

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA MURKOVIČ
DIPLOMSKA NALOGA
UN KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA MURKOVIČ

**PROUČEVANJE VPLIVA SESTAVE IN VELIKOSTI
LIPOSOMOV NA TRANSEPIDERMALNO IZGUBO VODE
IN HIDRATACIJO KOŽE**

**A STUDY OF THE INFLUENCE OF LIPOSOME
COMPOSITION AND SIZE ON TRANSEPIDERMAL
WATER LOSS AND SKIN HYDRATION**

UN KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2014

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

Za pomoč pri izdelavi diplomske naloge se za strokovno usmerjanje in nasvete zahvaljujem mentorici doc.dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag.farm.

Izjava

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

Vsebina

Povzetek	i
Seznam okrajšav.....	ii
1. Uvod.....	1
1.1. Liposomi.....	1
1.1.1. Definicija, kemijske in strukturne lastnosti	1
1.1.2. Uporaba liposomov v kozmetičnih izdelkih	2
1.2. Metode izdelave liposomov	3
1.2.1. Dispergiranje fosfolipidov v vodno fazo z rotor-stator homogenizatorjem	3
1.2.2. Injiciranje etanolne raztopine fosfolipidov v vodno fazo.....	3
1.2.3. Hidratacija tankega lipidnega filma	3
1.2.4. Metode zmanjševanja in poenotenja velikosti liposomov	3
1.3. Vrednotenje disperzij liposomov	4
1.3.1. Merjenje povprečnega premera in širine porazdelitve velikosti liposomov	4
1.3.2. Merjenje zeta potenciala.....	4
1.4. Transepidermalna izguba vode in hidratacija kože	5
1.4.1. Transepidermalna izguba vode.....	5
1.4.2. Hidratacija kože	6
1.4.3. Vpliv velikosti in sestave liposomov na penetracijo KAS, transepidermalno izgubo vode in hidratacijo kože.....	7
2. Namen dela	11
3. Materiali in metode	12
3.1. Materiali.....	12
3.1.1. Fosfolipidi.....	12
3.1.2. Stabilizatorji	12
3.1.3. Topila.....	12
3.1.4. Sestavine za izdelavo hidrogela	12
3.2. Aparature.....	13
3.3. Izdelava disperzij liposomov	13
3.3.1. Izbira delovne metode	13
3.3.2. Vpliv koncentracije fosfolipidov na povprečni premer in polidisperzni indeks liposomov	14
3.3.3. Izbira stabilizatorja.....	15
3.3.4. Izdelava disperzij liposomov različne velikosti in sestave	15
3.4. Izdelava hidrogelov	16

3.5. Vrednotenje fizikalne stabilnosti	17
3.5.1. Merjenje povprečnega premera in polidisperznega indeksa.....	17
3.5.2. Merjenje zeta potenciala.....	18
3.6. Testiranje	18
3.6.1. Meritve transepidermalne izgube vode	19
3.6.2. Meritve hidratacije kože	19
3.7. Statistična analiza podatkov.....	19
4. Rezultati in razprava	20
4.1. Izbira delovne metode za izdelavo disperzij liposomov	20
4.2. Vpliv koncentracije fosfolipidov na povprečni premer in PDI liposomov.....	21
4.3. Izbira vrste stabilizatorja za izdelavo disperzij liposomov.....	22
4.4. Vrednotenje fizikalne stabilnosti disperzij liposomov	23
4.4.1. Vpliv staranja na povprečni premer liposomov	24
4.4.2. Vpliv staranja na PDI liposomov	25
4.4.3. Vpliv staranja na ZP liposomov	25
4.5. Vrednotenje fizikalne stabilnosti liposomov po vgradnji v hidrogel	26
4.5.1. Vpliv staranja na povprečni premer liposomov po vgradnji v hidrogel	26
4.5.2. Vpliv staranja na PDI liposomov po vgradnji v hidrogel.....	27
4.5.3. Vpliv staranja na ZP liposomov po vgradnji v hidrogel.....	28
4.6. Vpliv velikosti in sestave liposomov vgrajenih v hidrogel na TEWL	29
4.6.1. Vpliv praznega hidrogela in hidrogelov z vgrajenimi disperzijami liposomov na TEWL pri posameznih prostovoljcih	29
4.6.2. Primerjava vpliva velikosti liposomov vgrajenih v hidrogele na TEWL	32
4.6.3. Primerjava vpliva sestave liposomov vgrajenih v hidrogele na TEWL	34
4.7. Vpliv velikosti in sestave liposomov vgrajenih v hidrogel na hidratacijo kože pri posameznih prostovoljcih	37
4.7.1. Vpliv praznega hidrogela in hidrogelov z vgrajenimi disperzijami liposomov na hidratacijo kože	37
4.7.2. Primerjava vpliva velikosti liposomov vgrajenih v hidrogele na hidratacijo kože	40
4.7.3. Primerjava vpliva sestave liposomov vgrajenih v hidrogele na hidratacijo kože... ..	42
5. Sklep	45
6. Literatura.....	46

Povzetek

Uporaba liposomov je na področju kozmetičnih izdelkov priljubljena, saj omogoča izdelavo inovativnih in učinkovitih kozmetičnih izdelkov. Poglavitne prednosti uporabe liposomov so izboljšanje stabilnosti, okrepitev penetracije in povečanje učinkovitosti kozmetično aktivnih sestavin ter njihove tolerance na koži.

V diplomski nalogi smo izdelali disperzije liposomov različnih velikosti in sestave. Z meritvami povprečnega premera, polidisperznega indeksa in zeta potenciala smo vrednotili fizikalno stabilnost disperzij liposomov in liposomov vgrajenih v hidrogel. S testiranjem na prostovoljcih smo ugotavljali vpliv velikosti in sestave liposomov na transepidermalno izgubo vode (TEWL) in hidratacijo kože.

Vsi hidrogeli brez in z vgrajenimi disperzijami liposomov so pozitivno vplivali na kožne parametre. Pri vseh formulacijah so se 30 minut po aplikaciji hidrogelov vrednosti TEWL značilno zmanjšale, vrednosti hidratacije kože pa značilno povečale v primerjavi z vrednostmi pred nanosom hidrogelov. Pri formulacijah, ki so vsebovale liposome, smo določili značilno zmanjšanje TEWL in značilno povečanje hidratacije kože tudi še 60 minut po aplikaciji. Pri hidrogelu brez liposomov značilnih razlik v omenjenih parametrih po 60 minutah ni bilo.

Med formulacijami hidrogelov, ki so vsebovale liposome različne velikosti, kot tudi med formulacijami liposomov, ki so vsebovale liposome različne sestave (nasičeni oz. nenasičeni fosfolipidi) nismo našli statistično značilnih razlik glede vpliva na TEWL in hidratacijo kože. Post Hoc testi so pokazali značilno razliko v zmanjšanju vrednosti TEWL le med hidrogelom brez liposomov in posameznimi hidrogeli z liposomi različne sestave.

Seznam okrajšav

KI	kozmetični izdelek
KAS	kozmetično aktivne sestavine
SUV	majhni enoslojni liposomi
LUV	veliki enoslojni liposomi
MLV	večslojni liposomi
PCS	fotonska korelacijska spektroskopija
PDI	polidisperzni indeks
TEWL	transepidermalna izguba vode
ZP	zeta potencial
PAS	površinsko aktivne snovi
SPC	sojin fosfatidilholin
HSPC	nasičen sojin fosfatidilholin

1. Uvod

Proizvajalci kozmetičnih izdelkov (KI) pogosto uporabljajo nanodostavne sisteme, saj le-ti omogočajo izdelavo inovativnih in učinkovitih KI. Poglavitne prednosti njihove uporabe so izboljšanje stabilnosti, okrepitev penetracije in povečanje učinkovitosti kozmetično aktivnih sestavin (KAS) ter njihove tolerance na koži. Večinoma se uporabljajo nanoemulzije, nanosuspenzije, liposomi, niosomi, miceli, polimerne nanokapsule, trdni lipidni nanodelci, nanostrukturirani lipidni sistemi, ogljikove nanocevice, fulereni in dendrimeri (1).

Zaradi nanometerske velikosti je včasih vprašljiva varnost novih materialov in dostavnih sistemov. Ti imajo lahko v človeškem telesu drugačne učinke kot enaki materiali večjih velikosti. Znanstveni odbor za varstvo potrošnikov (ang. Scientific Committee on Consumer Safety - SCCS) je leta 2012 objavil dokument »Smernice za oceno varnosti nanomaterialov v KI«. Te smernice so namenjene zagotavljanju informacij za pomoč pri oceni varnosti nanomaterialov, namenjenih za uporabo v KI. V dokumentu je poudarjena potreba po posebnih pogledih na varnost nanomaterialov, zaradi možnih drugačnih lastnosti, interakcij in učinkov v primerjavi z materiali večje velikosti. Smernice zajemajo glavne elemente ocene tveganja nanomaterialov: karakterizacijo nanomaterialov in njihov toksikološki profil, oceno izpostavljenosti ter karakterizacijo odziva na odmere (2).

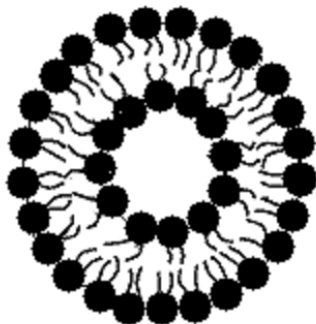
1.1. Liposomi

Liposome je leta 1961 (objavljeno leta 1964) med proučevanjem fosfolipidov in strjevanja krvi odkril britanski hematolog Alec Bangham. Prišel je do zaključkov, da fosfolipidni filmi v vodi spontano tvorijo koncentrične dvosloje. Od takrat se je zanimanje zanje razširilo na različna področja uporabe, v kozmetiki pa so se pojavili šele po več kot 20 letih. Prvi kozmetični izdelek z liposomi sta leta 1986 izdelala L'Oreal (Niosomes) in Christian Dior (Capture). Danes se liposomi razširjeno uporabljajo v KI za zaščito KAS pred razgradnjo ter za njihovo dostavo v globlje plasti kože. Poleg tega pa se uporabljajo tudi brez dodajanja KAS, in sicer za izboljšanje stanja kože, saj nadomeščajo lipide v roženi plasti (3).

1.1.1. Definicija, kemijske in strukturne lastnosti

Liposomi so mikroskopski vezikli, zgrajeni iz enega ali več koncentričnih lipidnih dvoslojev, ki so med seboj ločeni z enakim številom vodnih slojev. Osnovni gradniki liposomov so fosfolipidi, ki so sestavljeni iz hidrofilnega (polarna glava) in hidrofobnega (nepolarni rep) dela. Zaradi teh lastnosti se ob stiku z vodo spontano uredijo v urejene sferične strukture. Amfifilne molekule, ki imajo en nepolaren rep, tvorijo micelle. Tiste z dvema nepolarnima

repoma pa se povežejo v lipidni dvosloj, pri čemer polarni del štiti nepolarne dele pred vodo. Lipidni dvosloji se povežejo v zaključene kroglaste strukture – liposome (4).



Slika 1: Zgradba liposoma.

Liposome lahko delimo glede na velikost in število membran, ki sta odvisna predvsem od metode izdelave in sestave liposomov. Majhni enoslojni liposomi (SUV) so veliki od 20 do 100 nm, veliki enoslojni (LUV) od 100 do 800 nm, večslojni liposomi (MLV) pa od 100 nm do 1 μm (5).

1.1.2. Uporaba liposomov v kozmetičnih izdelkih

Fosfolipidi so glavne komponente v vseh celičnih membranah človeškega telesa. V tej pomembni skupini lipidov prevladuje fosfatidilholin. Zaradi svoje sposobnosti, da tvorijo strukture podobne tistim v celičnih membranah in lipidnih plasteh rožene plasti (SC) ter njihove afinitete do lipidov SC, so fosfolipidi idealne sestavine za pripravo funkcionalne kozmetike z visoko kožno kompatibilnostjo. Fosfolipidi povečajo gladkost in elastičnost kože. Zaradi svojih lastnosti (kompatibilnost s kožo, biorazgradljivost, toksikološka varnost) so dragocene sestavine za izdelavo sodobne kozmetike (6).

Zaradi amfifilne strukture lahko v liposome vgrajujemo tako hidrofilne in amfifilne kot tudi lipofilne KAS. Hidrofilne sestavine se nahajajo v vodnem mediju v osrednjem delu liposoma, amfifilne so razporejene ob membrani in se z lipofilnim delom delno vgradijo v dvosloj, lipofilne sestavine pa so popolnoma vključene v lipidni dvosloj (7).

1.2. Metode izdelave liposomov

1.2.1. Dispergiranje fosfolipidov v vodno fazo z rotor-stator homogenizatorjem

Metoda dispergiranja fosfolipidov v vodno fazo z rotor-stator homogenizatorjem je enostavna metoda, s katero lahko izdelamo disperzije liposomov s srednje velikim povprečnim premerom.

Pri tej metodi združimo na enako temperaturo segreto lipidno in vodno fazo ter z rotor-stator homogenizatorjem izdelamo disperzije liposomov.

1.2.2. Injiciranje etanolne raztopine fosfolipidov v vodno fazo

Metoda injiciranja etanolne raztopine fosfolipidov v vodno fazo je bila prvič predstavljena leta 1973. Njena glavna prednost je, da z enostavnim injiciranjem etanolne raztopine fosfolipidov v vodno fazo nastanejo majhni liposomi (< 100 nm).

Pri tej metodi fosfolipide raztopimo v hlapnem organskem topilu, ki se meša z vodo. Lipidno raztopino injiciramo v vodno fazo ter z odparevanjem odstranimo organsko topilo.

1.2.3. Hidratacija tankega lipidnega filma

Hidratacija tankega lipidnega filma je originalna metoda, ki je bila sprva uporabljena za izdelavo liposomov. Metoda se široko uporablja in je enostavna za uporabo. Z uporabo te metode nastanejo heterogeni multilamelarni liposomi (MLV) velikosti 1-5 µm.

Pri tej metodi fosfolipide dispergiramo v organskem topilu. Organsko topilo odstranimo z rotacijskim evaporatorjem, na stenah bučke pa nastane tanek lipidni film. Z rehidracijo filma ob stalnem mešanju in stresanju bučke nastanejo liposomi.

1.2.4. Metode zmanjševanja in poenotenja velikosti liposomov

Z metodo membranskega ekstrudiranja lahko zmanjšamo in/ali poenotimo velikost in slojnost liposomov. Disperzijo liposomov potiskamo skozi polikarbonatno membrano z ustrezno velikostjo por. Velikost por izberemo glede na povprečno velikost liposomov po izdelavi in jo lahko postopoma zmanjšujemo. Pomembno je, da disperzijo potiskamo skozi membrano v neparnem številu, po priporočilih vsaj 11-krat. Dobljena velikost liposomov po ekstrudiranju je zaradi dinamične strukture liposomov običajno večja ali enaka velikosti por, ki smo jo uporabili (5, 7).

1.3. Vrednotenje disperzij liposomov

Najpomembnejši parametri za oceno kvalitete liposomov in primerjavo med različnimi serijami liposomov so povprečna velikost, polidisperzni indeks, učinkovitost vgrajevanja učinkovine, razmerje med koncentracijami fosfolipidov in vgrajenimi učinkovinami, število membran in zeta potencial (5).

1.3.1. Merjenje povprečnega premera in širine porazdelitve velikosti liposomov

Za merjenje povprečnega premera in širine porazdelitve velikosti liposomov imamo na voljo več metod: elektronsko mikroskopijo ter metode, ki temeljijo na sipanju svetlobe.

Za rutinsko merjenje povprečnega premera in polidisperznega indeksa (PDI) liposomov se najpogosteje uporablja dinamično sipanje laserske svetlobe (ang. Dynamic Light Scattering - DLS), poznano tudi kot fotonska korelacijska spektroskopija (ang. Photon Correlation Spectroscopy - PCS). Tehnika merjenja sodi med metode, ki temeljijo na sipanju svetlobe (5).

Fotonska korelacijska spektroskopija temelji na merjenju hitrosti Brownovega gibanja delcev, ki jo povezuje z velikostjo delcev. Brownovo gibanje je naključno gibanje delcev v plinih ali kapljevinah kot posledica trkov delcev z molekulami medija. Hitrost gibanja delcev je odvisna od velikosti delcev, temperature in viskoznosti. Pri manjših delcih, višji temperaturi in nižji viskoznosti je hitrost gibanja delcev večja. Nasprotno pa je za velike delce, nižjo temperaturo ter višjo viskoznost disperznega medija značilno počasnejše gibanje.

Velikost liposomov in PDI sta odvisna od metode izdelave ter sestave liposomov. Vrednosti PDI so od 0 do 1, pri čemer 0 pomeni monodisperzni vzorec, 1 pa polidisperzni vzorec (8).

1.3.2. Merjenje zeta potenciala

Zeta potencial (ZP) je dober pokazatelj interakcij med koloidnimi delci. Z merjenjem le-tega lahko napovemo fizikalno stabilnost koloidnih sistemov. Delci z visoko absolutno vrednostjo ZP se med seboj odbijajo, zaradi česar ni težnje po združevanju delcev. Nasprotno pa pri delcih z nizkim ZP ni sile, ki bi preprečevala flokulacijo. Za stabilne disperzije je značilna absolutna vrednost ZP večja od 30 mV (5, 9).

Preglednica 1: Stabilnost koloidnih sistemov v odvisnosti od ZP (9).

Zeta potencial (mV)	Stabilnost
0-10	Nestabilnost (hitra koagulacija ali flokulacija)
10-30	Začetek nestabilnosti
30-40	Zmerna stabilnost
40-60	Dobra stabilnost
>60	Odlična stabilnost

ZP lahko merimo z elektroforezo, ki temelji na merjenju hitrosti gibanja delcev v električnem polju. Delci z nabojem se v disperziji gibljejo proti nasprotno nabiti elektrodi s hitrostjo sorazmerno vrednosti ZP. Pri večjem ZP je gibanje delcev hitrejše. Hitrost gibanja delcev pa lahko merimo s pomočjo Dopplerjevega efekta sipane laserske svetlobe na delcih (8).

1.4. Transepidermalna izguba vode in hidratacija kože

1.4.1. Transepidermalna izguba vode

Transepidermalna izguba vode (ang. Transepidermal water loss - TEWL) je pasivna izguba vode skozi intakten *stratum corneum*. Gre za kontinuiran proces, ki je odvisen od spremenljivk osebe (starost, spol, preiskovana površina, temperatura kože, potenje, bolezenska stanja, rasa), okolja (temperatura in relativna vlažnost okolja, kroženje zraka), instrumenta (temperatura senzorja, teža merilne celice) ter uporabe KI (okluzija, hidratacija kože). TEWL poraste že ob majhnih poškodbah kožne bariere (rane, opekline, površinsko aktivne sestavine (PAS), izsušenost kože) (10).

Za določanje TEWL se lahko uporabljajo različne aparature, njihova bistvena razlika je v obliki merilne celice. Poznamo aparature z zaprto celico, zaprto celico s kondenzatorjem, zaprto celico z odvodom zraka ter odprto celico.

Tewameter TM 300 je aparatura za merjenje TEWL, ki meri gostoto toka vodnih hlapov v zraku nad kožo. Merilna celica je odprta in ima znotraj okroglega cilindra senzorja temperature in relativne vlažnosti. Mikroprocesor analizira vrednosti in izrazi stopnjo izhlapevanja v $g/h/m^2$. Merjenje z odprto celico je edini način za določitev TEWL brez vpliva mikro okolja celice. Vendar pa je celica občutljiva na relativno vlažnost in temperaturo okolja ter gibanje zraka (11).

Preglednica 2: Interpretacija meritev s Tewametrom TM 300 (11).

VREDNOST g/h/m ²	ENOTA	INTERPRETACIJA
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

1.4.2. Hidratacija kože

Hidratacija kože vpliva na njeno barierno funkcijo, mehanske lastnosti ter penetracijo spojin v kožo. Dejavnika, ki pomembno vplivata na hidratacijo kože, sta prisotnost naravnega vlažilnega faktorja in prisotnost medceličnih lipidov. Njuno pomanjkanje je lahko prirojeno ali pridobljeno. Na hidratacijo kože vplivajo tudi starost, nekatera zdravila, prehranjevalne navade, pitje tekočine, uporaba KI, bolezenska stanja, stres in izpostavljenost škodljivim pogojem ter snovem (veter, mraz, suh zrak, UV-sevanje,...) (10).

Corneometer CM 825 je aparaturna za merjenje hidratacije kože, ki meri kapacitivnost dielektričnega medija (kože). Merilna sonda je iz zlatih žic na keramični površini, ki je zaščitena s tanko stekleno ploščo. Merimo spremembo dielektrične konstante zaradi spremembe površinske hidratacije kože. Električne lastnosti kože se namreč v odvisnosti od hidratacije kože spreminjajo (11).

Preglednica 3: Interpretacija meritev s Corneometrom CM 825 (11).

VREDNOST	INTERPRETACIJA
< 30 CM 825 arbitrarnih enot	Zelo suha koža
30-40 CM 825 arbitrarnih enot	Suha koža
> 40 CM 825 arbitrarnih enot	Normalna

1.4.3. Vpliv velikosti in sestave liposomov na penetracijo KAS, transepidermalno izgubo vode in hidratacijo kože

Dermalna uporaba liposomov ima številne pozitivne učinke na kožne parametre. Zaradi strukturne podobnosti dvoslojnih membran liposomov s kožo lahko nadomeščajo v koži manjkajoče lipide. Poleg tega so lipidi, ki gradijo liposome dobro hidratirani in lahko zmanjšajo suhost kože. Posledica tega je zmanjšana transepidermalna izguba vode in povečana hidratiranost kože (5).

1.4.3.1. Vpliv velikosti liposomov

Splošno je sprejeto, da standardni liposomi ne penetrirajo v kožo. Razdalja med intercelularnimi lipidi je namreč zelo majhna v primerjavi z velikostjo standardnih liposomov (12).

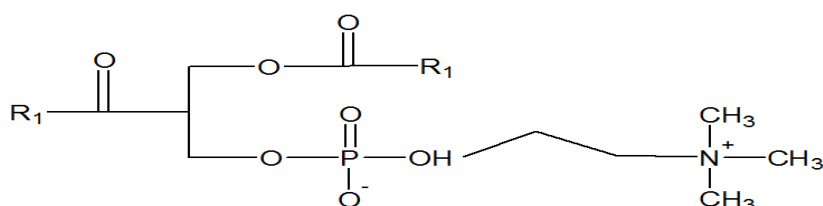
D. D. Verma in sodelavci so proučevali, kako velikost liposomov vpliva na dermalno dostavo sestavin v kožo. Študijo penetracije so izvedli in vitro na človeški koži trebuha, z uporabo Franzove difuzijske celice in tape stripingom. Različno velikost liposomov so dosegli z ekstrudiranjem izdelane disperzije skozi polikarbonatno membrano z različno velikostjo por. V liposome je bila vgrajena fluorescentno označena spojina. Po 14 urah so vrednotili količino fluorescentne spojine v različnih globinah kože. V roženi plasti je bila največja količina fluorescentne spojine prisotna pri uporabi najmanjših liposomov (120 nm), najmanjša količina pa pri uporabi največjih liposomov (810 nm). Rezultati so bili enaki tudi v globljih plasteh kože (13).

Preglednica 4: Vpliv velikosti liposomov na količino z liposomi dostavljene fluorescentne spojine (izražene kot % aplicirane količine) v različne plasti kože po 14-ih urah neokluzivne aplikacije (13).

Povprečni premer liposomov (nm)	Rožena plast (%)	Globlje plasti kože (%)
120	72,879	0,765
191	65,279	0,164
377	61,194	0,105
810	39,952	0,023

1.4.3.2. Vpliv nasičenosti fosfolipidov

Sojin fosfatidilholin (SPC) vsebuje približno 70 % zaestrene linolne kisline, 15 % drugih nenasičenih maščobnih kislin ter 15 % nasičenih maščobnih kislin. Zaradi sestave maščobnih kislin je temperatura faznega prehoda okoli 0 °C. Nasičen sojin fosfatidilholin (HSPC) vsebuje približno 85 % zaestrene stearinske kisline, 14 % palmitinske kisline in 1 % ostalih maščobnih kislin. Te maščobne kisline imajo visoko temperaturo tališča, zaradi česar je temperatura faznega prehoda HSPC približno 55 °C (14).



Slika 2: Zgradba fosfatidilholina (R₁ in R₂ predstavljata maščobne kisline).

Preglednica 5: Najpogosteje zastopane maščobne kisline v fosfolipidih in njihova temperatura tališča (14).

Ime		Temperatura tališča (°C)
Nasičene maščobne kisline		
	Miristinska kislina	52,0
	Palmitinska kislina	63,1
	Stearinska kislina	69,6
	Arahidinska kislina	75,4
Nenasičene maščobne kisline		
	Oleinska kislina	13,4
	Linolna kislina	-9
	Linolenska kislina	-11
	Arahidonska kislina	-49,5

Zaradi prisotnosti različnih zaestrenih maščobnih kislin so fosfolipidni dvosloji pri kožni temperaturi v različnih stanjih. Tisti iz SPC so v tekočem kristalnem stanju, tisti iz HSPC pa v gel stanju. To je lahko razlog za različnost interakcij liposomov z roženo plastjo. Van den

Bergh je s pomočjo elektronske mikroskopije pokazal, da liposomi v gel stanju agregirajo, se zlivajo in se adherirajo na površini rožene plasti. S tem se fosfolipidi odlagajo in tvorijo mrežo lipidnega dvosloja. Nasprotno pa liposomi v tekočem kristalnem stanju niso agregirali ali se zlivali na površju rožene plasti. V globljih plasteh rožene plasti so povzročili interakcijo z intercelularnimi lipidi. Različnost interakcij liposomov z roženo plastjo je lahko povezana z večjo fleksibilnostjo dvoslojev in prostim gibanjem posameznih molekul fosfolipidov v tekočem kristalnem stanju v primerjavi s tistimi v gel stanju (12).

Penetracijo liposomov z vgrajenim fluorescentnim barvilom karboksifluoresceinom skozi človeško kožo trebuha so proučevali s fluorescentno mikroskopijo. Rezultati so pokazali, da koža liposome narejene iz SPC v primerjavi s tistimi iz HSPC, zlahka privzame. Poleg tega ti liposomi hitreje penetrirajo pod roženo plast. Ti rezultati nakazujejo, da HSPC privzame rožena plast, globlje plasti kože pa ne. Iz tega je razvidno, da HSPC ne moti lipidne bariere kože. Funkcija dermalne aplikacije HSPC je zaščita kože, saj obnovi in stabilizira plasti kožne bariere. Z merjenjem TEWL so pokazali, da te formulacije ne spremenijo naravne vrednosti TEWL (15).

Liposome iz nenasičenih fosfatidilholinov je potrebno v bariernih kremah uporabljati pazljivo, saj ne okrepijo naravne barierne funkcije kože. Imajo pa posreden učinek podpiranja tvorbe ceramida I, ki vsebuje linolno kislino in je ena najpomembnejših sestavin za aktivacijo bariere. Za zaščito kože so uporabni nasičeni fosfatidilholini (16).

Liposomi iz SPC so tako bolj primerni za povečanje penetracije vgrajenih sestavin v globlje plasti kože. Liposomi iz HSPC pa so bolj primerni za stabilizacijo barierne funkcije kože (17).

Zaradi njunih posebnih lastnosti je smiselna uporaba kombinacije nasičenih in nenasičenih fosfatidilholinov v kozmetičnih formulacijah (16).

Preglednica 6: Prikaz razlik med sojinim fosfatidilholinom in hidrogeniranim sojinim fosfatidilholinom. (16).

Parameter	Sojin fosfatidilholin	Hidrogeniran sojin fosfatidilholin
Sestava maščobnih kislin (MK)	Nenasičene MK (predvsem linolna kislina)	Nasičene MK (predvsem stearinska in palmitinska kislina)
Temperatura faznega prehoda	~ 0 °C	~ 55 °C
Barierna funkcija kože	- Izboljša penetracijo KAS - Penetrira v plasti pod <i>stratum corneum</i>	- Stabilizira barierno funkcijo - Penetrira le v <i>stratum corneum</i>
Vpliv na TEWL	Rahlo zmanjša TEWL	Stabilizira normalen TEWL
Toleranca	Zelo visoka	Zelo visoka

2. Namen dela

Namen diplomske naloge je proučevanje vpliva velikosti in sestave liposomov na transepidermalno izgubo vode (TEWL) in hidratacijo kože.

Disperzije liposomov bomo izdelali s tremi različnimi metodami: dispergiranjem fosfolipidov v vodno fazo z rotor stator homogenizatorjem, injiciranjem etanolne raztopine fosfolipidov v vodno fazo ter hidratiranjem tankega fosfolipidnega filma. Izbrali bomo za naš namen najprimernejšo metodo. Z izbrano metodo bomo izdelali disperzije liposomov, kjer bomo kot fosfolipid uporabili nenasičen fosfolipid Lipoid S100 (100 %), nasičen fosfolipid Lipoid SPC3 (100 %) ter kombinacijo obeh (50 % Lipoid S100 in 50 % Lipoid SPC3), kot stabilizator pa glikoholno ali tavrdeoksiholno kislino. Različno velikost liposomov bomo dosegli s spremembo tehnoloških pogojev izbrane metode in z membranskim ekstrudiranjem.

Disperzijam liposomov bomo izmerili povprečni premer, polidisperzni indeks (PDI) in zeta potencial (ZP). Meritve bomo izvedli na dan izdelave ter po enem in petih tednih. S tem bomo vrednotili fizikalno stabilnost disperzij liposomov. Fizikalno stabilnost liposomov vgrajenih v hidrogela bomo prav tako vrednotili z merjenjem povprečnega premera, PDI in ZP na dan izdelave ter po enem in štirih tednih.

Na 5 prostovoljcih bomo izvedli testiranje, s katerim bomo ugotavljali vpliv velikosti in sestave liposomov na hidratacijo kože in TEWL. Parametra bomo določili s Corneometrom[®] CM 825 in Tewametrom[®] TM 300 in sicer pred nanosom ter 30 in 60 minut po nanosu posameznega hidrogela brez ali z liposomi. Zanimalo nas bo, ali prisotnost liposomov v hidrogelu statistično značilno poveča hidratacijo kože in zmanjša TEWL. Ugotavljali bomo tudi, ali obstajajo med hidrogeli z liposomi različne velikosti in sestave statistično značilne razlike glede vpliva na ta dva parametra.

3. Materiali in metode

3.1. Materiali

3.1.1. Fosfolipidi

- Lipoid S100

Lipoid S100 je sojin fosfatidilholin s približno 100 % fosfatidilholina v obliki aglomeratov.

- Lipoid SPC3

Lipoid SPC3 je hidrogeniran sojin fosfatidilholin v obliki prahu in aglomeratov.

3.1.2. Stabilizatorji

- Glikoholna kislina (Sigma, Nemčija)

Glikoholna kislina je žolčna kislina. Nastane s konjugacijo holne kisline z glicinom. Je v obliki belega prahu in je topna v etanolu ali vodi.

- Tavrodeoksiholna kislina (Calbiochem, ZDA in Kanada)

Tavrodeoksiholna kislina je žolčna kislina. Nastane s konjugacijo deoksiholne kisline s tavrinom. Je v obliki belega prahu in je topna v vodi.

3.1.3. Topila

- Prečiščena in bidestilirana voda (Fakulteta za farmacijo, Ljubljana)
- Etanol (96 %) (C_2H_5OH) (Merck, Nemčija)

3.1.4. Sestavine za izdelavo hidrogela

- Hidroksietilceluloza (Merck, Nemčija)

Bel prašek, brez vonja, ki se v hidrogelu uporablja kot sredstvo za geliranje

- Glicerol (85 %) (Fagron, Nizozemska)

Brezbarvna viskozna tekočina, ki se v hidrogelu uporablja kot vlažilec.

- Natrijev benzoat (Kemika Zagreb, Nemčija)

Bel prašek, ki se v hidrogelu uporablja kot konzervans.

- Prečiščena in bidestilirana voda (Fakulteta za farmacijo, Ljubljana)

3.2. Aparature

- Precizna tehtnica XS205 DualRange (Mettler Toledo, Švica)
- Rotor-stator homogenizator Omni PDH (Omni International, ZDA)
- Rotacijski evaporator (rotavapor) z vodno kopeljo B-480 (Büchi, Švica)
- Membranski ekstrudor (Avanti polar lipids, ZDA)
- PCS naprava Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Velika Britanija)
- Mešalo Lab dancer (IKA Werke GmbH & Co. KG, Nemčija)
- Tewameter[®] TM 300 (Courage & Khazaka GmbH, Köln, Nemčija)
- Corneometer[®] CM 825 (Courage & Khazaka GmbH, Köln, Nemčija)

3.3. Izdelava disperzij liposomov

3.3.1. Izbira delovne metode

Za izbiro delovne metode smo kot fosfolipid uporabili Lipoid S100.

3.3.1.1. Izdelava liposomov z metodo dispergiranja fosfolipidov v vodno fazo z rotor-stator homogenizatorjem

S precizno tehtnico smo v prvo epruveto natehtali fosfolipid, v drugo pa prečiščeno vodo. Lipidno fazo smo na vodni kopeli s temperaturo 80°C segreti nad temperaturo faznega prehoda. Lipidni fazi smo dodali na enako temperaturo segreto vodno fazo in z rotor-stator homogenizatorjem homogenizirali 10 min pri 15000 obratih/min. Med homogeniziranjem je bila epruveta z vzorcem ves čas potopljena v vodno kopel, po izdelavi disperzije pa smo le-to ohladili na sobno temperaturo.

Formulacija:

Fosfolipid	2,5 %
Prečiščena voda	do 100 %

3.3.1.2 Izdelava liposomov z metodo injiciranja etanolne raztopine fosfolipidov v vodno fazo

S precizno tehtnico smo v merilno bučko natehtali fosfolipid in etanol. Vodo smo odmerili v čašo in jo postavili na magnetno mešalo. Dobljeno etanolno raztopino fosfolipida smo pri sobni temperaturi s pomočjo injekcijske brizge z iglo injicirali v čašo z vodo. Vzorec smo na magnetnem mešalu mešali 10 min pri 600 obratih/min.

Formulacija:

Fosfolipid	2,5 %
Etanol	7,5 %
Prečiščena voda	do 100 %

3.3.1.3. Izdelava liposomov po metodi hidratiranja lipidnega filma

S precizno tehtnico smo v bučko z obrusom natehtali fosfolipid in etanol ter vsebino stresali toliko časa, da je nastala etanolna raztopina. Bučko smo namestili na rotavapor. Pri znižanem tlaku in ob stalnem vrtenju v vodni kopeli ($T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$) smo odparili topilo. Po približno 30 minutah je na stenah bučke nastal tanek fosfolipidni film. V bučko smo dodali prečiščeno vodo in tako rehidratirali fosfolipidni film. Po približno 20 minutah mešanja in stresanja bučke so nastali liposomi.

Formulacija:

- Etanolna raztopina:

Fosfolipid	2,5 %
Etanol	do 100 %

- Hidratacija fosfolipidnega filma:

Fosfolipid	2,5 %
Prečiščena voda	do 100 %

3.3.2. Vpliv koncentracije fosfolipidov na povprečni premer in polidisperzni indeks liposomov

Za proučevanje vpliva koncentracije fosfolipidov na povprečni premer liposomov smo kot fosfolipid uporabili Lipoid S100. Koncentracijo le tega smo postopoma povečevali za 0,1 %. Disperzije liposomov smo izdelali z že prej opisano metodo injiciranja etanolne raztopine fosfolipidov v vodno fazo.

Začetna formulacija:

Fosfolipid	0,2 %
Etanol	7,5 %
Prečiščena voda	do 100 %

Končna formulacija:

Fosfolipid	0,7 %
Etanol	7,5 %
Prečiščena voda	do 100 %

3.3.3. Izbira stabilizatorja

Za proučevanje vpliva vrste stabilizatorja na povprečni premer liposomov smo kot fosfolipid uporabili Lipoid S100 (100 %), Lipoid SPC3 (100%) ter kombinacijo obeh (50 % Lipoida S100 in 50 % Lipoida SPC3), kot stabilizator pa glikoholno in tavrdeoksiholno kislino. Disperzije liposomov smo izdelali z metodo dispergiranja fosfolipidov v vodno fazo z rotor-stator homogenizatorjem.

S precizno tehtnico smo v prvo epruveto natehtali fosfolipid, v drugo pa prečiščeno vodo in stabilizator. Lipidno fazo smo na vodni kopeli s temperaturo 80°C segreti nad temperaturo faznega prehoda.

Lipidni fazi smo dodali na enako temperaturo segreto vodno fazo in z rotor stator homogenizatorjem homogenizirali 10 min pri 15000 obratih/min. Med homogeniziranjem je bil vzorec ves čas potopljen v vodno kopel, po izdelavi disperzije pa smo le-to ohladili na sobno temperaturo.

Formulacija:

Fosfolipid	2,5 %
Stabilizator	0,5 %
Prečiščena voda	do 100 %

3.3.4. Izdelava disperzij liposomov različne velikosti in sestave

Disperzije liposomov za vgradnjo v hidrogel, s katerimi smo proučevali vpliv velikosti in sestave liposomov na transepidermalno izgubo vode in hidratacijo kože, smo izdelali z metodo dispergiranja fosfolipidov v vodno fazo z rotor-stator homogenizatorjem.

3.3.4.1. Izdelava disperzij liposomov različne velikosti

Za izdelavo disperzij liposomov za primerjavo vpliva velikosti smo kot fosfolipid uporabili Lipoid S100, kot stabilizator pa tavrdeoksiholno kislino. Izdelali smo tri disperzije z različno velikostjo liposomov. Pri vseh smo uporabili enako formulacijo. Različno velikost

liposomov smo dosegli s spremembo pogojev homogeniziranja in z membranskim ekstrudiranjem.

Disperzijo liposomov srednje velikosti smo izdelali po že prej opisanem postopku. Z rotorstator homogenizatorjem smo homogenizirali 10 minut pri 15000 obratih/min. Za izdelavo disperzije liposomov manjše velikosti smo po enakem postopku izdelane disperzije liposomov ekstrudirali. To smo naredili tako, da smo disperzijo 15-krat potiskali skozi polikarbonatno membrano, katere pore so bile velike 200 nm. Za izdelavo disperzije liposomov večje velikosti smo homogenizirali 5 minut in obrate zmanjšali na 8500 obratov/min.

Formulacija:

Fosfolipidi	2,5 %
Stabilizator	0,5 %
Prečiščena voda	do 100 %

3.3.4.2. Izdelava disperzij liposomov različne sestave

Za izdelavo disperzij liposomov za primerjavo vpliva sestave smo kot fosfolipid uporabili Lipoid S100 (100 %), Lipoid SPC3 (100 %), ter kombinacijo obeh (50 % Lipoida S100 in 50 % Lipoida SPC3), kot stabilizator pa tavrodeoksiholno kislino. Izdelali smo tri disperzije liposomov z različno sestavo.

Formulacija:

Fosfolipid	2,5%
Stabilizator	0,5 %
Prečiščena voda	do 100 %

3.4. Izdelava hidrogelov

V pateno smo natehtali enako količino hidroksietilceluloze (HEC) in glicerola (85 %). Vse skupaj smo raztrli s pestilom in ob večkratnem mešanju pustili nabrekati približno 20 minut. V čašo smo natehtali vodo oziroma disperzijo liposomov in ji med mešanjem dodali Na-benzoat. Vodo oziroma disperzijo liposomov z Na-benzoatom smo med stalnim mešanjem počasi dodajali v pateno. Pateno smo pokrili s parafilmom in pustili nabrekati 24 ur. Vsebino patene smo med nabrekanjem večkrat premešali.

Za vrednotenje fizikalne stabilnosti liposomov v hidrogelih smo izdelali 10 g posameznega hidrogela. Za izdelavo smo potrebovali 4 vzorce disperzij liposomov (po 3 g).

Za vrednotenje vpliva hidrogelov na TEWL in hidratacijo kože smo izdelali 20 g posameznega hidrogela. Za izdelavo smo potrebovali 7 vzorcev disperzij liposomov.

Formulacija:

HEC 4000	2,5 %
Glicerol (85 %)	2,5 %
Na-benzoat	0,1%
Disperzija liposomov ali prečiščena voda	do 100 %

3.5. Vrednotenje fizikalne stabilnosti

Izdelanim disperzijam liposomov in hidrogelom z vgrajenimi disperzijami liposomov smo z aparaturo Zetasizer Nano ZS izmerili povprečni premer, polidisperzni indeks (PDI) in zeta potencial (ZP).

3.5.1. Merjenje povprečnega premera in polidisperznega indeksa

Za merjenje povprečnega premera in PDI disperzij liposomov smo uporabili plastično kiveto, v katero smo polnili nerazredčene vzorce.

Za merjenje povprečnega premera in PDI liposomov vgrajenih v hidrogelne smo uporabili enako kiveto, vendar smo vzorce razredčili, saj viskoznost vpliva na meritev. Redčitev smo opravili tako, da smo s konico steklene palčke vzeli malo hidrogela in ga razredčili v 20 ml vode.

Pogoji merjenja:

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

3.5.2. Merjenje zeta potenciala

Za merjenje ZP disperzij liposomov in liposomov vgrajenih v hidrogelne smo uporabili kapilarno celico. Vzorce smo pred meritvijo redčili, tako da smo dobili transparentne vzorce.

Pogoji merjenja:

- Kapilarna celica DTS 1060C
- Model: Smoluchowski
- Temperatura (T): 25 °C
- Viskoznost disperznega medija (η): 0,8872 mPas
- Lomni količnik disperznega medija (RI): 1,330
- Dielektrična konstanta disperznega medija (ϵ): 78,5

3.6. Testiranje

Testiranje smo izvedli na 5 prostovoljcih, starih med 21 in 26 let, ki so se strinjali s pogoji testiranja. Prostovoljcem smo naročili naj 3 dni pred testiranjem na podlakteh ne uporabljajo negovalnih KI.

Testiranje smo izvedli v laboratoriju, v katerem smo poskušali zagotoviti kar se da enake pogoje za vse prostovoljce. Relativna vlažnost in temperatura se med izvajanjem testiranja nista bistveno spreminjali. Relativna vlažnost se je gibala med 47 do 53 %, temperatura pa med 24 in 27 °C .

Prostovoljci so si ob prihodu s testiranega področja (podlakti) odstranili oblačila. Najprej smo na podlakteh označili območja s površino 4 cm², kjer smo kasneje izvajali meritve. Na vsaki roki smo označili 3 območja, torej je bilo na obeh rokah skupaj 6 območij.

Po označitvi območij so se prostovoljci v laboratoriju klimatizirali. Zagotovili smo jim udoben sedeč položaj ter počakali 15 minut.

Po 15 minutah klimatizacije smo na vseh območjih izmerili prvotne vrednosti TEWL in hidratacije kože. Najprej smo izmerili TEWL s Tewametrom® TM 300, nato pa hidratacijo kože s Coreometrom® CM 850. Nato smo na posamezna označena območja nanесли 0,2 ml hidrogelov. Količino smo odmerili z plastično brizgo. Na levo roko smo na označena območja od zapestja proti komolcu nanесли prazen hidrogel, hidrogel z disperzijo liposomov manjše velikosti iz Lipoida S100 ter hidrogel z disperzijo liposomov večje velikosti iz

Lipoida S100. Na desno roko smo na označena območja od zapestja proti komolcu nanegli hidrogel z disperzijo liposomov srednje velikosti iz Lipoida S100, hidrogel z disperzijo liposomov iz kombinacije Lipoida S100 in Lipoida SPC3 ter hidrogel z disperzijo liposomov iz Lipoida SPC3.

Po 30 minutah, ko so se hidrogeli vpili v kožo, smo na posameznih označenih območjih najprej izmerili TEWL s Tewametrom[®] TM 300, nato pa še hidratacijo kože s Corneometrom[®] CM 850. Čez 30 minut, torej po 1 uri od nanosa hidrogelov, smo ponovno izmerili TEWL in hidratacijo kože.

3.6.1. Meritve transepidermalne izgube vode

Meritve TEWL smo izvedli s Tewametrom[®] TM 300. Meritev smo opravili tako, da smo na testirano območje kože namestili sondo aparature. Čas merjenja je bil 30 sekund. Med samim merjenjem smo poskrbeli za mirovanje prostovoljcev in okolice. Na rezultate meritev namreč vpliva premikanje sonde ter gibanje zraka.

3.6.2. Meritve hidratacije kože

Meritve hidratacije kože smo izvedli s Corneometrom[®] CM 825. Meritev smo opravili tako, da smo sondo aparature za eno sekundo pritisnili na testirano območje kože in jo premaknili. Na posameznem območju smo opravili 9 meritev v smeri urnega kazalca.

3.7. Statistična analiza podatkov

Za statistično analizo podatkov smo uporabili programski paket SPSS (verzija 22, IBM). Uporabili smo metodo analize variance (ANOVA) enega faktorja (vrsta hidrogela) in ANOVO dveh faktorjev (vrsta hidrogela in čas). Za post hoc primerjavo med posameznimi pari smo uporabili test po Bonferoniju. Razlike, pri katerih je bila značilnost testa (P) manjša od 0,05, smo opredelili kot značilne.

4. Rezultati in razprava

4.1. Izbira delovne metode za izdelavo disperzij liposomov

Pri eksperimentalnem delu je bil naš prvi korak izbira delovne metode za nadaljnjo izdelavo disperzij liposomov. Izbirali smo med tremi metodami: dispergiranjem fosfolipidov v vodno fazo z rotor-stator homogenizatorjem, injiciranjem etanolne raztopine fosfolipidov v vodno fazo ter hidratacijo tankega fosfolipidnega filma. Kot fosfolipid smo uporabili Lipoid S100.

Izdelanim disperzijam liposomov smo z aparaturo Zetasizer Nano ZS izmerili povprečni premer, polidisperzni indeks (PDI) in zeta potencial (ZP). Na podlagi dobljenih rezultatov, prikazanih v preglednici 7, smo se odločili za nadaljnjo uporabo metode dispergiranja fosfolipidov v vodno fazo z rotor-stator homogenizatorjem.

Preglednica 7: Vpliv uporabljene metode izdelave na povprečni premer (d), PDI in ZP disperzij liposomov.

Metoda	d (nm)	PDI	ZP (mV)
Dispergiranje fosfolipidov v vodno fazo z rotor-stator homogenizatorjem	500	0,559	-13,3
Injiciranje etanolne raztopine fosfolipidov v vodno fazo	1046	0,668	-11,6
Hidratacija fosfolipidnega filma	1069	0,927	-17,2

Podatki v preglednici 7 prikazujejo povprečni premer, PDI in ZP disperzij liposomov, ki smo jih izdelali z različnimi metodami. Po pričakovanjih sta bila povprečni premer in PDI najvišja v primeru liposomov, ki smo jih izdelali s hidratacijo fosfolipidnega filma. Za to metodo so namreč značilni heterogeni multilamelarni liposomi. Primerljiv povprečni premer liposomov, vendar z nižjim PDI smo dobili z uporabo metode injiciranja etanolne raztopine. Za to metodo so sicer značilni homogeni liposomi z majhnim povprečnim premerom, vendar so najverjetneje zaradi visoke koncentracije fosfolipidov nastali liposomi z velikim povprečnim premerom. Z metodo dispergiranja fosfolipidov v vodno fazo pa smo dobili liposome z najnižjim povprečnim premerom in PDI.

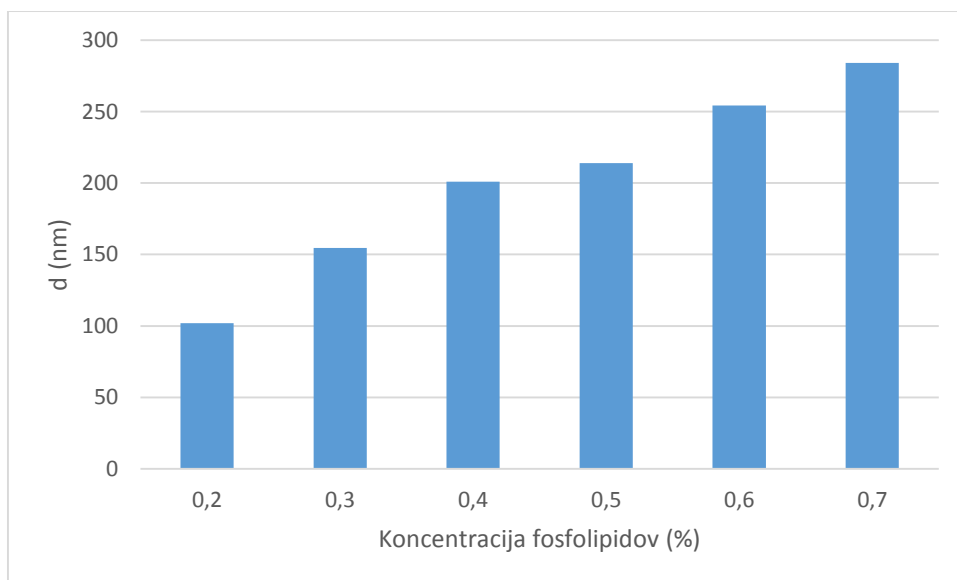
Absolutna vrednost ZP se je gibala med 11 in 18 mV, kar kaže na fizikalno nestabilnost disperzij. Zaradi tega smo se odločili za dodatek stabilizatorja, s katerim bi povečali vrednost ZP.

Zaradi najnižjega povprečnega premera in PDI disperzij liposomov smo se odločili za nadaljnjo uporabo metode dispergiranja fosfolipidov v vodno fazo.

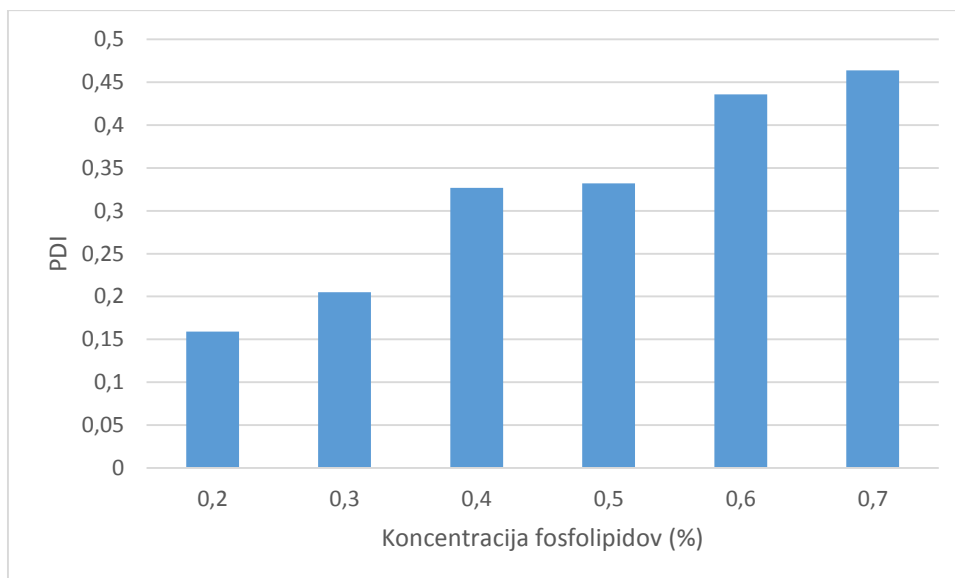
4.2. Vpliv koncentracije fosfolipidov na povprečni premer in PDI liposomov

Zaradi visokega povprečnega premera liposomov izdelanih z metodo injiciranja fosfolipidov v vodno fazo smo proučili, kako koncentracija fosfolipidov vpliva na povprečni premer in PDI liposomov. Za to metodo je namreč značilno, da dobimo homogene liposome z majhnim povprečnim premerom, vendar le pri zadosti nizkih koncentracijah fosfolipidov. Kot fosfolipid smo uporabili Lipoid S100.

Izdelanim disperzijam liposomov smo z aparaturo Zetasizer Nano ZS izmerili povprečni premer in PDI.



Slika 3: Vpliv koncentracije fosfolipidov na povprečni premer liposomov, izdelanih z metodo injiciranja fosfolipidov v vodno fazo.



Slika 4: Vpliv koncentracije fosfolipidov na PDI liposomov, izdelanih z metodo injiciranja fosfolipidov v vodno fazo.

Sliki 3 in 4 prikazujeta vpliv koncentracije fosfolipidov na povprečni premer in PDI liposomov. Z višanjem koncentracije fosfolipidov sta se postopoma povečevala tudi povprečni premer in PDI liposomov.

4.3. Izbira vrste stabilizatorja za izdelavo disperzij liposomov

Naslednji korak pri eksperimentalnem delu je bila izbira vrste stabilizatorja. Na izbiro smo imeli glikoholno (GHA) in tavrodeoksiholno (TDHA) kislino. Kot fosfolipid smo uporabili Lipoid S100 (100 %), Lipoid SPC3 (100 %) ter kombinacijo obeh (50 % Lipoida S100 in 50 % Lipoida SPC3). Disperzije liposomov smo izdelali z metodo dispergiranja fosfolipidov v vodno fazo z rotor-stator homogenizatorjem.

Izdelanim disperzijam liposomov smo z aparaturo Zetasizer Nano ZS izmerili povprečni premer, PDI in ZP. Na podlagi dobljenih rezultatov, prikazanih v preglednici 8, smo se odločili za nadaljnjo uporabo TDHA.

Preglednica 8: Vpliv uporabljenega stabilizatorja na povprečni premer, PDI in ZP liposomov, izdelanih z metodo dispergiranja fosfolipidov v vodno fazo z rotor-stator homogenizatorjem.

Formulacija	d (nm)	PDI	ZP (mV)
S100 + GHA	383,4	0,485	-39,9
S100 + SPC3 + GHA	434,1	0,568	-26,6
SPC3 + GHA	533,6	0,661	-19,7
S100 + TDHA	351	0,445	-49,8
S100 + SPC3 + TDHA	522,8	0,497	-45,4
SPC3 + TDHA	636,7	0,571	-40,2

Podatki v preglednici 8 prikazujejo vpliv uporabljenega stabilizatorja na povprečni premer, PDI in ZP disperzij liposomov. Povprečni premer liposomov se je gibal med 350 in 640 nm. Najnižji povprečni premer so imeli liposomi, kjer smo kot fosfolipid uporabili Lipoid S100, najvišji pa z uporabo Lipoida SPC3. PDI se ni spreminjal bistveno, gibal se je med 0,45 in 0,67. Opazili smo, da je bil prav tako kot povprečni premer tudi PDI liposomov najnižji v primeru Lipoida S100 in najvišji v primeru Lipoida SPC3. Absolutna vrednost ZP se je gibala med 19 in 50 mV. V primeru uporabe Lipoida S100 smo v primerjavi z Lipoidom SPC3 izmerili višjo absolutno vrednost ZP. Na absolutno vrednost ZP je bistveno vplivala tudi izbira stabilizatorja. Z uporabo GHA smo dobili nižjo absolutno vrednost ZP kot z uporabo TDHA.

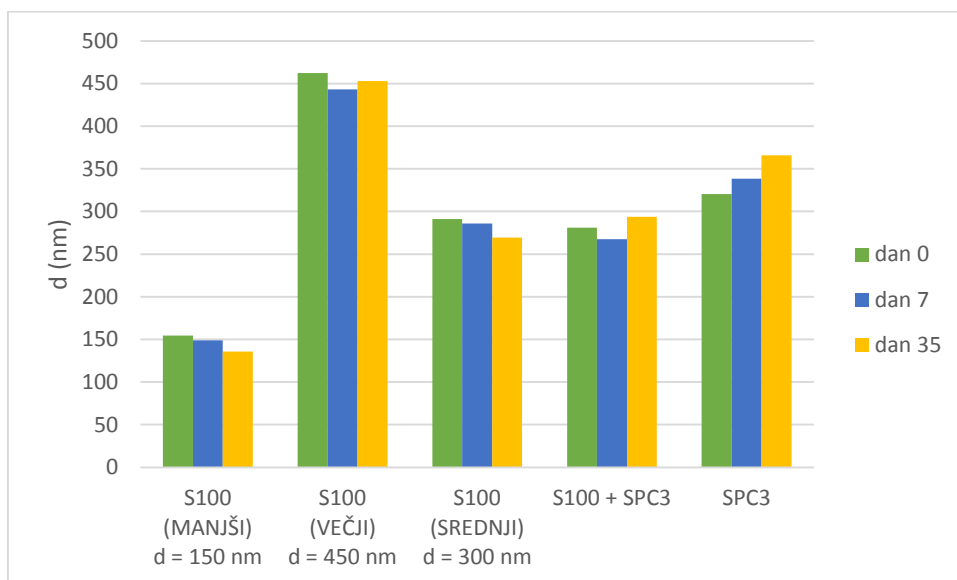
Zaradi ustreznega ZP pri vseh treh formulacijah smo se odločili za nadaljnjo uporabo TDHA.

4.4. Vrednotenje fizikalne stabilnosti disperzij liposomov

Predpogoj za fizikalno stabilnost hidrogelov z vgrajenimi disperzijami liposomov je fizikalna stabilnost disperzij liposomov. Te smo izdelali z metodo dispergiranja fosfolipidov v vodno fazo z rotor-stator homogenizatorjem. Za izdelavo disperzij liposomov različnih velikosti smo kot fosfolipid uporabili Lipoid S100, kot stabilizator pa tavraodeoksiholno kislino (TDHA). Različno velikost liposomov smo dosegli s spremembo tehnoloških pogojev izdelave in z membranskim ekstrudiranjem. Za izdelavo disperzij liposomov različne sestave smo kot fosfolipid uporabili Lipoid S100 (100%), Lipoid SPC3 (100%) ter kombinacijo obeh (50 % Lipoid S100 in 50% Lipoid SPC3), kot stabilizator pa TDHA.

Izdelane disperzije liposomov smo shranjevali v hladilniku in jim ob določenih časovnih točkah izmerili povprečni premer, PDI in ZP. S shranjevanjem v hladilniku smo želeli preprečiti mikrobiološko kontaminacijo, saj smo vzorce vrednotili tudi po enem in petih tednih.

4.4.1. Vpliv staranja na povprečni premer liposomov

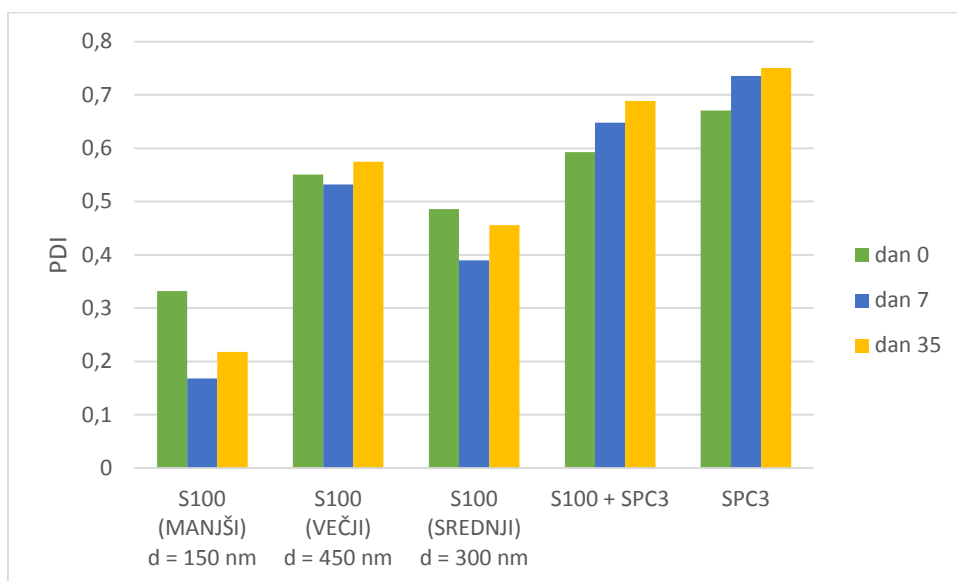


Slika 5: Spremljanje povprečnega premera (d) liposomov različne velikosti in sestave v času shranjevanja.

Slika 5 prikazuje, da so s spremembo pogojev homogeniziranja nastali različno veliki liposomi. Z zmanjšanjem števila obratov/min in časa homogeniziranja so nastali največji liposomi (450 nm), z ekstrudiranjem pa najmanjši liposomi (150 nm). Liposomi različne sestave, narejeni pod enakimi pogoji homogeniziranja, so imeli podoben povprečni premer, vseeno pa so imeli višje vrednosti tisti iz Lipoida SPC3.

Povprečni premer liposomov je bil pri vseh vzorcih po sedmih in 35 dneh primerljiv s povprečnim premerom na dan izdelave. To dokazuje fizikalno stabilnost izdelanih disperzij liposomov, saj ni prišlo do bistvenega povečanja ali zmanjšanja velikosti liposomov.

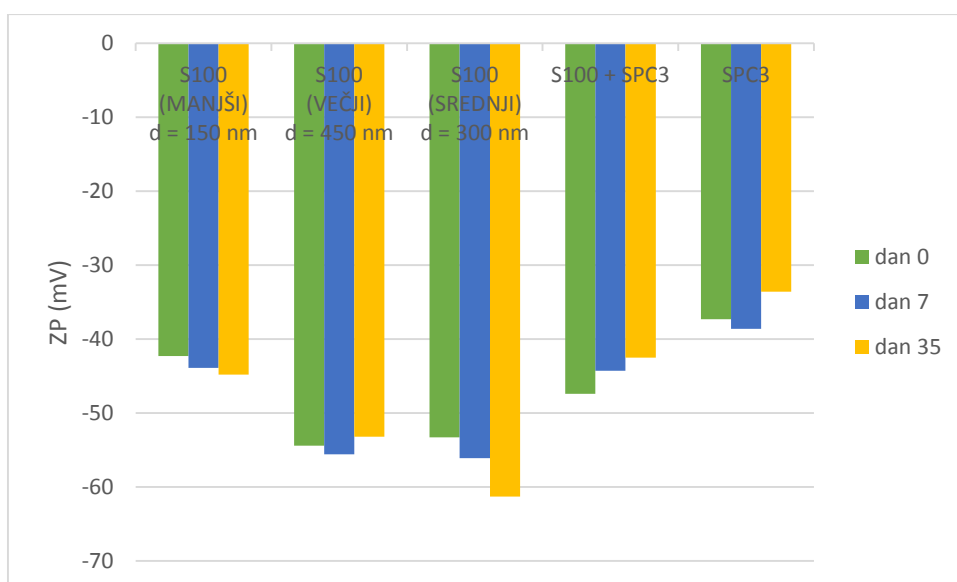
4.4.2. Vpliv staranja na PDI liposomov



Slika 6: Spremljanje PDI liposomov različne velikosti in sestave v času shranjevanja.

Na sliki 6 je prikazan vpliv velikosti in sestave liposomov na PDI v času shranjevanja. Med disperzijami liposomov enake sestave je imela najnižji PDI disperzija z manjšimi liposomi, najvišji pa disperzija z večjimi liposomi. Med disperzijami liposomov različne sestave je imela najnižji PDI disperzija iz Lipoida S100, najvišji pa disperzija iz Lipoida SPC3. V času shranjevanja se PDI liposomov ni bistveno spreminjal.

4.4.3. Vpliv staranja na ZP liposomov



Slika 7: Spremljanje ZP liposomov različne velikosti in sestave v času shranjevanja.

Absolutna vrednost ZP je bila pri vseh izdelanih disperzijah višja od 30 mV. Najnižji ZP smo izmerili liposomom, ki smo jih izdelali iz Lipoida SPC3, najvišji pa pri tistih iz Lipoida S100.

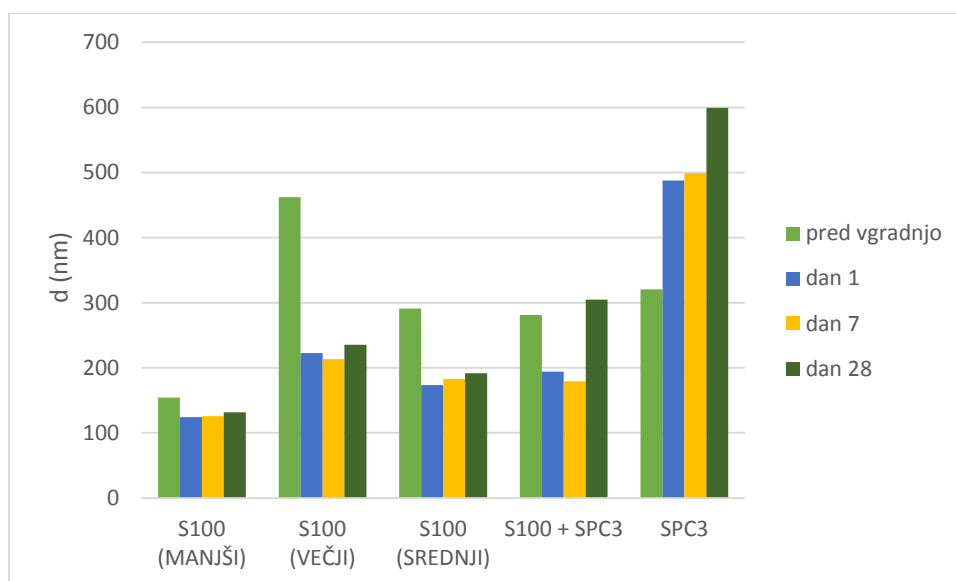
S časom se absolutna vrednost ZP ni bistveno spreminjala, tudi po 7 in 35 dneh je bila v vseh vzorcih višja od 30 mV. To dokazuje fizikalno stabilnost izdelanih disperzij. Zadosten negativni ZP je posledica uporabe tavrdeoksiholne kisline, ki ima vlogo stabilizatorja.

4.5. Vrednotenje fizikalne stabilnosti liposomov po vgradnji v hidrogel

Disperzije liposomov različnih velikosti in sestave za vgradnjo v hidrokele smo izdelali z uporabo enakih formulacij in tehnoloških pogojev izdelave, kot za izdelavo disperzij liposomov, s katerimi smo vrednotili njihovo fizikalno stabilnost.

Izdelane hidrokele z vgrajenimi disperzijami liposomov smo shranjevali v hladilniku in jim ob določenih časovnih točkah izmerili povprečni premer, PDI in ZP. S shranjevanjem v hladilniku smo želeli preprečiti mikrobiološko kontaminacijo, saj smo vzorce vrednotili tudi po enem in štirih tednih.

4.5.1. Vpliv staranja na povprečni premer liposomov po vgradnji v hidrogel



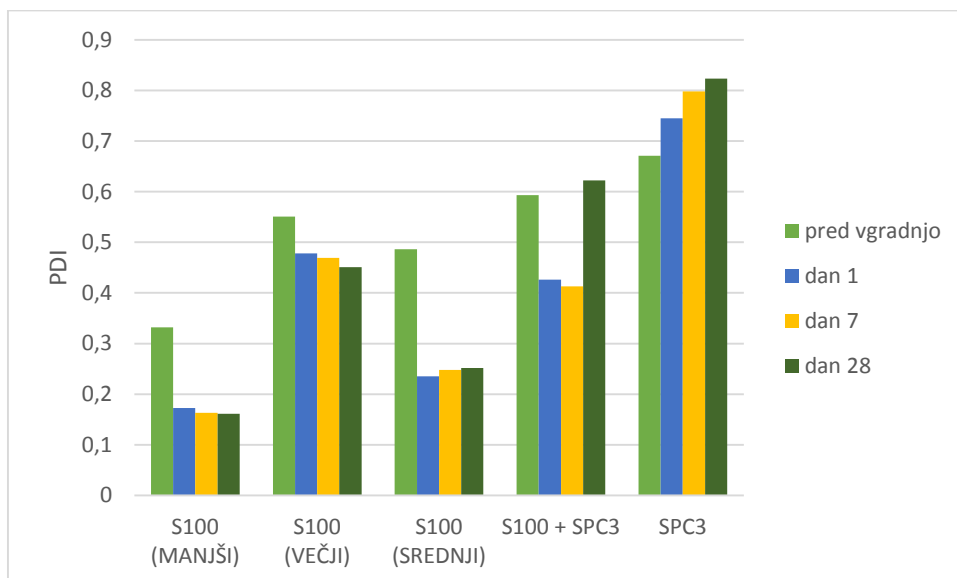
Slika 8: Povprečni premer liposomov pred in po vgradnji disperzij v hidrogel ter njegovo spremljanje v času shranjevanja.

Slika 8 prikazuje vpliv staranja na povprečni premer liposomov po vgradnji v hidrogel. Po vgradnji v hidrogel se je povprečni premer v vseh primerih, z izjemo liposomov iz Lipoida SPC3 zmanjšal. Največjo spremembo povprečnega premera liposomov opazimo pri

liposomih večje velikosti iz Lipoida S100, najmanjšo pa pri liposomih manjše velikosti iz Lipoida S100.

Razlog za spremenjen povprečni premer liposomov po vgradnji v hidrogel je najverjetneje posledica prisotnosti različnih zaestrenih maščobnih kislin v posameznih formulacijah. Fosfolipidni dvosloji liposomov iz nenasičenih fosfatidilholinov (SPC) so pri sobni temperaturi v tekočem kristalnem stanju, zaradi česar so bolj fleksibilni, posamezne molekule fosfolipidov pa se lahko prosto gibajo. Z nabrekanjem hidrogela se je zaradi tega zmanjšal povprečni premer liposomov iz nenasičenega Lipoida S100. Fosfolipidni dvosloji liposomov iz nasičenih fosfatidilholinov (HSPC) pa so pri sobni temperaturi v gel stanju, zaradi česar so bolj rigidni. Z nabrekanjem hidrogela se je zaradi tega povečal povprečni premer liposomov iz nasičenega Lipoida SPC3.

4.5.2. Vpliv staranja na PDI liposomov po vgradnji v hidrogel



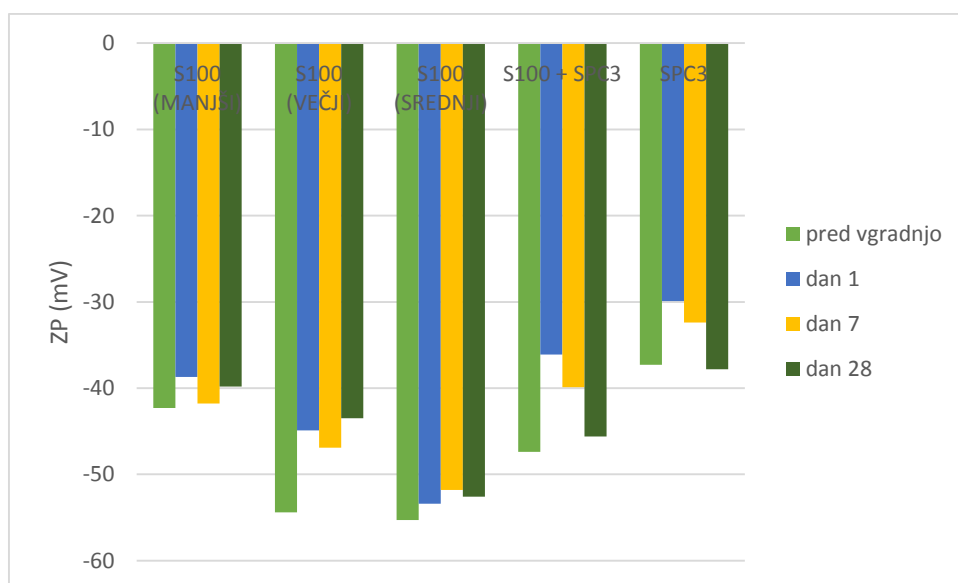
Slika 9: PDI liposomov pred in po vgradnji disperzij v hidrogel ter njegovo spremljanje v času shranjevanja.

Slika 9 prikazuje vpliv staranja na PDI liposomov po vgradnji v hidrogel. Po vgradnji v hidrogel se je PDI v vseh primerih, z izjemo liposomov iz Lipoida SPC3 zmanjšal. Največjo spremembo PDI liposomov opazimo pri liposomih manjše in srednje velikosti iz Lipoida S100, najmanjšo pa pri liposomih iz Lipoida SPC3. S časom se vrednosti PDI niso bistveno spreminjale. Izjemi sta hidrogela z vgrajeno disperzijo liposomov iz kombinacije Lipoida S100 in Lipoida SPC3 ter z disperzijo liposomov iz Lipoida SPC3. Pri hidrogelu z vgrajeno

disperzijo iz kombinacije fosfolipidov se je PDI po 28 dneh povečal. Pri hidrogelu z vgrajeno disperzijo iz Lipoida SPC3 pa se je PDI s časom postopoma povečeval.

Na spremembo PDI je prav tako kot na povprečni premer najverjetneje vplivala prisotnost različnih zaestrenih maščobnih kislin v posameznih formulacijah. Zaradi fleksibilnosti dvoslojev so se povprečni premeri liposomov iz nenasičenega Lipoida S100 v hidrogelu zmanjšali. Posledično se je zmanjšal tudi PDI, saj se je velikost liposomov bolj poenotila. Nasprotno pa se je povprečni premer liposomov iz nasičenega Lipoida SPC3 zaradi rigidnosti dvoslojev v hidrogelu povečal. Posledično se je povečal tudi PDI.

4.5.3. Vpliv staranja na ZP liposomov po vgradnji v hidrogel



Slika 10: ZP liposomov pred in po vgradnji disperzij v hidrogel ter njegovo spremljanje v časi shranjevanja.

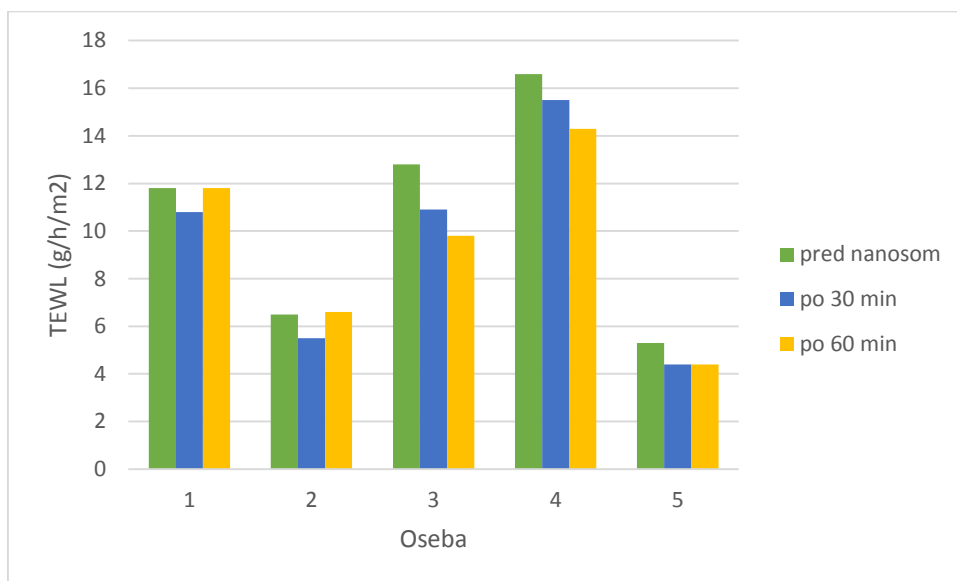
Slika 10 prikazuje vpliv staranja na ZP liposomov po vgradnji v hidrogel. ZP je po vgradnji v hidrogel ostal negativen in je v vseh primerih manjši od -30 mV. To dokazuje fizikalno stabilnost liposomov vgrajenih v hidrokele.

Po vgradnji liposomov v hidrogel se je absolutna vrednost ZP v vseh primerih zmanjšala. S časom se vrednosti pri hidrogelih z vgrajeno disperzijo liposomov iz Lipoida S100 niso bistveno spreminjale. Pri hidrogelu z vgrajeno disperzijo liposomov iz kombinacije fosfolipidov in hidrogelu z vgrajeno disperzijo liposomov iz Lipoida SPC3 pa se je absolutna vrednost ZP postopoma povečevala.

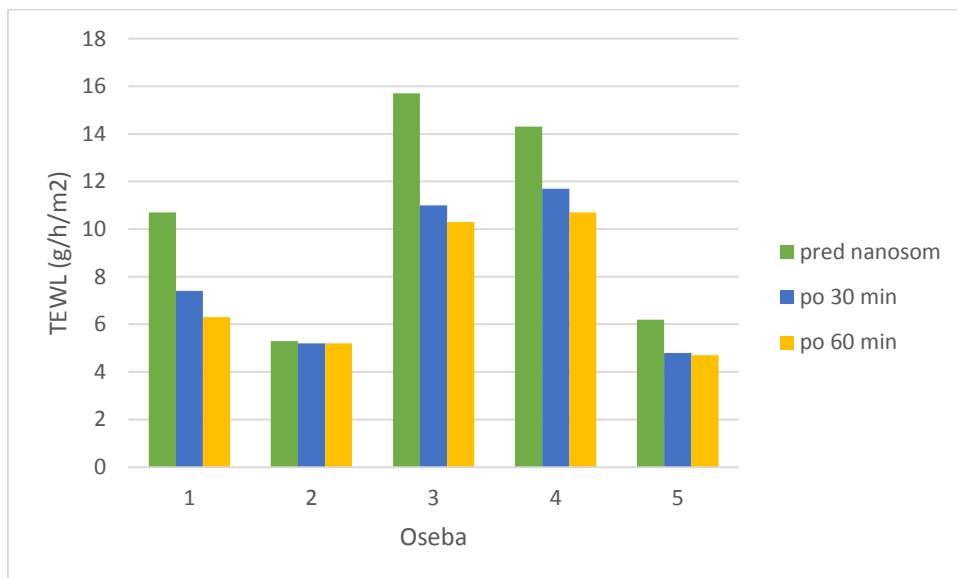
Zmanjšanje absolutne vrednosti ZP liposomov po vgradnji v hidrogel je najverjetneje posledica interakcij med posameznimi komponentami. Zaradi teh interakcij se je zmanjšal učinek tavrdeoksiholne kisline (TDHA) in s tem tudi absolutna vrednost ZP.

4.6. Vpliv velikosti in sestave liposomov vgrajenih v hidrogel na TEWL

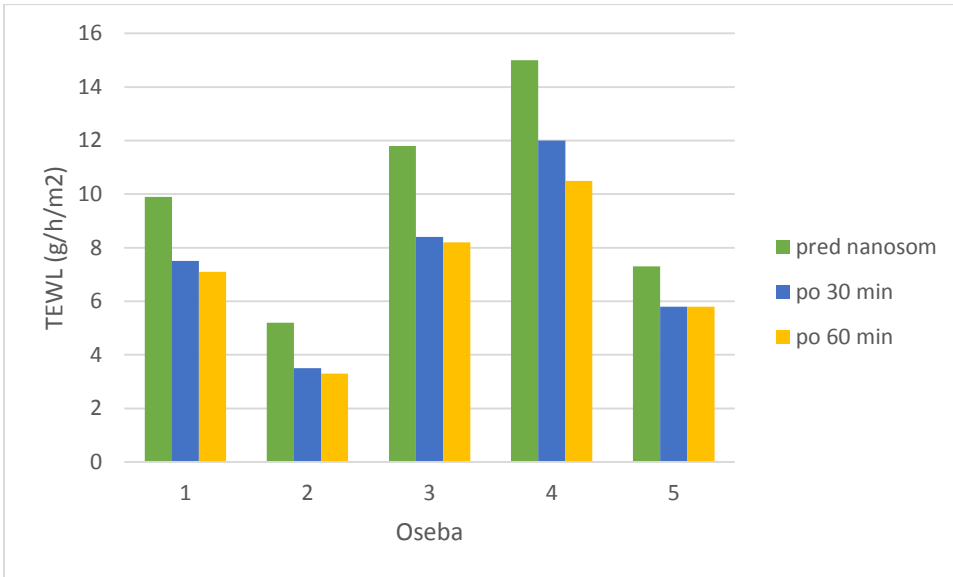
4.6.1. Vpliv praznega hidrogela in hidrogelov z vgrajenimi disperzijami liposomov na TEWL pri posameznih prostovoljcih



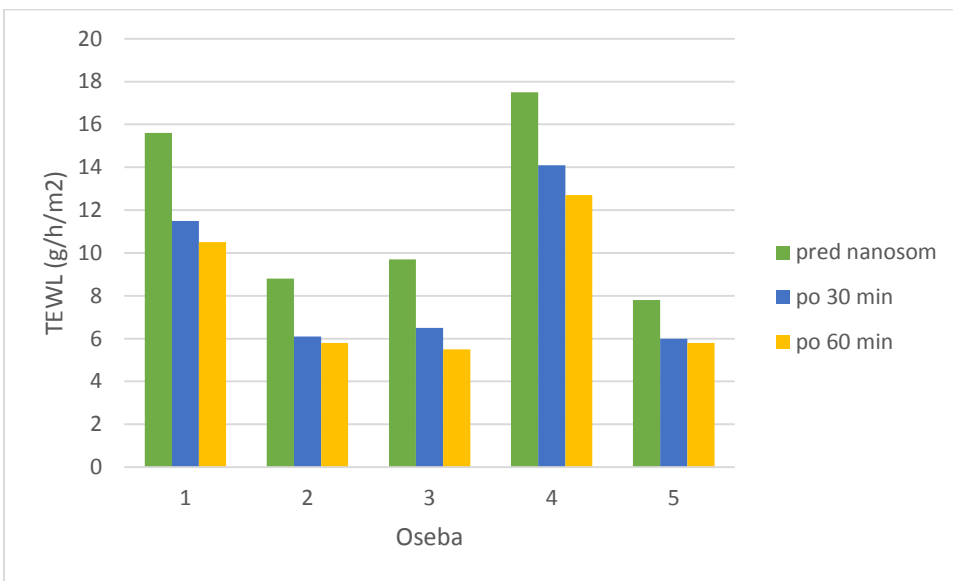
Slika 11: Vpliv praznega hidrogela na TEWL pri 5 prostovoljcih in časovna odvisnost.



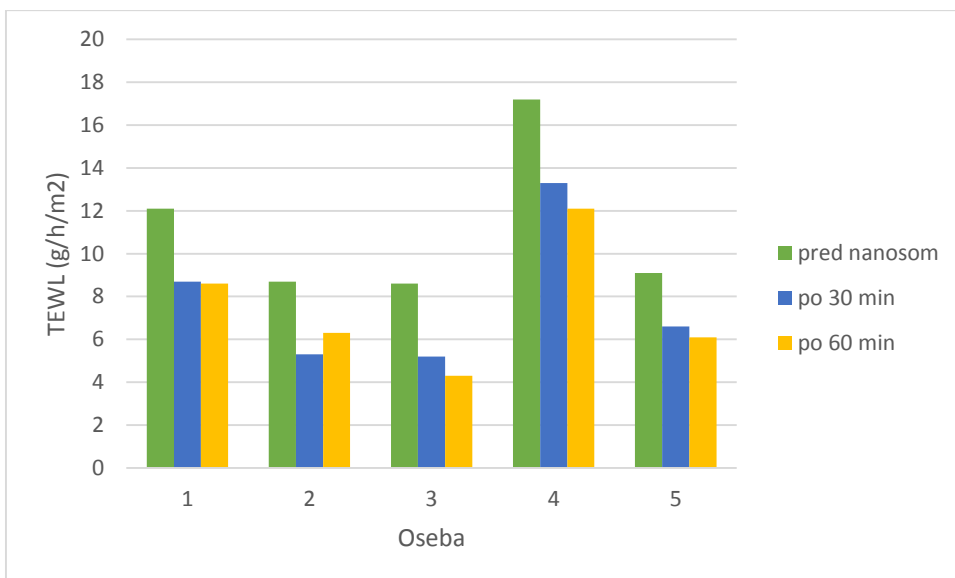
Slika 12: Vpliv hidrogela z vgrajeno disperzijo liposomov manjše velikosti ($d = 124 \text{ nm}$) iz Lipoida S100 na TEWL pri 5 prostovoljcih in časovna odvisnost.



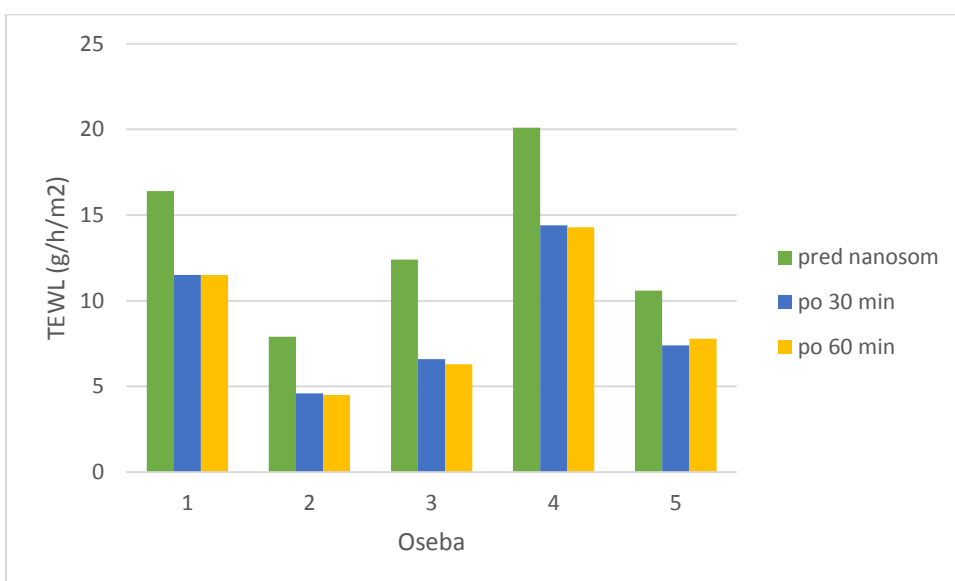
Slika 13: Vpliv hidrogela z vgrajeno disperzijo liposomov večje velikosti ($d = 222 \text{ nm}$) iz Lipoida S100 na TEWL pri 5 prostovoljcih in časovna odvisnost.



Slika 14: Vpliv hidrogela z vgrajeno disperzijo liposomov srednje velikosti ($d = 173 \text{ nm}$) iz Lipoida S100 na TEWL pri 5 prostovoljcih in časovna odvisnost.



Slika 15: Vpliv hidrogela z vgrajeno disperzijo liposomov iz kombinacije Lipoida S100 in Lipoida SPC3 na TEWL pri 5 prostovoljcih in časovna odvisnost.

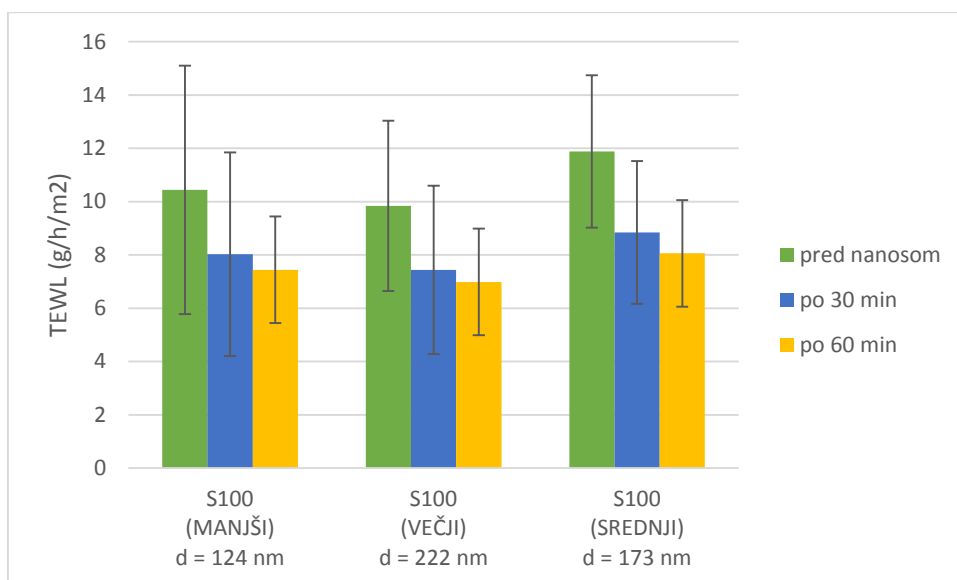


Slika 16: Vpliv hidrogela z vgrajeno disperzijo liposomov iz Lipoida SPC3 na TEWL pri 5 prostovoljcih in časovna odvisnost.

Na slikah od 11 do 16 je prikazan vpliv praznega hidrogela in hidrogelov z vgrajenimi disperzijami liposomov različne velikosti in sestave na TEWL pri 5 prostovoljcih. Prikazana je primerjava med TEWL pred nanosom hidrogelov ter 30 in 60 minut po nanosu le-teh. Variabilnost med prostovoljci je bila velika, saj so se vrednosti TEWL pred nanosom hidrogelov gibale med 7,9 in 20,1.

V vseh primerih so se vrednosti TEWL po 30 minutah znižale glede na stanje pred nanosom hidrogelov. Po 60 minutah se vrednosti večinoma niso bistveno spremenile glede na stanje po 30 minutah.

4.6.2. Primerjava vpliva velikosti liposomov vgrajenih v hidrogel na TEWL



Slika 17: Vpliv hidrogelov z vgrajenimi disperzijami liposomov različne velikosti na TEWL in časovna odvisnost. Rezultati so podani kot povprečje 5 meritev (5 prostovoljcev) s standardno deviacijo.

Na sliki 17 je prikazan vpliv hidrogelov z vgrajenimi disperzijami liposomov različne velikosti na TEWL. Po 30 minutah so se TEWL vrednosti pri vseh treh uporabljenih hidrogelih zmanjšale. Formulacija z liposomi manjše velikosti je po 30 minutah zmanjšala TEWL za 23 %, formulacija z liposomi večje velikosti za 24 %, formulacija z liposomi srednje velikosti pa za 26 %. Po 60 minutah so hidrogeli z vgrajenimi liposomi še dodatno zmanjšali vrednosti TEWL. V primerjavi s stanjem pred nanosom hidrogelov sta formulaciji z liposomi manjše in večje velikosti zmanjšali TEWL za 29 %, formulacija z liposomi srednje velikosti pa za 32 %.

Preglednica 9: Zmanjšanje TEWL po 30 in 60 minutah od nanosa hidrogelov brez in z liposomi različne velikosti. Rezultati so podani kot povprečna razlika med vrednostjo TEWL po 30 oz. 60 min in vrednostjo pred nanosom, s standardno deviacijo.

	Δ TEWL30 (SD)	p	Δ TEWL60 (SD)	p
Hidrogel brez liposomov	-1,18 (0,41)	0,003	-1,22 (1,38)	0,120
Hidrogel z manjšimi liposomi	-2,42 (1,76)	0,037	-3,00 (2,16)	0,036
Hidrogel s srednje velikimi liposomi	-3,04 (0,86)	0,001	-3,94 (1,43)	0,004
Hidrogel z večjimi liposomi	-2,40 (0,82)	0,003	-2,82 (1,27)	0,008
p-ANOVA	0,088		0,098	

p-vrednost opredeljuje značilnost razlike v vrednosti TEWL pred nanosom in po nanosu posameznega hidrogela (parni t- test).

p-ANOVA podaja značilnost razlike med posameznimi hidrogeli (ANOVA enega faktorja).

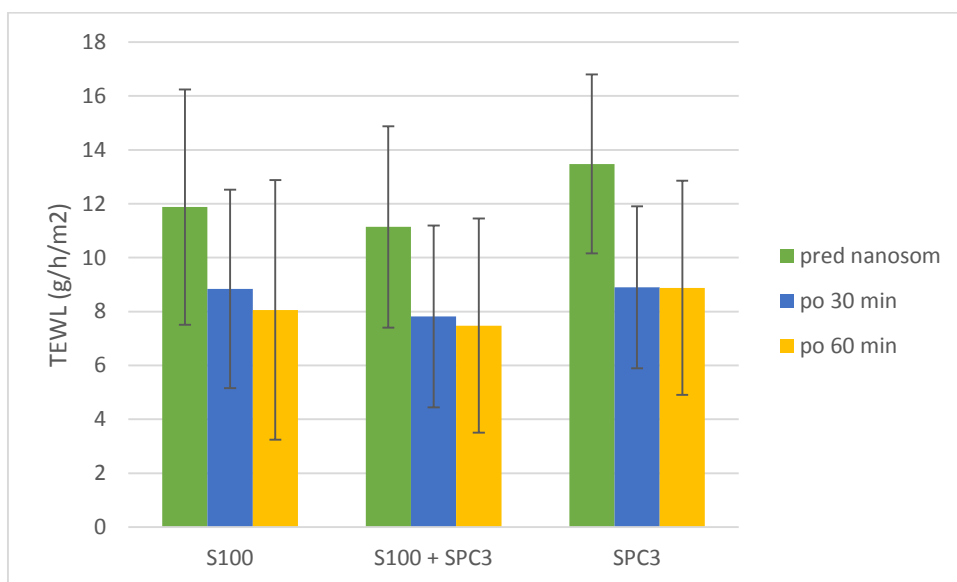
Nadpisane male črke označujejo značilne razlike med pari (Post hoc test po Bonferoniju, $p < 0,05$).

S statistično analizo podatkov smo pri vseh hidrogelih z vgrajenimi liposomi ugotovili značilno zmanjšanje TEWL po 30 in 60 minutah glede na stanje pred nanosom hidrogelov (preglednica 9). Nasprotno pa je hidrogel brez liposomov značilno zmanjšal TEWL le po 30 minutah. V skladu z rezultati lahko trdimo, da prisotnost liposomov v hidrogelu značilno zmanjša TEWL in v nasprotju s hidrogelom brez liposomov vrednost zadrži tudi po 60 minutah. Pozitiven učinek liposomov na TEWL, tudi še po 60 minutah, je posledica prisotnosti fosfolipidov, ki se zaradi strukturne podobnosti s kožnimi lipidi vključijo v lipidni dvosloj in tako preprečijo izhlapevanje vode.

Glede na rezultate ANOVE enega faktorja smo ugotovili, da razlika med posameznimi formulacijami glede vpliva na TEWL po 30 in 60 minutah ni značilna ($P > 0,05$). V literaturi nismo zasledili, kako velikost liposomov vpliva na vrednosti TEWL. Opisana je bila le boljše penetracija fluorescentno označenih spojin, vgrajenih v manjše liposome. Zaradi majhnih razlik v velikosti liposomov (50 nm) nismo pričakovali, da bodo imele formulacije različen vpliv na TEWL.

Zaradi velike variabilnosti rezultatov in majhnega števila prostovoljcev ne moremo trditi, da velikost liposomov vpliva na zmanjšanje TEWL. Vpliv hidrogela in časa na znižanje TEWL smo ovrednotili tudi z multivariatno analizo. Z ANOVO dveh faktorjev smo ugotovili, da je vpliv časa od nanosa hidrogela (30 proti 60 min) neznačilen ($P > 0,05$), vrsta hidrogela pa na znižanje TEWL vpliva značilno ($P = 0,007$).

4.6.3. Primerjava vpliva sestave liposomov vgrajenih v hidrokele na TEWL



Slika 18: Vpliv hidrogelov z vgrajenimi disperzijami liposomov različne sestave na TEWL in časovna odvisnost. Rezultati so podani kot povprečje 5 meritev (5 prostovoljcev) s standardno deviacijo.

Na sliki 18 je prikazan vpliv hidrogelov z vgrajenimi disperzijami liposomov različne sestave na TEWL. Po 30 minutah so se vrednosti TEWL pri vseh treh formulacijah zmanjšale. Formulacija iz Lipoida S100 srednje velikosti je po 30 minutah zmanjšala TEWL za 26 %, formulacija iz kombinacije Lipoida S100 in Lipoida SPC3 za 30 % ter formulacija iz Lipoida SPC3 za 34 %. Po 60 minutah so hidrogeli z vgrajenimi liposomi še dodatno zmanjšali vrednosti TEWL. Glede na stanje pred nanosom hidrogelov je po 60 minutah formulacija iz Lipoida S100 zmanjšala TEWL za 32 %, formulacija iz kombinacije Lipoida S100 in Lipoida SPC3 za 33 % ter formulacija iz Lipoida SPC3 za 34 %.

Preglednica 10: Zmanjšanje TEWL po 30 in 60 minutah od nanosa hidrogelov brez in z liposomi različne sestave. Rezultati so podani kot povprečna razlika med vrednostjo TEWL po 30 oz. 60 min in vrednostjo pred nanosom, s standardno deviacijo.

	Δ TEWL30 (SD) p	Δ TEWL60 (SD) p
Hidrogel brez liposomov	-1,18 (0,41) ^{a, b, c} 0,003	-1,22 (1,38) ^{d, e} 0,120
Hidrogel z liposomi (S100)	-3,04 (0,86) ^a 0,001	-3,94 (1,43) ^d 0,004
Hidrogel z liposomi (S100 + SPC3)	-3,32 (0,51) ^b 0,000	-3,66 (1,06) 0,002
Hidrogel z liposomi (SPC3)	-4,58 (1,26) ^c 0,001	-4,60 (1,45) ^e 0,002
p-ANOVA	0,000	0,006

p-vrednost opredeljuje značilnost razlike v vrednosti TEWL pred nanosom in po nanosu posameznega hidrogela (parni t- test).

p-ANOVA podaja značilnost razlike med posameznimi hidrogeli (ANOVA enega faktorja). Nadpisane male črke označujejo značilne razlike med pari (Post hoc test po Bonferoniju, $p < 0,05$).

S statistično analizo podatkov smo pri vseh hidrogelih z vgrajenimi liposomi ugotovili značilno zmanjšanje TEWL po 30 in 60 minutah glede na stanje pred nanosom hidrogelov (preglednica 10). Nasprotno pa je hidrogel brez liposomov značilno zmanjšal TEWL le po 30 minutah. V skladu z rezultati lahko trdimo, da prisotnost liposomov v hidrogelu značilno zmanjša TEWL in v nasprotju s hidrogelom brez liposomov vrednost zadrži tudi po 60 minutah.

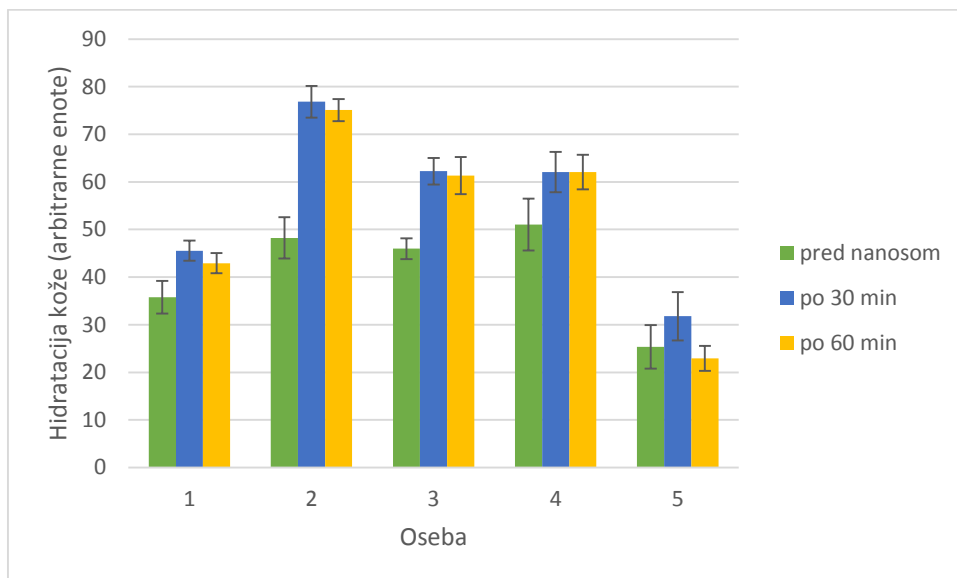
Glede na rezultate ANOVE enega faktorja smo ugotovili, da je razlika med posameznimi formulacijami glede vpliva na TEWL po 30 ($P = 0,000$) in 60 minutah ($P = 0,006$) značilna. Post Hoc testi so pokazali značilno razliko med hidrogelom brez liposomov in hidrogelom z liposomi iz Lipoida S100 po 30 ($P = 0,016$) in 60 minutah ($P = 0,033$), značilno razliko med hidrogelom brez liposomov in hidrogelom z liposomi iz kombinacije Lipoida S100 in Lipoida SPC3 po 30 minutah ($P = 0,005$) ter značilno razliko med hidrogelom brez liposomov in hidrogelom z liposomi iz Lipoida SPC3 po 30 ($P = 0,000$) in 60 minutah ($P = 0,006$). Glede na objavljene raziskave smo med posameznimi formulacijami z vgrajenimi liposomi različne sestave pričakovali statistično značilne razlike glede vpliva na TEWL.

Fosfolipidni dvosloji liposomov iz nenasičenih fosfatidilholinov (SPC) so namreč pri kožni temperaturi v tekočem kristalnem stanju, zaradi česar hitreje penetrirajo v globlje plasti kože, kjer reagirajo z intercelularnimi lipidi in ne okrepijo barierne funkcije kože. Fosfolipidni dvosloji liposomov iz nasičenih fosfatidilholinov (HSPC) pa so v gel stanju, zaradi česar se na površini kože zlijejo s kožnimi lipidi in tako stabilizirajo normalen TEWL. Vendar pa imajo liposomi iz SPC posreden učinek podpiranja tvorbe ceramida I, ki je eden najpomembnejših sestavin za aktivacijo bariere in tako tudi rahlo zmanjšajo TEWL. Med posameznimi formulacijami z liposomi sicer ni bilo statističnih razlik, vendar smo 30 minut po aplikaciji hidrogelov opazili večje zmanjšanje vrednosti TEWL (izraženo v %) z uporabo formulacije iz nasičenega Lipoida SPC3. Zmanjšanje TEWL med formulacijo iz nenasičenega Lipoida S100 in formulacijo iz nasičenega Lipoida SPC3 se je po 30 minutah razlikovalo za 8 %. Po 60 minutah se je zmanjšanje TEWL med omenjenima formulacijama razlikovalo za 2 %, kar je lahko posledica tvorbe ceramida I, katero posredno podpirajo nenasičeni fosfatidilholini v Lipoidu S100.

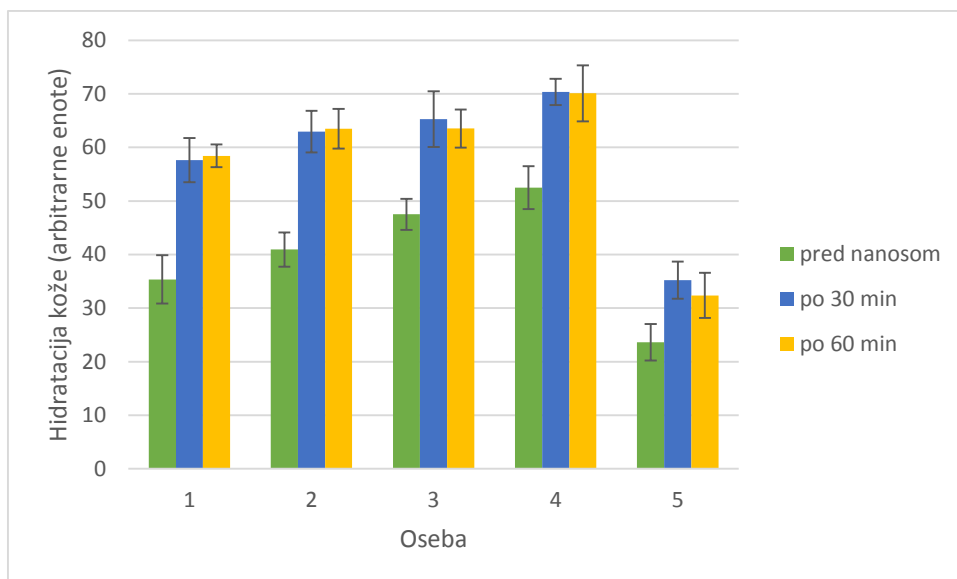
Zaradi velike variabilnosti rezultatov in majhnega števila prostovoljcev ne moremo trditi, da različna sestava liposomov različno vpliva na zmanjšanje TEWL. Vpliv hidrogela in časa na znižanje TEWL smo ovrednotili tudi z multivariatno analizo. Z ANOVO dveh faktorjev smo ugotovili, da je vpliv časa od nanosa hidrogela (30 proti 60 min) neznačilen ($P > 0,05$), vrsta hidrogela pa na znižanje TEWL vpliva značilno ($P = 0,000$).

4.7. Vpliv velikosti in sestave liposomov vgrajenih v hidrogel na hidratacijo kože pri posameznih prostovoljcih

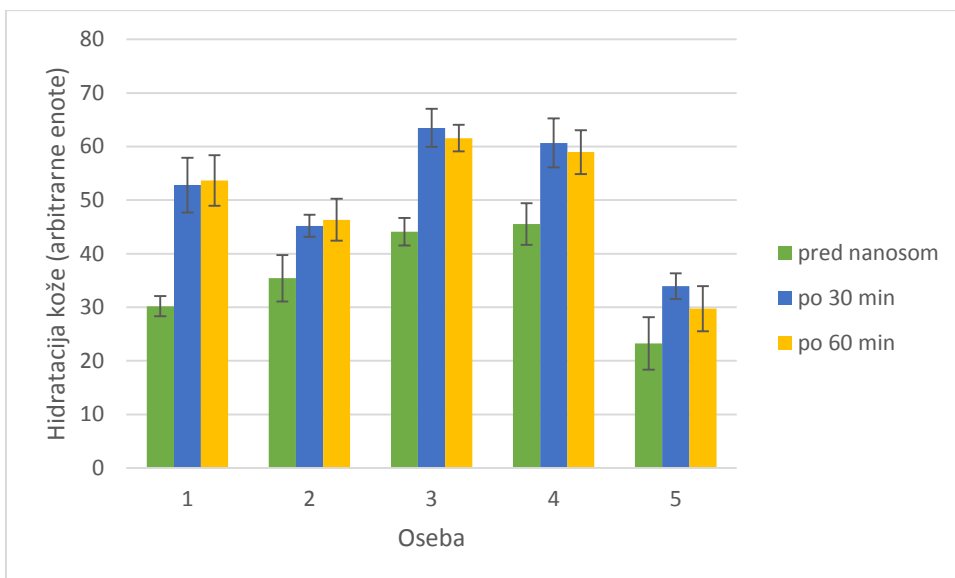
4.7.1. Vpliv praznega hidrogela in hidrogelov z vgrajenimi disperzijami liposomov na hidratacijo kože



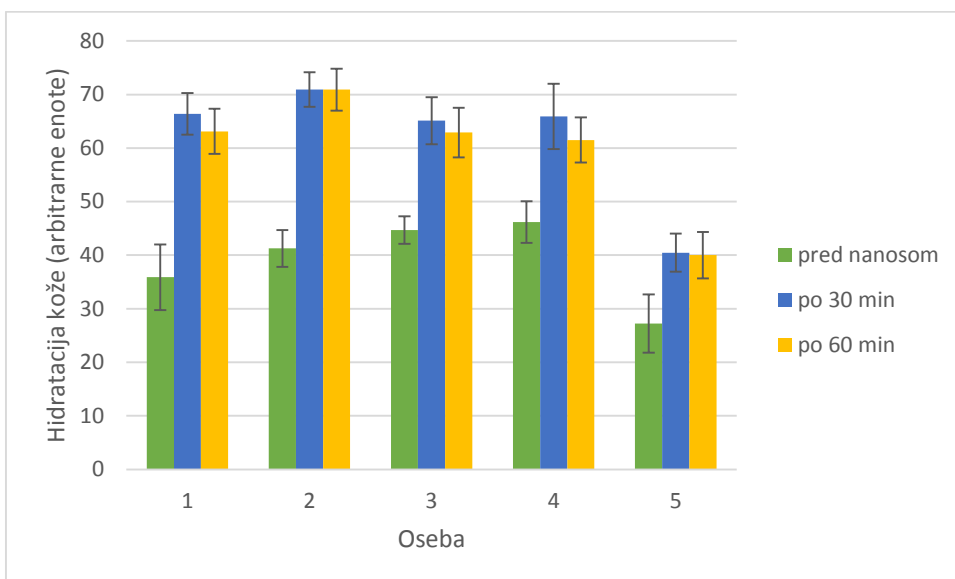
Slika 19: Vpliv praznega hidrogela na hidratacijo kože in časovna odvisnost. Rezultati so podani kot povprečje 9 meritev (pri vsakem izmed 5 prostovoljcev) s standardno deviacijo.



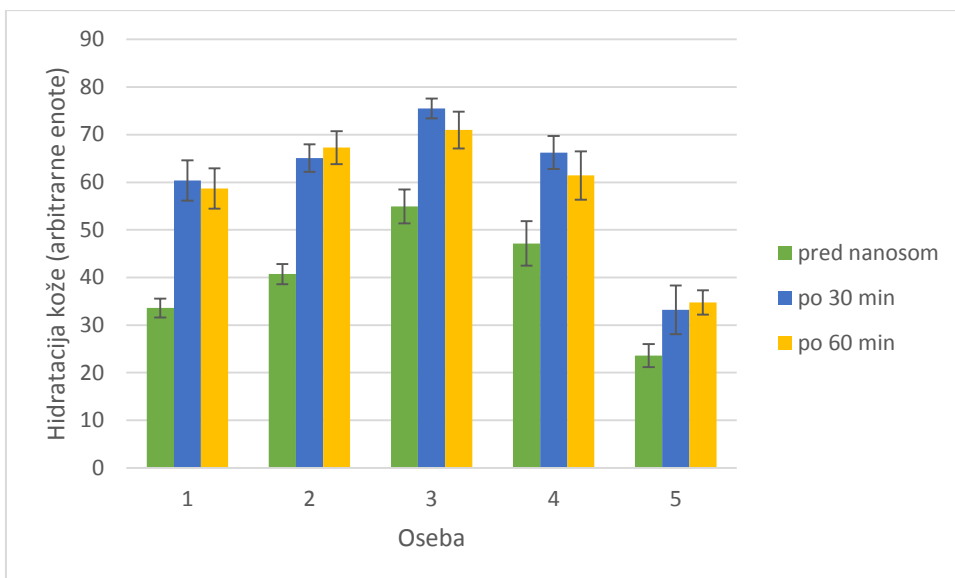
Slika 20: Vpliv hidrogela z vgrajeno disperzijo liposomov manjše velikosti ($d = 124 \text{ nm}$) iz Lipoida S100 na hidratacijo kože in časovna odvisnost. Rezultati so podani kot povprečje 9 meritev (pri vsakem izmed 5 prostovoljcev) s standardno deviacijo.



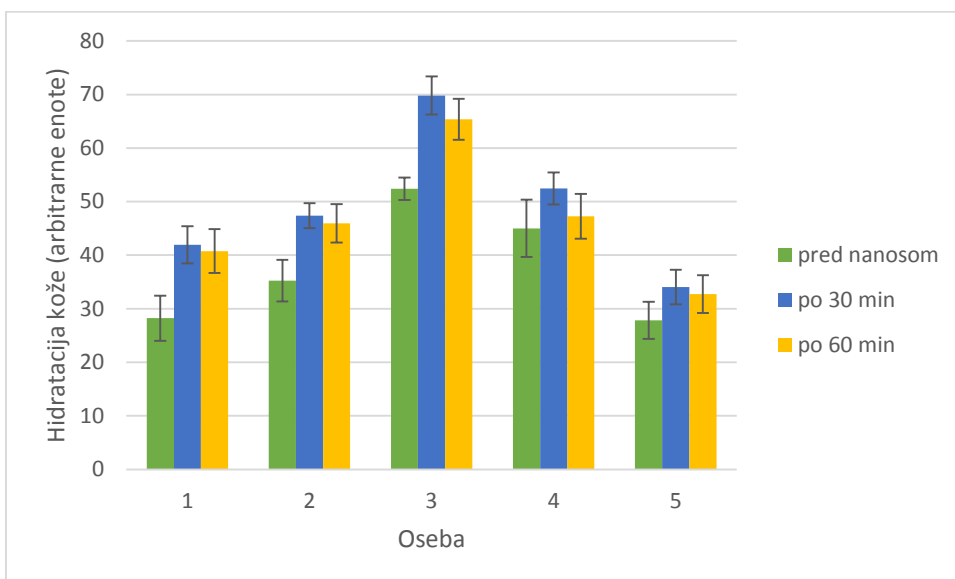
Slika 21: Vpliv hidrogela z vgrajeno disperzijo liposomov večje velikosti ($d = 222 \text{ nm}$) iz Lipoida S100 na hidratacijo kože in časovna odvisnost. Rezultati so podani kot povprečje 9 meritev (pri vsakem izmed 5 prostovoljcev) s standardno deviacijo.



Slika 22: Vpliv hidrogela z vgrajeno disperzijo liposomov srednje velikosti ($d = 173 \text{ nm}$) iz Lipoida S100 na hidratacijo kože in časovna odvisnost. Rezultati so podani kot povprečje 9 meritev (pri vsakem izmed 5 prostovoljcev) s standardno deviacijo.



Slika 23: Vpliv hidrogela z vgrajeno disperzijo liposomov iz kombinacije Lipoida S100 in Lipoida SPC3 na hidratacijo kože in časovna odvisnost. Rezultati so podani kot povprečje 9 meritev (pri vsakem izmed 5 prostovoljcev) s standardno deviacijo.



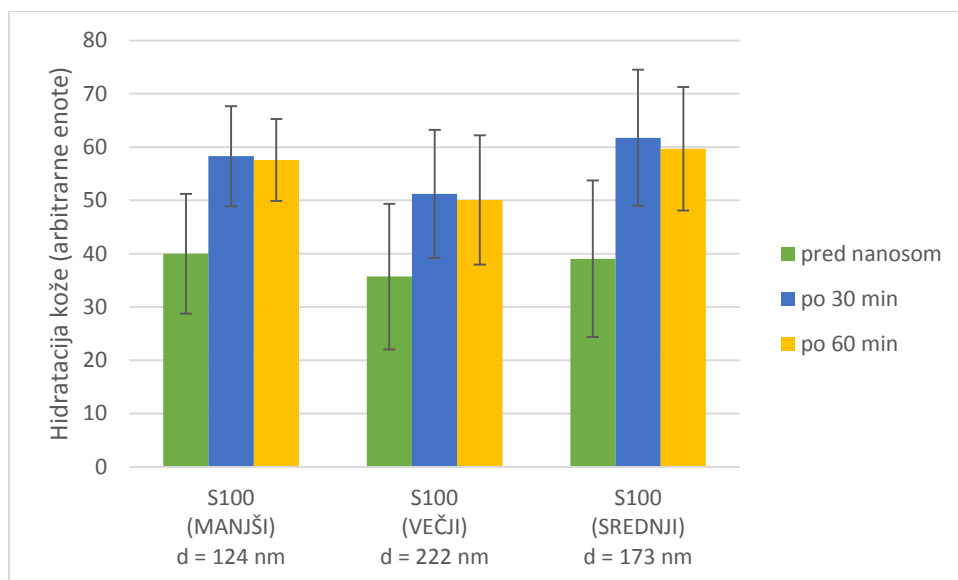
Slika 24: Vpliv hidrogela z vgrajeno disperzijo liposomov iz Lipoida SPC3 na hidratacijo kože in časovna odvisnost. Rezultati so podani kot povprečje 9 meritev (pri vsakem izmed 5 prostovoljcev) s standardno deviacijo.

Na slikah od 19 do 24 je prikazan vpliv praznega hidrogela in hidrogelov z vgrajenimi disperzijami liposomov različne velikosti in sestave na hidratacijo kože pri 5 prostovoljcih. Prikazana je primerjava med hidratacijo kože pred nanosom hidrogelov ter 30 in 60 minut

po nanosu le-teh. Variabilnost med prostovoljci je bila velika, saj so se vrednosti hidratacije kože pred nanosom hidrogelov gibale med 25 in 52.

V vseh primerih so se vrednosti hidratacije kože po 30 minutah zvišale glede na stanje pred nanosom hidrogelov. Tudi po 60 minutah so vrednosti hidratacije kože ostale višje kot pred nanosom hidrogelov, vendar so bile glede na vrednosti po 30 minutah nižje.

4.7.2. Primerjava vpliva velikosti liposomov vgrajenih v hidrogel na hidratacijo kože



Slika 25: Vpliv hidrogelov z vgrajenimi disperzijami liposomov različne velikosti na hidratacijo kože in časovna odvisnost. Rezultati so podani kot povprečje meritev pri 5 prostovoljcih (pri vsakem po 9 meritev) s standardno deviacijo.

Na sliki 25 je prikazan vpliv hidrogelov z vgrajenimi disperzijami liposomov različne velikosti na hidratacijo kože. Po 30 minutah so se vrednosti hidratacije kože pri vseh treh formulacijah povečale. Formulacija z liposomi manjše velikosti je po 30 minutah povečala hidratacijo kože za 46 %, formulacija z liposomi večje velikosti za 44 %, formulacija z liposomi srednje velikosti pa za 58 %. Po 60 minutah se vrednosti hidratacije kože niso bistveno spremenile, vendar so se v primerjavi z vrednostmi po 30 minutah zmanjšale. V primerjavi s stanjem pred nanosom hidrogelov je formulacija z liposomi manjše velikosti po 60 minutah povečala hidratacijo kože za 44 %, formulacija z liposomi večje velikosti za 40 %, formulacija z liposomi srednje velikosti pa za 53 %.

Preglednica 11: Povečanje hidratacije kože po 30 in 60 minutah od nanosa hidrogelov brez in z liposomi različne velikosti. Rezultati so podani kot povprečna razlika med vrednostjo hidratacije po 30 oz. 60 min in vrednostjo pred nanosom, s standardno deviacijo.

	Δ Hidratacija30 (SD)	p	Δ Hidratacija60 (SD)	p
Hidrogel brez liposomov	14,43 (8,69)	0,021	11,61 (10,76)	0,073
Hidrogel z manjšimi liposomi	18,35 (4,32)	0,001	17,60 (5,81)	0,002
Hidrogel s srednje velikimi liposomi	22,70 (7,31)	0,002	20,63 (7,43)	0,003
Hidrogel z večjimi liposomi	15,53 (5,52)	0,003	14,36 (6,47)	0,008
p-ANOVA	0,245		0,328	

p-vrednost opredeljuje značilnost razlike v vrednosti hidratacije kože pred nanosom in po nanosu posameznega hidrogela (parni t- test).

p-ANOVA podaja značilnost razlike med posameznimi hidrogeli (ANOVA enega faktorja). Nadpisane male črke označujejo značilne razlike med pari (Post hoc test po Bonferoniju, $p < 0,05$).

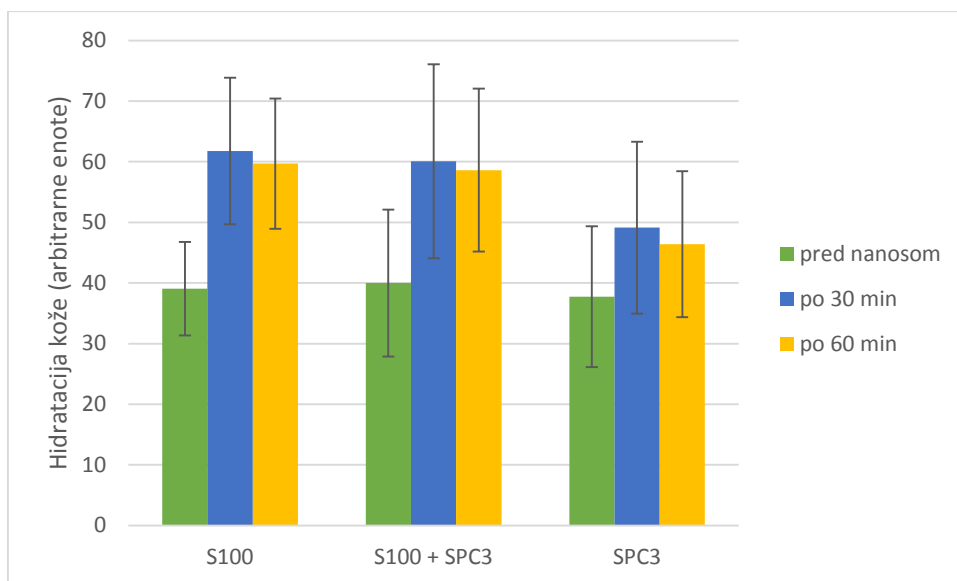
S statistično analizo podatkov smo pri vseh hidrogelih z vgrajenimi liposomi ugotovili značilno povečanje hidratacije kože po 30 in 60 minutah glede na stanje pred nanosom hidrogelov. Nasprotno pa je hidrogel brez liposomov značilno povečal hidratacijo kože le po 30 minutah. V skladu z rezultati lahko trdimo, da prisotnost liposomov v hidrogelu značilno poveča hidratacijo kože in v nasprotju s hidrogelom brez liposomov vrednost zadrži tudi po 60 minutah.

Glede na rezultate ANOVE enega faktorja smo ugotovili, da razlika med posameznimi formulacijami glede vpliva na hidratacijo kože po 30 in 60 minutah ni značilna ($P > 0,05$). V literaturi nismo zasledili, kako velikost liposomov vpliva na vrednosti hidratacije kože. Zaradi majhnih razlik v velikosti liposomov nismo pričakovali, da bodo imele posamezne formulacije različen vpliv na hidratacijo kože.

Zaradi velike variabilnosti rezultatov in majhnega števila prostovoljcev ne moremo trditi, da velikost liposomov značilno vpliva na hidratacijo kože. Vpliv hidrogela in časa na hidratacijo kože smo ovrednotili tudi z multivariatno analizo. Z ANOVO dveh faktorjev smo

ugotovili, da sta vpliva časa od nanosa hidrogela (30 proti 60 min) in vrste hidrogela na povečanje hidratacije kože neznačilna ($P > 0,05$).

4.7.3. Primerjava vpliva sestave liposomov vgrajenih v hidrogel na hidratacijo kože



Slika 26: Vpliv hidrogelov z vgrajenimi disperzijami liposomov različne sestave na hidratacijo kože in časovna odvisnost. Rezultati so podani kot povprečje meritev pri 5 prostovoljcih (pri vsakem po 9 meritev) s standardno deviacijo.

Na sliki 26 je prikazan vpliv hidrogelov z vgrajenimi disperzijami liposomov različne sestave na hidratacijo kože. Po 30 minutah so se vrednosti hidratacije kože pri vseh treh formulacijah povečale. Formulacija iz Lipoida S100 je po 30 minutah povečala hidratacijo kože za 58 %, formulacija iz kombinacije Lipoida S100 in Lipoida SPC3 za 50 % ter formulacija iz Lipoida SPC3 za 31 %. Po 60 minutah so v vseh primerih vrednosti še vedno ostale višje od prvotnih, vendar so se glede na vrednosti po 30 minutah zmanjšale. Glede na stanje pred nanosom hidrogelov je po 60 minutah formulacija iz Lipoida S100 povečala hidratacijo kože za 53 %, formulacija iz kombinacije Lipoida S100 in Lipoida SPC3 za 47 % ter iz Lipoida SPC3 za 23 %.

Preglednica 12: Povečanje hidratacije kože po 30 in 60 minutah od nanosa hidrogelov brez in z liposomi različne sestave. Rezultati so podani kot povprečna razlika med vrednostjo hidratacije po 30 oz. 60 min in vrednostjo pred nanosom, s standardno deviacijo.

	Δ Hidratacija30 (SD)	p	Δ Hidratacija60 (SD)	p
Hidrogel brez liposomov	14,43 (8,69)	0,021	11,61 (10,76)	0,073
Hidrogel z liposomi (S100)	22,70 (7,31)	0,002	20,63 (7,43)	0,003
Hidrogel z liposomi (S100 + SPC3)	20,08 (6,60)	0,002	18,63 (6,83)	0,004
Hidrogel z liposomi (SPC3)	11,39 (4,59)	0,005	8,68 (4,83)	0,016
p-ANOVA	0,077		0,083	

p-vrednost opredeljuje značilnost razlike v vrednosti hidratacije kože pred nanosom in po nanosu posameznega hidrogela (parni t- test).

p-ANOVA podaja značilnost razlike med posameznimi hidrogeli (ANOVA enega faktorja). Nadpisane male črke označujejo značilne razlike med pari (Post hoc test po Bonferoniju, $p < 0,05$).

S statistično analizo podatkov smo pri vseh hidrogelih z vgrajenimi liposomi ugotovili značilno povečanje hidratacije kože po 30 in 60 minutah glede na stanje pred nanosom hidrogelov. Nasprotno pa je hidrogel brez liposomov značilno povečal hidratacijo kože le po 30 minutah. V skladu z rezultati lahko trdimo, da prisotnost liposomov v hidrogelu značilno poveča hidratacijo kože in v nasprotju s hidrogelom brez liposomov vrednost zadrži tudi po 60 minutah.

Glede na rezultate ANOVE enega faktorja smo ugotovili, da razlika med posameznimi formulacijami glede vpliva na hidratacijo kože po 30 in 60 minutah ni značilna ($P > 0,05$). Glede na objavljene raziskave smo pričakovali razliko med posameznimi formulacijami različne sestave glede vpliva na hidratacijo kože. Lipidni dvosloji liposomov iz nenasičenih fosfatidilholinov (SPC) so namreč bolj fleksibilni, zaradi česar liposomi hitreje penetrirajo v globlje plasti kože. Nasprotno pa so lipidni dvosloji liposomov iz nasičenih fosfatidilholinov (HSPC) bolj rigidni in se na površini kože zlijejo z kožnimi lipidi. Med posameznimi formulacijami sicer ni bilo statistično značilnih razlik, vendar smo po 30 in 60 minutah izmerili večje povečanje hidratacije kože (izraženo v %) z uporabo formulacije iz

nenasičenega Lipoida S100. Povečanje hidratacije kože se je po 30 minutah med formulacijama iz nenasičenega Lipoida S100 in nasičenega Lipoida SPC3 razlikovala za 27 %, po 60 minutah pa za 30 %. Takšni rezultati so lahko posledica prisotnosti različnih zaestrenih maščobnih kislin. Liposomi iz nenasičenega Lipoida S100 zaradi fleksibilnost fosfolipidnih dvoslojev hitreje penetrirajo v globlje plasti kože. Ker liposomi vsebujejo veliko vode tako bolj hidratirajo posamezne plasti kože. Nasprotno pa se liposomi iz Lipoida SPC3 zaradi rigidnosti fosfolipidnih dvoslojev na površini kože zlijejo s kožnimi lipidi in ne hidratirajo globljih plasti kože.

Zaradi velike variabilnosti rezultatov in majhnega števila prostovoljcev ne moremo trditi, da sestava liposomov vpliva na hidratacijo kože. Z ANOVO dveh faktorjev smo ugotovili, da je vpliv časa od nanosa hidrogela (30 proti 60 min) neznačilen ($P > 0,05$), vrsta hidrogela pa na povečanje hidratacije kože vpliva značilno ($P = 0,004$).

5. Sklep

Na osnovi eksperimentalnih rezultatov smo ugotovili, da metoda izdelave disperzij liposomov vpliva na povprečni premer in PDI liposomov. Z metodo hidratacije fosfolipidnega filma nastanejo heterogeni liposomi mikrometrskih velikosti. Manjši in bolj homogeni liposomi pa nastanejo z uporabo metode dispergiranja fosfolipidov v vodno fazo. Na fizikalno-kemijske lastnosti pomembno vpliva tudi vrsta uporabljenega stabilizatorja. Z vgradnjo disperzij liposomov v hidrogel se spremenijo fizikalno-kemijske lastnosti liposomov.

Eksperimentalni rezultati so pokazali pozitiven učinek hidrogelov brez in z vgrajenimi disperzijami liposomov na TEWL in hidratacijo kože. Pri vseh formulacijah so se 30 minut po aplikaciji vrednosti TEWL značilno zmanjšale, vrednosti hidratacije kože pa značilno povečale v primerjavi z vrednostmi pred nanosom hidrogelov. Pri formulacijah, ki so vsebovale liposome smo določili značilno zmanjšanje TEWL in povečanje hidratacije kože tudi še 60 minut po aplikaciji. Pri hidrogelu brez liposomov značilnih razlik v omenjenih parametrih po 60 minutah ni bilo. Pozitivni učinki liposomov tudi še po 60 minutah so posledica prisotnosti fosfolipidov, ki se zaradi strukturne podobnosti s kožnimi lipidi vključijo v lipidni dvosloj.

Med formulacijami hidrogelov, ki so vsebovale liposome različne velikosti, nismo našli statistično značilnih razlik glede vpliva na TEWL in hidratacijo kože. Vzrok je lahko majhen vzorec testirancev in velika variabilnost rezultatov. Razlike v velikosti med posameznimi formulacijami niso bile velike. Za optimalnejšo izvedbo testiranja bi bilo smiselno povečati razlike v povprečnem premeru vgrajenih liposomov.

Tudi med formulacijami hidrogelov, ki so vsebovale liposome različne sestave (nasičeni oz. nenasičeni fosfolipidi), nismo našli statistično značilnih razlik glede vpliva na TEWL in hidratacijo kože. Post Hoc testi so pokazali značilno razliko v zmanjšanju vrednosti TEWL le med hidrogelom brez liposomov in posameznimi hidrogeli z liposomi različne sestave.

Testiranje smo izvajali v začetku poletja. Vrednosti temperature in relativne vlažnosti so v času izvajanja meritev odstopale od priporočenih vrednosti. Za zagotavljanje priporočenih vrednosti bi bilo smiselno testiranje izvajati v pomladnem ali jesenskem času, s čimer bi lahko zmanjšali variabilnost rezultatov. Manj variabilne rezultate pa bi verjetno dobili tudi z meritvami na večjem številu prostovoljcev.

6. Literatura

1. Mu L, Sprando R L: Application of nanotechnology in cosmetic. *Pharm Res* 2010; 27: 1746-1749.
2. SCCS: Guidance on the safety assessment of nanomaterials in cosmetics. SCCS 2012.
3. Magdassi S, Touitou E: Novel cosmetic delivery system. Marcel Dekker 1999; 233-267
4. http://www.dr-baumann.co.za/basic_information_about_liposomes.html
5. Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H: Preparation, characterization and applications of liposomes: State of the art. *J. Colloid Sci. Biotechnol.* 2012; 1: 147–168.
6. <http://www.lipoid.com/en/cosmetic-industry>
7. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Daravan S, Joo S W, Zarghami N, Hanifenpour Y, Samiei M, Kouchi M, Nejati-Koshki K: Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.* 2013; 8: 102
8. <http://www.malvern.com/en/>
9. http://en.wikipedia.org/wiki/Zeta_potential
10. Walters H A, Roberts M S: Cosmeceutic, and cosmetic development. Informa Healthcare USA 2008; 115-128
11. <http://www.courage-khazaka.de/index.php/en/>
12. Betz G, Imboden R, Imanidis G: Interaction of liposome formulations with human skin in vitro. *Int J Pharm* 2001; 229: 117-129.
13. Verma D D, Verma S, Blume G, Fahr A: Particle size of liposomes influence dermal delivery of substances into skin. *Int J Pharm*, 2003; 258: 141-151.
14. Leyden J L, Rawlings A V: Skin hydration. Marcel Dekker, Inc: 2002; 25:301-310
15. Fahr A, Schafer U, Verma D D, Blume G: Skin permeation enhancement of substance by a novel tyoe of liposomes. 2000, *SOFW Journal* 126: 38-53
16. Barel A O, Paye M, Maibach H I: Handbook of cosmetic science and technology. Marcel Dekker Inc. 2001; 201-209.

17. Hoogevest P, Prusseit B, Wajda R. Phospholipids: Natural functional ingredients and actives for cosmetic products. SOFW Journal 2013: 139: 1-14