrogelu s SLN Dynasan® 118 (8 % zvišanje hidratacije po 30 minutah). Povprečni premer delcev v hidrogelu z disperzijo SLN Dynasan® 118 je bil največji (404 nm), zato je bil vpliv na hidratacijo najmanjši. S tem smo dokazali ugotovitve, da imajo večji delci slabše okluzivno delovanje in slabše vplivajo na hidratacijo kože. (6)

Variabilnost rezultatov klinične študije je bila velika, na kar so gotovo vplivali tudi pogoji v laboratoriju. V laboratoriju sta bili temperatura in relativna vlažnost visoki, kljub klimi

nismo uspeli zagotoviti idealnih pogojev, to je temperature od 20 do 23 °C in relativne vlažnosti od 40 % do 60 %. Prostovoljke so med aklimatizacijo in izvajanjem klinične študije sedele na stolu, boljše bi bilo, če bi ležale v njim prijetnem položaju, v katerem bi se čimmanj premikale. Na splošno je bilo v laboratoriju več motečih dejavnikov: prisotno osebje, občasna uporaba centrifuge, pihanje klime. Manj variabilne rezultate pa bi verjetno dobili tudi, če bi študijo izvajali na večjem številu prostovoljk, vsaj na 25.

## 5. Sklep

Na osnovi eksperimentalnih rezultatov smo ugotovili, da različne vrste lipidov vplivajo na fizikalno-kemijske lastnosti nanostruktur in njihovo fizikalno stabilnost v disperzijah in hidrogelih. Neustrezen povprečni premer, polidisperzni indeks ali zeta potencial nanostruktur vplivajo na nestabilnost nanosistemov in hidrogelov. Ugotovili smo, da ima najboljše lastnosti za zagotavljanje fizikalne stabilnosti nanoemulzija. S časom so se povprečni premer kapljic, polidisperzni indeks in zeta potencial nanoemulzije in hidrogela z vgrajeno nanoemulzijo najmanj spreminjali.

Eksperimentalni rezultati vpliva vrste lipida na transepidermalno izgubo vode niso v skladu s predhodnimi ugotovitvami raziskovalcev. Meritve TEWL 60 minut po aplikaciji hidrogela so bile v nekaterih primerih nekoliko nižje od TEWL pred nanosom, a se je pri vseh hidrogelih pojavljala velika variabilnost rezultatov. Zaradi velike variabilnosti rezultatov ne moremo trditi, da vrsta lipida v SLN vpliva na TEWL. Prav tako ne moremo trditi, da vrsta nanosistema (SLN ali NLC) v hidrogelu vpliva na TEWL. Dokazali smo pozitiven vpliv nanosistemov na hidratacijo kože. Najučinkovitejši je bil hidrogel z vgrajeno nanoemulzijo, kjer se je hidratacija 30 minut po nanosu zvišala za 38 %. Najmanjši vpliv na hidratacijo kože je imel hidrogel z vgrajeno disperzijo SLN Dynasan<sup>®</sup> 118, kjer se je hidratacija kože 30 minut po aplikaciji zvišala le za 8 %. Glede na dobljene rezultate klinične študije pa ne moremo trditi, da vrsta lipida v SLN oziroma vrsta nanosistema v hidrogelu različno vpliva na hidratacijo kože, saj je variabilnost v dobljenih rezultatih velika.

Za optimalnejšo izvedbo meritev in s tem doseganje manjše variabilnosti rezultatov bi bilo smiselno zmanjšati količino nanesenih hidrogelov in podaljšati čas med nanosom in prvo meritvijo. Klinično študijo bi bilo bolje izvajati v pomladnih ali jesenskih dneh, tako da bi lažje zagotovili priporočene vrednosti temperature in relativne vlažnosti v prostoru.

Ugotovili smo, da lipidni nanosistemi vplivajo na hidratacijo kože, o vplivu na TEWL pa bi bilo smiselno izvesti ponovne študije, pri katerih bi bila količina nanesenega hidrogela manjša, čas med nanosom in meritvami pa daljši. V nadaljnjih raziskavah bi bilo smiselno vrednotiti vpliv različnih trdnih lipidnih nanodelcev, nanostrukturiranih lipidnih sistemov in nanoemulzij na TEWL in hidratacijo kože po daljši uporabi hidrogelov z vgrajenimi nanosistemi.

## 6. Literatura

1. [http://www.ebotanicalgarden.com/ns/index.php?option=com\\_content&view=article&id=255:nanotechnology-in-cosmetics&catid=55:informational-articles&Itemid=225](http://www.ebotanicalgarden.com/ns/index.php?option=com_content&view=article&id=255:nanotechnology-in-cosmetics&catid=55:informational-articles&Itemid=225) (7.7.2013, 0:52)
2. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Koloid> (10.7.2013, 19:25)
3. Pardeike J, Hommoss A, Müller R H: Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm* 2009; 366: 170-184.
4. Torchilin V P: *Nanoparticulates as Drug Carriers*, Imperial College Press, London, 2006: 187-212.
5. Wissing S A, Müller R H: Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). *Int J Pharm* 2003; 254: 65-68.
6. Müller R H, Petersen R D, Hommoss A, Pardeike J: Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv Drug Delivery Rev* 2007; 59: 522-530.
7. Mehner W, Mäder K: Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Adv Drug Delivery Rev* 2012; 64:83-101.
8. Souto E B, Wissing S A, Barbosa C M, Müller R H: Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58; 83-90.
9. Pardeike J, Schwabe K, Müller R H: Influence of nanostructured lipid carriers (NLC) on the physical properties of the Cutanova Nanorepair Q10 cream and the in vivo skin hydration effect. *Int J Pharm* 2010; 396: 166-173.
10. <http://www.biox.biz/Downloads/PDFs/Skin%20Forum%202005%20-%20TEWL%20and%20the%20Skin%20Barrier.pdf> (dostop: 14.08.2013, 22:05)
11. [www.courage-khazaka.de](http://www.courage-khazaka.de) (dostop: 14.08.2013,22:30)
12. Wissing S A, Lippacher A, Müller R H: Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN). *J Cosmet Sci* 2001; 52: 313-324.
13. Wissing S A, Müller R H: The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity – in vivo study. *Eur J Pharm Biopharm* 2003; 56: 67-72.

14. Loo C H, Basri M, Ismail R, Lau H L N, Tejo B A, Kanthimathi M S, Hassan H A, Choo Y M: Effect of compositions in nanostructured lipid carriers (NLC) on skin hydration and occlusion. Int J Nanomedicine 2013; 8: 13-22.
15. <http://www.docstoc.com/docs/38497484/Product-Information-DYNASAN-114>  
(dostop: 19.08.2013, 16:30)
16. <http://files.rushim.ru/books/lekarstva/handbook-of-pharmaceutical-excipients2009.pdf>  
(dostop: 19.08.2013, 18:40)
17. [http://en.wikipedia.org/wiki/Glycerol\\_monostearate](http://en.wikipedia.org/wiki/Glycerol_monostearate) (dostop: 19.08.2103, 18:55)
18. [http://en.wikipedia.org/wiki/Stearic\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Stearic_acid) (dostop: 19.08.2013, 19:05)
19. <http://www.makingcosmetics.com/Cetyl-Palmitate-p370.html> (dostop : 19.08.2013, 19:10)
20. <http://www.innovate-excipients.basf.com/Products.aspx?PRD=30035118> (dostop: 19.08.2013, 19:30)