

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA PLANKAR

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA PLANKAR

**VPLIV VELIKOSTI TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV NA
TRANSEPIDERMALNO IZGUBO VODE IN HIDRATACIJO KOŽE**

**SIZE EFFECT OF SOLID LIPID NANOPARTICLES ON TRANSEPIDERMAL
WATER LOSS AND SKIN HYDRATION**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar.

Zahvala

Za vso strokovno pomoč, usmerjanje in potrpežljivost se zahvaljujem mentorici doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar.

Zahvaljujem se tudi svoji družini in fantu Mitji za vso podporo in spodbudo.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar.

Nina Plankar

Predsednik komisije: prof. dr. Darko Černe

Člani komisije: doc. dr. Janez Ilaš

VSEBINA

POVZETEK	I
ABSTRACT	II
SEZNAM OKRAJŠAV	III
1 UVOD	1
1.1 TRDNI LIPIDNI NANODELCI	1
1.1.1 IZDELAVA SLN	1
1.1.2 KARAKTERIZACIJA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV.....	2
1.1.3 DERMALNA UPORABA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV IN VGRADITEV LE-TEH V HIDROGEL ..	3
1.1.3.1 HIDROGELI.....	5
1.2 HIDRATACIJA KOŽE IN TRANSEPIDERMALNA IZGUBA VODE	5
1.3 NEINVAZIVNE METODE ZA MERJENJE HIDRATACIJE KOŽE IN TEWL	6
1.3.1 CORNEOMETER [®] CM 825	8
1.3.2 TEWAMETER [®] TM 300.....	10
1.4 RAZISKAVE VPLIVA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV NA HIDRATACIJO KOŽE IN TEWL	12
2 NAMEN DELA	14
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 MATERIALI.....	15
3.1.1 SESTAVINE ZA IZDELAVO TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV.....	15
3.1.2 SESTAVINE ZA IZDELAVO HIDROGELA	16
3.2 APARATURE.....	18
3.3 METODE	18
3.3.1 IZDELAVA DISPERZIJ TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV Z METODO EMULGIRANJA TALINE LIPIDOV V VODNO FAZO STABILIZATORJA	18
3.3.2 VREDNOTENJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV.....	20
3.3.3 IZDELAVA HIDROGELA BREZ SLN IN Z VGRAJENIMI SLN TER SPREMLJANJE FIZIKALNE STABILNOSTI DISPERZIJ SLN PO VGRADITVI V HIDROGEL	21
3.3.4 IN VIVO ŠTUDIJA DOLOČANJA HIDRATACIJE KOŽE IN TRANSEPIDERMALNE IZGUBE VODE....	22
3.3.4.1 PREDŠTUDIJA: VPLIV KONCENTRACIJE IN VRSTE LIPIDA V SLN NA HIDRATACIJO KOŽE IN TEWL..	22
3.3.4.2 ŠTUDIJA: VPLIV RAZLIČNE VELIKOSTI SLN NA HIDRATACIJO KOŽE IN TEWL.....	23
3.3.4.3 DOLOČANJE HIDRATACIJE KOŽE	24
3.3.4.4 DOLOČANJE TEWL.....	24
3.3.5 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	24
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	26

4.1	OPTIMIZACIJA RECEPTURE DISPERZIJ TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	26
4.1.1	VPLIV KONCENTRACIJE STERIČNEGA STABILIZATORJA	27
4.1.2	VPLIV KONCENTRACIJE LIPIDA	28
4.1.3	VPLIV PRISOTNOSTI IN ODSOTNOSTI STABILIZATORJEV	29
4.1.4	VPLIV POVEČEVANJA KONCENTRACIJE LIPIDA OB HKRATNEM POVEČEVANJU KONCENTRACIJE STABILIZATORJA	30
4.1.5	VPLIV VOLUMNA IZDELAVE DISPERZIJE NA FIZIKALNE LASTNOSTI SLN.....	31
4.2	FIZIKALNA STABILNOST DISPERZIJ TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV	33
4.2.1	FIZIKALNA STABILNOST DISPERZIJ SLN RAZLIČNE SESTAVE PRED VGRADITVIJO V HIDROGEL	33
4.2.2	FIZIKALNA STABILNOST DISPERZIJ SLN RAZLIČNE SESTAVE IN VELIKOSTI PO VGRADITVI V HIDROGEL	35
4.3	IN VIVO PREDŠTUDIJA: VPLIV HIDROGELA BREZ IN S SLN RAZLIČNE SESTAVE NA HIDRATACIJO KOŽE IN TEWL.....	37
4.4	IN VIVO ŠTUDIJA: VPLIV HIDROGELOV Z VGRAJENIMI SLN Z RAZLIČNO VELIKOSTJO NA HIDRATACIJO KOŽE IN TEWL	43
5	SKLEP	49
6	LITERATURA.....	51
	PRILOGA	I

POVZETEK

Napredek nanotehnologije v farmacevtski in kozmetični industriji prinaša številne prednosti pri oblikovanju novih koloidnih sistemov v primerjavi s starejšimi koloidnimi dostavnimi sistemi. Med novejšje koloidne dostavne sisteme sodijo tudi trdni lipidni nanodelci (SLN), ki zaradi svoje nanometerske velikosti na koži ustvarijo okluzivni film zaradi katerega se poveča hidracija kože in zmanjša transepidermalna izguba vode.

V magistrski nalogi smo z metodo emulgiranja taline lipidov izdelali disperzije trdnih lipidnih nanodelcev različne sestave in velikosti. Izdelane disperzije SLN smo sprva ovrednotili s pomočjo fotonske korelacijske spektroskopije in spremljanjem fizikalne stabilnosti skozi daljše časovno obdobje. Najbolj optimalne disperzije SLN smo nato uporabili v nadaljevanju, kjer smo le-te vgradili v HEC hidrogel. Hidrogele z vgrajenimi disperzijami SLN različne sestave in velikosti smo testirali na prostovoljkah ter s Corneometrom[®] in Tewametrom[®] merili spremembe hidracije kože in TEWL po 30 in 60 min od nanosa posameznega hidrogela.

Disperzije SLN, ki smo jih vgradili v hidrogel so v vseh primerih doprinesle k povečanju hidracije kože in zmanjšanju TEWL v primerjavi s hidrogeli brez vgrajenih disperzij SLN. Na podlagi rezultatov *in vivo* predštudije in študije lahko potrdimo, da vrsta in koncentracija lipida v disperziji SLN ter različna velikost SLN v hidrogelu vplivajo na hidracijo kože. Nasprotno pa statistično značilnih razlik v zmanjšanju TEWL med posameznimi hidrogeli nismo dokazali, tako da ne moremo trditi, da vgrajene disperzije SLN oz. velikost SLN vpliva na vrednost TEWL. Najboljše rezultate pri raziskovanju vpliva koncentracije in vrste lipida na hidracijo kože smo dobili v primeru hidrogela s 3,5% GMS SLN. Pri raziskovanju vpliva hidrogelov z vgrajenimi SLN različne velikosti na hidracijo kože smo ugotovili, da je hidrogel z manjšimi SLN (350 nm) v primerjavi s hidrogelom z večjimi SLN (860 nm) bolj učinkovit.

ABSTRACT

The progress of nanotechnology in pharmaceutical and cosmetic industry brings many advantages in the design of new colloidal systems compared to older colloidal delivery systems. Newer colloidal delivery systems also include solid lipid nanoparticles (SLN), which create occlusive film on the skin due to their nanometer size. Occlusive film then increases the skin hydration and decreases the transepidermal water loss.

Dispersions of solid lipid nanoparticles with different composition and size were prepared by melt-emulsification method. Prepared SLN dispersions were initially evaluated by photon correlation spectroscopy and by monitoring physical stability over a long period of time. The most optimal SLN dispersions were then used hereinafter, where we incorporated them into the HEC hydrogels. We tested hydrogels with incorporated SLN dispersions of different composition and size on volunteers and then measured changes in skin hydration and TEWL with Corneometer[®] and Tewameter[®] 30 and 60 minutes after application of each hydrogel.

SLN dispersions that have been incorporated into the hydrogels contributed to an increase of skin hydration and a decrease of TEWL compared to hydrogels without incorporated SLN dispersions in all cases. Based on the results of *in vivo* studies we can confirm that the type and concentration of lipid in SLN dispersions and different SLN size in the hydrogel affects the skin hydration. In contrast, no statistically significant differences in decrease of TEWL between hydrogels have been proved. We can not assert that incorporated SLN dispersions or the size of SLN effects the value of TEWL. Best results in researching the affect of concentration and type of lipid on skin hydration were obtained using hydrogel with 3,5% GMS SLN. In researching the effect of hydrogels with incorporated different SLN size on hydration of the skin, we found that the hydrogel with smaller SLN (350 nm) compared to the hydrogel with larger SLN (860 nm) is more efficient.

SEZNAM OKRAJŠAV

SLN	trdni lipidni nanodelci
PDI	polidisperzni indeks
ZP	zeta potencial
d	povprečni premer
HEC	hidroksietilceluloza
TEWL	transepidermalna izguba vode
GMS	glicerol monostearat
COM	Compritol®
PAS	površinsko aktivna snov
ZU	zdravilna učinkovina
T	temperatura
RH	relativna vlažnost
PCS	fotonska korelacijska spektroskopija
LD	laserska difrakcija
TEM	presevna elektronska mikroskopija
SEM	vrstična elektronska mikroskopija
DTA	diferenčna termična analiza
DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija
NLC	nanostrukturirani lipidni nosilci
SC	stratum corneum

1 UVOD

1.1 TRDNI LIPIDNI NANODELCI

Nanotehnologija je najobetavnejša, hitro razvijajoča se veda na področju raziskav in inovacij z vse večjim vplivom na oblikovanje dostavnih sistemov (1). Trdni lipidni nanodelci (SLN) predstavljajo novejši koloidni dostavni sistem s številnimi prednostmi v primerjavi s starejšimi koloidnimi sistemi (liposomi, polimerni mikro in nanodelci, nanoemulzije,..). So delci s povprečnim premerom 50 – 1000 nm, ki jih izdelamo iz trdnih fizioloških lipidov in različnih površinsko aktivnih snovi. Poleg lipidov, ki so potrebni za tvorbo jedra in PAS, ki se nahajajo na površini delca, nujno potrebujemo vodo kot disperzni medij (2).

1.1.1 IZDELAVA SLN

Poznamo dve tehniki, ki jih uporabljamo pri izdelavi trdnih lipidnih nanodelcev: vroča in hladna homogenizacija. Prvi korak je pri obeh tehnikah enak in obsega taljenje lipida pri temperaturi, ki je višja od lipidnega tališča. Pri vroči homogenizaciji vodno fazo s PAS dodamo lipidni fazi (pri isti temperaturi). S pomočjo rotor – stator homogenizatorja (pri T višji od tališča lipida) dobimo emulzijo staljenih lipidov z ZU v vodni fazi PAS. S homogenizacijskimi cikli postopek nadaljujemo do želene velikosti SLN. Običajno zadostuje 2 – 5 ciklov. Z nepotrebnim večanjem števila ciklov lahko povzročimo koalescenco kapljic taline lipidov. Homogenizaciji sledi ohlajanje in rekristalizacija ter s tem nastanek SLN. Pri hladni homogenizacijski tehniki pa v drugem koraku talino lipidov z vključeno zdravilno učinkovino ohladimo s tekočim dušikom ali suhim ledom in nato zmes lipidov z ZU zmeljemo s pomočjo krogličnega mlina. Nastale mikrodelce (50 – 100 nm) razpršimo v hladno vodno raztopino PAS, pri čemer dobimo suspenzijo. Suspenzijo v zadnjem koraku homogeniziramo pri isti ali nižji sobni temperaturi, da dobimo želeno velikost SLN. Hladno homogenizacijo so razvili za odpravljanje težav vroče homogenizacije (razpad vključenih ZU, zapletenost kristalizacijskega postopka,..). Kot najbolj uveljavljena se uporablja visokotlačna homogenizacija, kjer homogenizatorji potisnejo tekočino pod visokim tlakom (100-200 barov) skozi ozko režo velikosti nekaj

mikrometrov. Za izdelavo SLN lahko uporabimo tudi ultrazvočno tehniko, mikroemulzijsko tehniko ali obarjalno metodo (2).

1.1.2 KARAKTERIZACIJA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

Povprečni premer, polidisperzni indeks in zeta potencial SLN

Velikost delcev lahko določimo na več načinov. Poznamo fotonsko korelacijsko spektroskopijo (PCS), lasersko difrakcijo (LD), presevno elektronsko mikroskopijo (TEM) ter vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM). Med vsemi metodami se najpogosteje poslužujemo PCS in LD. Lasersko difrakcijo lahko uporabimo za določevanje velikosti delcev v območju nekaj deset nanometrov do nekaj milimetrov, pri čemer izkoriščamo uklon laserske svetlobe. PCS metoda pa nam običajno poda rezultate v območju med 3 nm in 3 μ m. Fotonsko korelacijsko spektroskopijo poznamo kot dinamično sipanje svetlobe, ki meri nihanje intenzitete sipane svetlobe. Le-ta je posledica gibanja delcev (Brownovo gibanje). SEM in TEM metodi pa uporabimo pri določanju oblike, strukture in kristalnega stanja trdnih lipidnih nanodelcev (3, 4).

Pri izdelavi SLN je zaželeno, da izdelamo trdne lipidne nanodelce s povprečnim premerom manjšim od 400 nm in s polidisperznim indeksom manjšim od 0,3. Vrednosti PDI bližje 1 kažejo na heterogenost delcev v vzorcu (polidisperzen vzorec) (3).

Za samo fizikalno stabilnost disperzije je pomembno, da imajo delci na svoji površini določen naboj. Zeta potencial je merilo gostote naboja delcev. Ugodni rezultati so večji od + 30 mV ali manjši od – 30 mV (4).

Fizikalna stabilnost disperzije SLN

Fizikalno stabilnost disperzije SLN določamo med daljšim časovnim obdobjem shranjevanja z zapisovanjem sprememb povprečnega premera, PDI in ZP SLN. Preverimo lahko tudi spremembo vsebnosti zdravilne učinkovine vgrajene v disperzijo SLN in viskoznost disperzije SLN. Pomembno za fizikalno stabilnost je tudi opazovanje videza shranjene disperzije SLN. Disperzije SLN lahko shranjujemo pod različnimi pogoji (sobna T, hladilnik, zamrzovalnik, na svetlobi ali zaščiteno pred svetlobo) (4).

Težnja h kristalizaciji in polimorfno obnašanje SLN

V primeru, ko imamo vgrajeno ZU, moramo posebno pozornost nameniti kristalizaciji lipidov, saj je le-ta povezana s hitrostjo sproščanja vgrajene zdravilne učinkovine. Trdno agregatno stanje lipidnih nanodelcev zmanjšuje mobilnost vgrajenih ZU in omogoča nadzorovano sproščanje ZU iz nosilnega sistema. Polimorfno obnašanje SLN pa ima velik vpliv na agregacijo SLN (5). Osnovne metode za določanje fizikalno – kemijskih lastnosti delcev vključujejo termično analizo in rentgensko difrakcijo. Najbolj se uporabljata DTA (diferenčna termična analiza) in DSC (diferenčna dinamična kalorimetrija) (3).

1.1.3 DERMALNA UPORABA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV IN VGRADITEV LE-TEH V HIDROGEL

Zaradi neželenih sistemskih učinkov pri peroralni in parenteralni aplikaciji ima dermalna aplikacija vedno več veljave, saj ponuja veliko prednosti (6):

1. Izognemo se presnovi prvega prehoda.
2. Je priročna, dobro sprejeta s strani bolnikov, enostavna za uporabo in primerna za samozdravljenje.
3. Ker je serumska absorpcija minimalna, je manj pomislekov glede same varnosti aplikacije.
4. Učinkovitost dosežemo z nižjim dnevnim odmerkom.
5. Preprečujemo nihanje koncentracije zdravilne učinkovine.
6. Imamo sposobnost enostavne prekinitve aplikacije, kadar je to potrebno.
7. V primerjavi z ustno ali nosno votlino uporabljamo sorazmerno veliko površino.
8. Zdravilno učinkovino selektivno dostavimo na ciljano mesto.

Ker so za samo permeabilnost kože pomembni zlasti koži naravni lipidi, so raziskovalna prizadevanja privedla do razvoja lipidnih nosilnih sistemov med katere spadajo tudi trdni lipidni nanodelci, ki omogočajo izmenjavo lipidov s površino kože (7). Trdni lipidni nanodelci imajo različne prednosti in odpravljajo pomanjkljivosti ostalih koloidnih sistemov (2):

1. SLN imajo odlično toleranco, ker so sestavljeni iz fizioloških in biološko razgradljivih lipidov, ki kažejo nizko toksičnost in citotoksičnost (8). Ker temeljijo na neiritativnih in netoksičnih lipidih so primerni tudi za uporabo na poškodovani in vneti koži (9).
2. SLN omogočajo vgrajevanje tako hidrofilnih kot lipofilnih učinkovin (npr. diazepam, nifedipin, timolol, pilokarpin,..) (2).
3. Zaradi trdnega lipidnega matriksa lahko z uporabo SLN zaščitimo vgrajene labilne učinkovine pred oksidacijo, hidrolizo, fotolizo,..(7).
4. S SLN lahko omogočimo nadzorovano sproščanje vgrajene učinkovine in s tem zmanjšamo neželene učinke (2). Pomembno je, da izberemo lipide, ki imajo temperaturo tališča višjo od telesne temperature, saj morajo SLN ostati v trdnem agregatnem stanju pri telesni temperaturi, da se vgrajena učinkovina počasi sprosti (10).
5. Ker imajo SLN okluzivne lastnosti, omogočajo povečanje hidratacije kože in zmanjšanje transepidermalne izgube vode (8). Okluzivni učinek SLN je posledica majhnosti delcev, ki tvorijo film na koži, kar vodi do zmanjšanega izhlapevanja vode. Obseg okluzivnega učinka je odvisen od različnih dejavnikov: velikost nanodelcev, uporabljen volumen vzorca, koncentracija lipida in kristaliničnost lipidnega matriksa. Kadar je zaščitna plast kože okvarjena je potrebno uporabiti okluzivne izdelke, ki obnovijo vsebnost vode v roženi plasti. Veliko snovi z dobrimi okluzivnimi lastnostmi (vazelin, maščobe in maščobne kisline,..) imajo nesprejemljiv kozmetični oz. estetski videz in puščajo na koži masten ter težak občutek. V ta namen so razvili različne O/V, V/O kreme in hidrogele v katere vgradimo disperzije SLN, ki predstavljajo kompromis med okluzivnim učinkom in videzom na koži (11).
6. Prednost trdnih lipidnih nanodelcev je tudi njihova enostavna vgraditev v različne dermalne oblike, kot so geli in kreme. Med izdelavo del ali celotno količino vode nadomestimo z disperzijo SLN. Izkazalo se je, da SLN po vgraditvi v dermalne

oblike ostanejo nepoškodovani, kar pomeni, da se ne raztopijo v lipofilni fazi, če leto skrbno izberemo (11). Preprosto lahko združimo prednosti obstoječe dermalne oblike in trdnih lipidnih nanodelcev.

1.1.3.1 HIDROGELI

Hidrofilni geli, imenovani hidrogeli so sestavljeni iz zamreženih materialov, ki absorbirajo velike količine vode, brez raztapljanja. Gel je stanje, ki ni niti povsem tekoče, niti povsem trdno. Sposobnost hidrogela, da absorbira vodo, izhaja iz hidrofilnih funkcionalnih skupin, ki so vezane na polimerno ogrodje, medtem ko odpornost proti raztapljanju izhaja iz navzkrižnih povezav mrežnih verig. Voda znotraj hidrogela omogoča prosto razširjanje nekaterih molekul topljenca, medtem ko polimer služi kot matrica, ki drži vodo skupaj (12).

Največji delež med sestavinami hidrogela zavzema voda, ki predstavlja disperzni medij. Poleg vode potrebujemo tvorilec gela, vlažilec in konzervans. Pri izdelavi hidrogela moramo največ pozornosti nameniti tvorilcu gela, saj je od njega odvisna stabilnost, izgled in prijetnost uporabe. Voda in vlažilec sta imobilizirana v 3D rešetki, ki jo tvori tvorilec gela (npr. hidroksietilceluloza,..). Pri uporabi vlažilnih sestavin moramo biti pozorni na morebiten lepljiv občutek. Ker pri hidrogelih nimamo emulgatorjev, ki bi ublažili lepljiv občutek, moramo biti v začetnih poskusih previdni in znižati količino vlažilnih sredstev (13).

1.2 HIDRATACIJA KOŽE IN TRANSEPIDERMALNA IZGUBA VODE

Koža je največji in najbolj vsestranski organ človeškega telesa. Sestoji iz vrhnjice, usnjice in podkožja. Vrhnjica (epidermis) je zunanja zaščitna plast kože, ki jo od spodaj navzgor sestavljajo bazalna plast (stratum basale), trnasta plast (stratum spinosum), zrnata plast (stratum granulosum), svetleča plast (stratum lucidum) in rožena plast (stratum corneum). Osnovna plast celic je zarodna plast (stratum germinativum) v kateri se epiteljske celice nenehno razmnožujejo in potujejo proti površini kože, kjer na vrhnji plasti kože (stratum corneum) odmrejo in se odlučijo s površine kože (14). Rožena plast ima specifično zgradbo, ki predstavlja pregrado zaradi katere je površina kože neprepustna oz. selektivno

prepustna za vodo, ione in druge snovi (15). Opravlja najpomembnejšo nalogo pri zaščiti kože, saj varuje notranjost telesa pred izsušitvijo, nekontrolirano in čezmerno izgubo vode ter ščiti kožo pred vdorom neželenih snovi iz okolja (14). Za normalno delovanje in ohranjanje zdravega videza kože, mora rožena plast vsebovati 10 – 20% vode. Če vsebnost vode pade pod to vrednost, je zaščitna plast kože okvarjena. Koža izgubi prožnost, razpoka in se lušči (11). Vzdrževanje optimalne ravni hidracije kože s strani rožene plasti je odvisno od več dejavnikov in je skrbno regulirano (16). Med pomembne dejavnike uvrščamo transepidermalno izgubo vode – TEWL (pasivna izguba vode). Ne glede na to, da ima rožena plast nizko prepustnost za snovi, ni popolnoma tesna. Voda se iz kože stalno izgublja s pasivno izgubo skozi nepoškodovano roženo plast (17). Problem se pojavi, ko pride do okvare barijerne funkcije SC, saj se v takšnem primeru TEWL močno poveča (18). Da pride do povečane izgube vode, je v veliki meri odvisno od medceličnih lipidov. Med pomembne gradnike intercelularnih lamel uvrščamo holesterol, ceramide in maščobne kisline. Ceramidi so ključni za organizacijo lipidov, medtem ko holesterol olajša medsebojno strukturiranje različnih lipidov (15). Poleg prisotnosti in urejenosti lipidov je pomembna tudi prisotnost naravnih vlažilnih faktorjev – NMF (ang. Natural moisturizing factors). Naravni vlažilni faktorji so nizkomolekularne vodotopne spojine, ki se tvorijo znotraj korneocitov z razpadom filagrina (16). K NMF prištevamo azospojine, natrijevo sol pirolidinkarboksilne kisline, različne karboksilne kisline, proste aminokisline ter različne elektrolite (19). Kadar rožena plast zazna zmanjšano vlago v okolju generira več spojin NMF z aktiviranjem proteaz (14).

Poleg naštetih dejavnikov pa moramo izpostaviti tudi notranje in zunanje staranje. Endogeno staranje kože je odvisno od genetskih dejavnikov, delovanja hormonov, žlez in raznih bolezenskih stanj. Eksogeno staranje pa je povezano z okoljskimi vplivi (UV, mila, detergenti, čistila, alkohol, tobak, suh zrak in veter, ..). Suha koža se lahko pojavi tudi pri dolgotrajni uporabi zdravil za dermalno uporabo (npr. kortikosteroidi) (19).

1.3 NEINVAZIVNE METODE ZA MERJENJE HIDRATACIJE KOŽE IN TEWL

Hidracija kože predstavlja vsebnost vode v roženi plasti in jo merimo neposredno. Znano je, da so električne lastnosti kože odvisne od vsebnosti vode v SC. V primeru enostavnega električnega modela, se koža smatra kot upor, ki je vezan vzporedno s kondenzatorjem. Ti

dve komponenti (upornost in kapacitivnost) prispevata k skupnemu uporabi na površini kože. Hidratacija kože je torej lahko izmerjena kot skupen upor ali alternativno kot električna prevodnost (obratna vrednost upornosti) in kapacitivnost. Komercialno dostopni inštrumenti, ki temeljijo na omenjenih načinih merjenja so ASA-M2 (prevodnost), Corneometer[®] CM820 in 825 (kapacitivnost), Dermalab Moisture Unit (upornost), Skicon 200 (kapacitivnost) in ostali (20).

V primeru transepidermalne izgube vode se uporabljata metodi odprte in zaprte celice. Odprte celice so odprte za ozračje in na njih zlahka vpliva turbulenca in zračna konvekcija (predstavljeno v nadaljevanju). Zaprte celice pa so novejši modeli, v katerih je merilna celica zaprta in skrita pred ozračjem. Poznamo dva tipa zaprte celice, zaprto celico s kondenzatorjem (condenser type closed-chamber) in zaprto celico z odvodom zraka (unventilated closed-chamber type). Pri prvem tipu zaprte celice je majhen merilni valj na vrhu zaprt s kondenzatorjem. Gradient v tem primeru izračunamo iz dveh vrednosti vlage, vlage na steni celice in vlage v kondenzatorju. Pri drugem tipu zaprte celice je merilni valj na vrhu zaprt. Ko celico postavimo na površino kože, se vodna para iz kože zbira v celici. S časom se vlažnost v celici poveča. Gradient izračunamo na podlagi spremembe relativne vlažnosti in temperature skozi daljše časovno obdobje. Metode ne moremo uporabiti za neprekinjene meritve. Komercialno dostopni inštrumenti so Aquaflux (zaprta celica s kondenzatorjem), Evaporimeter EP1 in EP2 (odprta celica), Tewameter[®] TM210 in TM300 (odprta celica), VapoMeter (zaprta celica z odvodom zraka) in ostali (20).

Na hidratacijo kože in transepidermalno izgubo vode imajo veliko vpliva endogeni, eksogeni, okoljski, eksperimentalni faktorji in faktorji povezani s samimi inštrumenti. Mnogo od teh lahko nadzorujemo ali zmanjšamo z dobro razvitim protokolom (20).

Endogeni faktorji

Vrednosti transepidermalne izgube vode se razlikujejo med anatomskimi deli telesa zaradi vpliva ožilja, mišic in toničnosti kože. Različne vrednosti TEWL dobimo tudi na različnih mestih na istih anatomskih področjih. Na primer na notranji strani podlakti so vrednosti TEWL višje in bolj spremenljive bližje zapestju ali komolcu. Najvišje vrednosti TEWL dobimo na dlani. Tudi pri hidrataciji kože obstajajo velike razlike med različnimi

anatomskimi področji. Najvišje vrednosti hidratacije kože povezujemo s čelom in dlanjo, najnižje pa s trebuhom, stegnom in spodnjim delom nog. V kliničnih študijah za merjenje TEWL in hidratacije kože priporočajo merjenje na notranji strani podlakti stran od zapestja. Zaradi toplotnih, čustvenih in fizičnih mehanizmov ima na hidratacijo kože in TEWL velik vpliv tudi potenje, ki vrednosti povečuje. Vpliv potenja lahko nadzorujemo z ustrezno aklimatizacijo na pogoje temperature in relativne vlažnosti v prostoru. Tudi zdravje kože vpliva na TEWL in hidratacijo kože. V primeru atopijskega dermatitisa so vrednosti TEWL povečane in vrednosti hidratacije kože zmanjšane (20).

Eksogeni faktorji

Eksogeni faktorji, ki vplivajo na vrednosti TEWL vključujejo umivanje kože, uporabo različnih dermalnih izdelkov, izpostavljenost različnim topilom in detergentom, kajenje in ostalo. Vrednosti TEWL se v vseh primerih povečajo, med tem ko se hidratacija kože zmanjša (20).

Poleg inštrumentov za merjenje TEWL in hidratacije kože je potrebno v prostoru, kjer opravljamo meritve, imeti tudi termometer in merilec relativne vlažnosti. Priporočljiva je uporaba grelcev sond, ker lahko razlike med temperaturo kože in temperaturo sonde vplivajo na TEWL vrednosti. Pred meritvami transepidermalne izgube vode in TEWL, se mora testirana oseba aklimatizirati na pogoje v prostoru (15 – 20 min), kjer se izvajajo meritve (20).

1.3.1 CORNEOMETER® CM 825

Z merilnim inštrumentom Corneometer® izmerimo vsebnost vlage v roženi plasti s kapacitivnostno metodo, ki meri kapacitivnost dielektrika, to je kože. Merilni kondenzator kaže spremembe kapacitivnosti kože glede na hidratiranost le-te. Zlate žice na keramični površini so pokrite s tanko stekleno ploščo za zaščito sonde. Med posameznimi žicami se razvije izmenično električno polje. Ena žica kopiči presežek elektronov, druga pomanjkanje. Med merjenjem razpršeno polje prodre v prvo plast kože in tako je določena kapacitivnost. Vsebnost vlage v koži izmerimo v površinskih slojih rožene plasti (10 – 20 µm), zato da se izognemo vplivu krvnih žil (21).

Prednosti Corneometra[®] v primerjavi z ostalimi komercialno dostopnimi inštrumenti (21):

1. Z inštrumentom zaznamo tudi majhne spremembe v stopnji hidracije.
2. Ni vpliva kemičnih snovi ali soli v izdelkih, ki se nanašajo na kožo.
3. Globina električnega razpršenega polja je dokazano zelo majhna, tako da se izmeri le vlaga na površini kože.
4. Najnovejša elektronika zagotavlja temperaturno stabilnost sonde.
5. Zelo kratek čas merjenja (1 s za enkratno meritev) preprečuje vpliv okluzije na rezultat. S sondo so možne enkratne ali neprekinjene meritve.
6. Konstanten in nizek pritisk sonde na kožo omogoča natančne in ponovljive rezultate.
7. Možno je merjenje na zelo majhnih delih telesa (ustnice, ušesa,..).

Pri merjenju moramo biti pozorni na to, da več meritev na istem področju kože vodi do povečanja vlage zaradi okluzije. Do takšnega pojavnosti pride, ker se pod sondo kopiči voda, ki ne more izhlapeti in tako vpliva na meritve. Dobljene vrednosti so višje, čeprav se vlaga v roženi plasti ni spremenila. Torej se je potrebno pri merjenju premikati po testiranem področju in vsakič meriti na sosednji površini. Med vsako meritvijo je priporočljivo počakati 5 s. Pri testiranju kozmetičnih izdelkov meritve ne smemo izvajati takoj po nanosu izdelka, ker bi v tem primeru izmerili vsebnost vlage v izdelku in ne vsebnost vlage v koži. Merjenje se prične takoj, ko sonda pride v stik s kožo. Poleg izmerjene vrednosti se na zaslonu Corneometra[®] prikaže tudi povprečna vrednost vseh meritev, standardna deviacija, temperatura in relativna vlažnost (21).

Tabela 1: Interpretacija rezultatov hidracije kože s Corneometrom[®] CM 825.

	Notranja stran podlakti [arbitrarne enote]
Zelo suha koža	< 30
Suha koža	30 – 45
Dovolj navlažena koža	> 45

Podatki v tabeli 1 se nanašajo na zdravo kožo in normalne sobne pogoje (20 °C ter 40 – 60 % RH). Vrednosti so podane v arbitrarnih enotah Corneometra[®] med 0 in 130. Tabela služi le kot pristop za razlago rezultatov in velja tudi za druge dele telesa. Vrednosti predstavljajo le grobo lestvico in se lahko spreminjajo zaradi okoljskih faktorjev (temperatura, relativna vlažnost, letni čas, ..) (21).

1.3.2 TEWAMETER[®] TM 300

Tewameter[®] je v svetu najbolj sprejeta merilna naprava za oceno transepidermalne izgube vode (TEWL). Aparatura meri gostoto toka vodnih hlapov v zraku nad kožo in iz meritev izračuna difuzijski gradient. Merilna celica je v obliki ozkega votlega valja z odprtima koncema (premer 10 mm, višina 20 mm), ki ima dva senzorja vlage in temperature ter predstavlja metodo merjenja z odprto celico (22). Prvi odprti konec je nameščen na površino kože, med tem ko drugi odprti konec deluje kot odprtina, ki dovoljuje vodni pari, da se dvigne v ozračje (20). Metoda merjenja z odprto celico je edini način, kjer se neprekinjeno oceni TEWL brez vpliva mikro okolja. Takšna oblika zmanjša vplive vrtinčenja zraka znotraj celice. Mikroprocesor analizira vrednosti in izraža stopnjo izhlapevanja v g/h/m². Z uporabo mikroprocesorja in dveh parov senzorjev ima Tewameter[®] zmožnost prejeti informacije o temperaturi in relativni vlažnosti za vsako TEWL vrednost med celotno meritvijo. To je zelo pomembno za oceno točnosti in ponovljivosti. Fizikalna osnova za meritve je difuzni zakon, ki ga je leta 1855 odkril Adolf Fick (23).

Glavne prednosti metode odprte celice pred metodo zaprte celice Tewaetra[®] (22):

1. Omogoča natančno in hitro merjenje TEWL brez vplivov mikro klime kože (tlak, okluzija, temperatura). Nima vpliva na strukturo kože in zagotavlja enostavno rokovanje.
2. Senzorji sonde imajo običajno sobno temperaturo (20 – 22 °C), medtem, ko je temperatura kože okoli 30 °C ali več. Ker je izmerjena količina izhlapele vode zelo majhna (zdrava koža 8 – 15 g/h/m² → 0,000001333 – 0,00000025 g/min/cm²), morajo senzorji doseči temperaturo kože, da zagotovimo točno in stabilno meritev.

Z grelcem sonde omogočimo nenehno segrevanje celice do temperature, ki je blizu temperaturi kože.

3. Zaradi majhne celice je minimiziran vpliv turbulence zraka.
4. Med posameznimi meritvami ni potrebno čakati.
5. Hitro dosežemo stabilne meritve. Uporabimo lahko tudi neprekinjene meritve za daljše časovno obdobje (30 s).
6. Izbiramo lahko med različnimi prilagoditvami časovnega intervala za oceno povprečne vrednosti. Prilagodimo lahko tudi standardni odklon.

Pri izvajanju meritev moramo paziti, da celico Tewametra[®] držimo v horizontalni legi in popolnoma na miru, saj je merjenje z metodo odprte celice omejeno na uporabo horizontalnih površin kože zaradi motenj turbulence zraka. Če celica ne sede dovolj dobro na površino kože, lahko voda izhlapi skozi režo, ki nastane med celico in kožo. Paziti moramo tudi na pritisk celice ob površino kože, saj lahko le-ta spremeni vrednost TEWL zaradi spremembe v razdalji med kožo in senzorji (20).

Tabela 2: Interpretacija rezultatov TEWL s Tewametrom[®] TM 300.

TEWL vrednosti [g/h/m²]	Interpretacija vrednosti
0 – 10	Zelo zdravo stanje kože
10 – 15	Zdravo stanje kože
15 – 25	Normalno stanje kože
25 – 30	Občutljiva, preobremenjena koža
Nad 30	Kritično stanje kože

Podane vrednosti (tabela 2) se nanašajo na zdravo in nepoškodovano kožo pri normalnih sobnih pogojih (20 °C in 40 – 60 % RH). Na celico Tewametra[®] vplivajo pogoji okolja (gibanje zraka, temperatura, relativna vlažnost), kar posledično prinese drugačne rezultate (22).

1.4 RAZISKAVE VPLIVA TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV NA HIDRATACIJO KOŽE IN TEWL

Številni raziskovalci so izdelali trdne lipidne nanodelce (SLN) kot ustrezen terapevtski koloiden sistem. Uporabljali so različne pristope in različne procesne parametre, ki vplivajo na velikost nanodelcev. Mulla JS in Khazi IM sta proučevala, kako na povprečni premer nanodelcev vpliva vrsta lipida, koncentracija lipida (2,5 % - 10,0 % m/m), površinsko aktivne snovi (1,0 % - 5,0 % m/m) in hitrost homogeniziranja (6500 – 24500 obratov/min). Ugotovila sta, da se povprečni premer in polidisperzni indeks delcev povečujeta z višjo koncentracijo lipidov. Pri površinsko aktivnih snoveh sta dokazala, da serije izdelane z nižjimi koncentracijami PAS, vsebujejo večje nanodelce. Če imamo višjo koncentracijo PAS, ta zmanjša površinsko napetost. Najboljše rezultate sta dobila pri serijah, kjer sta uporabila zmes dveh PAS. Kot je bilo pričakovati, se je velikost nanodelcev zmanjšala, ko so povečali hitrost homogeniziranja (23). Do podobnih zaključkov so prišli tudi Ahlin P. in sodelavci (24).

Na hidratacijo kože in TEWL lahko v veliki meri vplivamo z uporabo okluzivnih spojin. Spojine z visokim učinkom okluzije imajo običajno nesprejemljiv videz na koži. Med raziskovanjem so ugotovili, da imajo tudi trdni lipidni nanodelci okluzivni učinek. Stopnja okluzije je odvisna od velikosti nanodelcev, uporabljenega volumna vzorca, od koncentracije lipidne faze in kristaliničnosti lipidnega matriksa. Wissing S.A. in sodelavci so te dejavnike podrobno proučili z *in vitro* testi. Popolno tvorbo filma so opazili pri nanodelcih s premerom 200 nm. Nanodelci s premerom med 200 in 400 nm so še vedno tvorili na koži okluziven film, pri nanodelcih s premerom nad 600 nm pa se je okluzija močno zmanjšala. Zaključili so, da so za tvorbo ustreznega okluzivnega filma na površini kože dovolj nanodelci s premerom 400 nm. Glede časovne odvisnosti je bila stopnja okluzije za nanodelce s premerom od 200 – 400 nm med eksperimentom sorazmerno konstantna, kar podpira ugotovitev, da tvorba filma okluzije poteka v prvi uri. Da se omogoči nastanek filma, je treba doseči kritično vrednost. Učinek okluzije je večji, če je debelina apliciranega vzorca večja. Šele pripravki, ki so vsebovali 35% lipidne faze in več, so pokazali izrazito okluzijo. Če pa je lipidni matriks v kristalnem stanju, se vidi podvojitve stopnje okluzije. V študiji so primerjali tudi stopnjo okluzije konvencionalne kreme O/V (30 % lipidne faze in 70 % vodne faze) s SLN disperzijo (30 % lipidne faze).

Uporaba SLN disperzije je v prvi uri prinesla bistveno večjo stopnjo okluzije v primerjavi s konvencionalno kremo (11).

Študije, v katerih so proučevali vpliv trdnih lipidnih nanodelcev na hidratacijo kože, TEWL in elastičnost kože so oblikovane tako, da zajemajo različne metode izdelave trdnih lipidnih nanodelcev, karakterizacijo SLN po različnih metodah, pripravo formulacije (hidrogel, O/V krema, V/O krema...), vgraditev SLN v formulacije, *in vivo* teste z uporabo različnih inštrumentov in statistično analizo rezultatov. Pri vsakem oblikovanju *in vivo* študije je pomembno, da izberemo zdrave prostovoljce v določenem starostnem obdobju, z jasno definirano površino nanosa formulacije in kontrolnih polj, z vnaprej določeno količino nanešenega vzorca ter z definiranim časovnim obdobjem nanosa in posameznih meritev.

Wissing S.A. in Muller R.H. sta za svojo študijo izdelala trdne lipidne nanodelce (10 % cetil palmitat, 1,5 % sukrozni stearat, 88,5 % voda) s premerom manjšim od 400 nm in z ozko porazdelitvijo velikosti. Disperzije trdnih lipidnih nanodelcev so bile fizikalno stabilne. Povprečni premer so izmerili z metodo laserske difrakcije, termično analizo pa so opravili z DSC. Izdelali so kremo O/V, kjer so 40 % vodne faze nadomestili z disperzijo SLN. Na eno roko so nanašali konvencionalno kremo brez vgrajenih SLN, na drugo roko pa formulacijo z vgrajeno disperzijo SLN, dvakrat na dan, 28 dni. 12 – 16 ur po zadnjem nanosu izdelkov so s Corneometrom[®] in Cutometrom[®] opravili meritve. Rezultati Corneometra[®] so pokazali, da sta obe formulaciji povečali hidratacijo kože (standardna krema za 24,14 % oz. krema z disperzijo SLN za 31,92 %). Krema z vgrajeno disperzijo SLN je bila v primerjavi s kremo brez vgrajene disperzije SLN učinkovitejša (25).

Effat F.S. in sodelavci so v svoji študiji primerjali klasično kremo s koencimom Q10 in kremo s koencimom Q10 z vgrajenimi trdnimi lipidnimi nanodelci. Po 1 mesecu dermalne uporabe na prostovoljkah sta obe kremi pokazali izboljšanje hidratacije kože. Prva za 40 % in druga za 65 %. Izboljšana je bila tudi elastičnost kože. Tudi v tem primeru je krema z vgrajeno disperzijo SLN drastično povečala hidratacijo kože v primerjavi s klasično O/V kremo (26).

2 NAMEN DELA

Cilj magistrske naloge bo proučevanje vpliva vrste in koncentracije lipida SLN ter velikosti SLN v hidrogelu na hidratacijo kože in transepidermalno izgubo vode.

Z rotor-stator homogenizatorjem bomo izdelali disperzije SLN različne sestave. Pri izdelavi bomo uporabili Compritol[®]888 ATO ali glicerol monostearat ter Phospholipon[®]80H in poloksamer 188. Disperzijam bomo določili povprečni premer, polidisperzni indeks in zeta potencial. Meritve bomo izvedli takoj po izdelavi SLN ter po 5 in 45 ± 4 dneh. S spremljanjem sprememb parametrov skozi daljše časovno obdobje bomo vrednotili fizikalno stabilnost disperzij SLN.

Recepture, ki se bodo izkazale za najbolj fizikalno stabilne, primerne in zanimive za nadaljnjo uporabo, bomo uporabili v *in vivo* predštudiji, kjer bomo disperzije SLN različne sestave vgradili v hidroksietilcelulozni hidrogel. Raziskovali bomo, kako vrsta in koncentracija lipida vplivata na hidratacijo kože in TEWL. HEC hidrokele z vgrajenimi disperzijami SLN bomo nanašali na kožo ter s Corneometrom[®] in Tewametrom[®] na eni prostovoljki izvedli meritve.

Na podlagi rezultatov *in vivo* predštudije bomo izbrali najboljšo recepturo po kateri bomo pripravili disperzije z različnimi velikostmi delcev. Disperzije SLN bomo vgradili v HEC hidrogel in jih nanašali na kožo ter s Corneometrom[®] in Tewametrom[®] na 4 prostovoljkah izvedli meritve. V *in vivo* študiji bomo raziskovali kako velikost SLN v disperziji vpliva na hidratacijo kože in TEWL. Meritve bomo izvajali pred nanosom hidrogelov ter po 30 in 60 min od nanosa.

V magistrski nalogi bomo skušali ugotoviti:

- Ali koncentracija in prisotnost steričnega stabilizatorja ter vrsta in koncentracija lipida vplivajo na povprečni premer, PDI in ZP SLN?
- Ali hidrogel z vgrajenimi SLN bolj poveča hidratacijo kože in zmanjša TEWL v primerjavi s hidrogelom brez vgrajenih SLN?
- Ali koncentracija in vrsta lipida SLN vplivata na hidratacijo kože in TEWL?
- Ali različna velikost SLN, vgrajenih v hidrogel, različno vpliva na hidratacijo kože in TEWL?

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

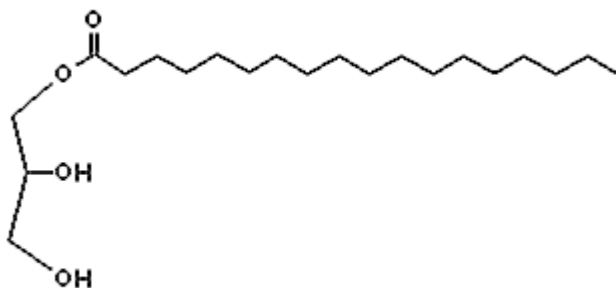
3.1.1 SESTAVINE ZA IZDELAVO TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

SLN so sestavljeni iz trdnega lipidnega jedra in zunanlega sloja površinsko aktivnih snovi, to je fosfolipidov in steričnih stabilizatorjev (3).

LIPIDNA KOMPONENTA

Glycerol monostearat (GMS 35-50 %) (Lex, Slovenija)

Kemijsko je GMS glicerolni ester stearinske kisline (slika 1) s temperaturo tališča 58 – 59 °C. Je organska molekula, ki se lahko uporablja kot emulgator, zgoščevalo, sredstvo proti sprijemanju ter konzervans. Je brez barve in vonja, je sladkega okusa in se nahaja kot prašek, ki je higroskopičen. Pogosto se uporablja v kozmetičnih izdelkih za nego kože in las (27).



Slika 1: Strukturna formula GMS.

Compritol® 888 ATO (Gattefosse, Francija)

Je trden lipid sestavljen iz zmesi monogliceridov (12 – 18 %), digliceridov (52 – 54 %) in trigliceridov (28 – 32 %) behenojske (C_{22}) kisline. Temperatura tališča je 69 – 74 °C. Ima emulgirajoče lastnosti (27).

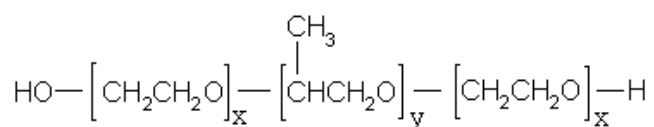
POVRŠINSKO AKTIVNE SNOVI

Phospholipon® 80H (Phospholipid GmbH, Nemčija)

Je hidrogeniran sojin lecitin. Od zaestrenih maščobnih kislin sta prisotni le stearinska kislina in palmitinska kislina. Je rumenkasto bel prašek z emulgatorskimi lastnostmi. Ima vlogo stabilizatorja, saj delcem daje naboj (27).

Lutrol® F68 (poloksamer 188) (BASF, Nemčija)

Poloksamer 188 je sintezni blok kopolimer etilenoksida in propilenoksida (slika 2). Je amfifilna molekula. Osrednji lipofilni del (polioksipropilenska veriga) molekule obdajata na vsaki strani po ena hidrofilna polioksietilenska veriga (27).



$$x = 80, y = 27$$

Slika 2: Strukturna formula poloksamera 188.

Poloksameri stabilizirajo nanoemulzije in nanodelce s steričnim efektom. Z lipofilnim polipropilenoksidnim delom se adsorbirajo na hidrofobno površino delcev, hidrofilne polietilenoksidne verige pa štrlijo v vodni medij in sterično ovirajo približevanje delcev (28).

PREČIŠČENA VODA

Pripravljena na Fakulteti za farmacijo Ljubljana.

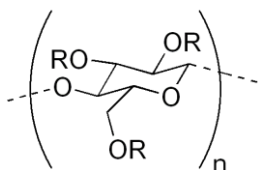
3.1.2 SESTAVINE ZA IZDELAVO HIDROGELA

Osnovne komponente vsakega hidrogela so makromolekula, ki tvori gel, vlažilec, voda in konzervans.

MAKROMOLEKULA – TVORILEC GELA

Hidroksietilceluloza 10000 (HEC) (Merck, Nemčija)

HEC je delno substituiran polihidroksietilni eter celuloze (slika 3). Komercialno je dostopna v več razredih, ki se med seboj razlikujejo po stopnji substitucije in viskoznosti 1 ali 2 % vodne raztopine polimera pri 25 °C. HEC je široko zastopana pomožna snov v farmacevtski industriji: uporablja se pri oblaganju tablet in izdelavi suspenzij, kot vezivo v tabletah in za povečevanje viskoznosti raztopin. HEC je neionski vodotopen polimer. Topna je v hladni in topli vodi, pri raztapljanju pa tvori prozorne homogene raztopine. Pri dovolj veliki koncentraciji tvori fizikalno premrežene hidrogelne. V obliki praška je kljub higroskopski stabilna. Viskoznost vodnih raztopin pada z višanjem temperature. Možna je encimska razgradnja HEC z encimi bakterij in gliv iz okolja, zato je pri dolgotrajnejšem shranjevanju vodnih raztopin nujna uporaba konzervansov (27).



R = H or CH₂CH₂OH

Slika 3: Strukturna formula HEC.

VLAŽILEC

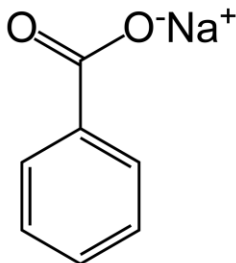
Glicerol (85 %) (Fagron, Nizozemska)

Glicerol ali 1,2,3 - propantriol je bistra brezbarvna viskozna tekočina. Uporabljajo ga v živilski, kemijski in kozmetični industriji. Glicerol veže vodo, vlaži kožo in ščiti hidrogel pred izgubo vlage (27).

KONZERVANS

Natrijev benzoat (Kemika Zagreb, Hrvaška)

Kemijsko je sol benzojske kisline (slika 4). Nahaja se v obliki belega, rahlo higroskopičnega praška. V kozmetični, farmacevtski in prehrabeni industriji se uporablja kot konzervans (27).



Slika 4: Strukturna formula natrijevega benzoata.

PREČIŠČENA VODA

Pripravljena na Fakulteti za farmacijo Ljubljana.

3.2 APARATURE

- Precizna tehtnica XS205 DualRange (Mettler Toledo, Švica)
- Rotor – stator homogenizator Omni PDH (Omni International, ZDA)
- PCS naprava Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, VB)
- Corneometer[®] CM 825 (Courage & Khazaka GmbH, Köln, Nemčija)
- Tewameter[®] TM 300 (Courage & Khazaka GmbH, Köln, Nemčija)

3.3 METODE

3.3.1 IZDELAVA DISPERZIJ TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV Z METODO EMULGIRANJA TALINE LIPIDOV V VODNO FAZO STABILIZATORJA

S precizno tehtnico (Mettler Toledo) smo natehtali sestavine za izdelavo disperzije SLN. Trdni lipid in fosfolipid smo natehtali v prvo epruveto (premer = 16 mm); v drugo

epruveto (premer = 16 mm) pa sterični stabilizator, ki smo ga raztopili v predpisani količini prečiščene vode.

Lipidno fazo smo na vodni kopeli segreti približno 10 °C nad temperaturo tališča lipida in ji dodali na enako temperaturo segreto vodno fazo. Nato smo z rotor – stator homogenizatorjem (Omni PDH) pri konstantni T (10 °C nad tališčem lipida) pripravili emulzijo O/V. Na začetku smo določili optimalni čas in hitrost mešanja (10 min pri 20000 obratih/min). Z ohlajanjem disperzije na sobno temperaturo so se lipidne kapljice strdile in nastali so trdni lipidni nanodelci.

Pri izdelavi trdnih lipidnih nanodelcev smo izhajali iz recepture 2 (tabela 3), ki smo jo nato optimirali, da smo dobili ustrezno velike delce, z ustreznim PDI ter z ustrezno vrednostjo zeta potenciala. Upoštevali smo tudi enostavnost izvedbe in možnost primerjanja vzorcev med seboj. Disperzije nanodelcev, ki smo jih izdelali, so se med seboj razlikovale po vrsti in koncentraciji lipida ter koncentraciji in prisotnosti steričnega stabilizatorja. Celotna masa disperzije je ostala konstantna (3 g). Posamezne recepture so prikazane v tabeli 3.

Ker smo v nadaljevanju magistrske naloge potrebovali tudi 21 mL disperzije SLN, smo morali pri izdelavi disperzije SLN zamenjati epruvete. Epruvete s premerom 16 mm smo zamenjali z epruvetami s premerom 30 mm. Izdelava disperzij SLN je potekala po opisanem postopku, le da smo volumen 21 mL dosegli na dva načina. V prvem načinu smo disperzijo SLN izdelali naenkrat v epruveti s premerom 30 mm, v drugem načinu pa smo volumen 21 mL dobili preko sedmih vzorcev (epruvete s premerom 16 mm), ki smo jih nato združili.

Tabela 3: Sestava disperzij SLN.

Receptura	Compritol® [%]	GMS [%]	Phospholipon® 80H [%]	poloksamer 188 [%]	prečiščena voda [%]
1	2,5	/	1,0	0,5	96,0
2	/	2,5	1,0	0,5	96,0
3	/	2,5	1,0	1,0	95,5
4	/	2,5	1,0	1,5	95,0

5	/	3,5	1,0	0,5	95,0
6	/	4,5	1,0	0,5	94,0
7	/	2,5	/	/	97,5
8	/	2,5	1,0	/	96,5
9	/	3,5	1,0	1,5	94,0
10	3,5	/	1,0	1,5	94,0

3.3.2 VREDNOTENJE TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

VELIKOST DELCEV IN POLIDISPERZNI INDEKS

Vzorcem smo pomerili povprečni premer delcev z metodo fotonske korelacijske spektroskopije in sicer z napravo Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, VB). Merilo za širino porazdelitve velikosti delcev je polidisperzni indeks (PDI). Vzorce pred meritvijo nismo redčili.

Pogoji merjenja:

Temperatura: 25 °C

Viskoznost disperznega medija: 0,8872 mPas

Lomni količnik disperznega medija: 1,330

Disperzni medij: voda

ZETA POTENCIAL

Zeta potencial delcev smo določili z lasersko Dopplerjevo elektroforezo z napravo Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, VB). Pred meritvijo smo vzorce razredčili s prečiščeno vodo v razmerju 1:20, tako da so postali transparentni.

Pogoji merjenja:

Temperatura: 25 °C

Viskoznost disperznega medija: 0,8872 mPas

Dielektrična konstanta disperznega medija: 79,0

SPREMLJANJE FIZIKALNE STABILNOSTI DISPERZIJ TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV PRED VGRADITVIJO V HIDROGEL

Izdelanim disperzijam SLN smo z aparaturo Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, VB) izmerili povprečni premer, PDI in zeta potencial takoj po izdelavi, nato pa meritve ponovili po 5 in 45 ± 4 dneh. Prav tako smo opazovali spremembe v izgledu disperzije SLN (prisotnost večjih, na oko vidnih delcev, prisotna usedlina, sprememba barve,...). Vzorce smo shranjevali na sobni temperaturi.

3.3.3 IZDELAVA HIDROGELA BREZ SLN IN Z VGRAJENIMI SLN TER SPREMLJANJE FIZIKALNE STABILNOSTI DISPERZIJ SLN PO VGRADITVI V HIDROGEL

Izdelali smo 23 g hidrogela z naslednjo sestavo po monografiji v FS (29):

HEC 2,5 dela

Glicerol (85 %) 5 delov

Natrijev benzoat 0,1 del

Voda do 100 delov

V 50 mL čašo smo natehtali predpisano količino prečiščene vode in ji med mešanjem dodali konzervans. V pateno smo natehtali HEC, dodali predpisano količino glicerola in raztrli s pestilom. Nato smo v pateno med stalnim mešanjem prilivali vodo s konzervansom. Vse skupaj smo pokrili s parafilmom in pustili nabrekati pri sobni temperaturi 24 ur. Vmes smo večkrat premešali.

Pri izdelavi hidrogela z vgrajenimi SLN smo hidrogel pripravili po opisanem postopku, le da smo prečiščeno vodo nadomestili z disperzijo nanodelcev.

Fizikalno stabilnost disperzije SLN po vgraditvi v hidrogel smo preverili tako, da smo s konico spatule vzeli del hidrogela z vgrajeno disperzijo SLN in ga prenesli v 20 mL čašo. Do oznake smo dopolnili s prečiščeno vodo in premešali, da se je hidrogel raztopil. Tako smo dobili zelo razredčene vzorce z viskoznostjo enako viskoznosti vode. Vzorcem smo z

napravo Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, VB) določili povprečni premer, PDI in ZP takoj po vgraditvi disperzij SLN v hidrogel.

3.3.4 IN VIVO ŠTUDIJA DOLOČANJA HIDRATACIJE KOŽE IN TRANSEPIDERMALNE IZGUBE VODE

V okviru *in vivo* študije smo najprej izvedli predštudijo na eni prostovoljki, pri kateri smo ugotavljali ali koncentracija in vrsta lipida v SLN, ki smo jih vgradili v hidrogel, značilno vplivata na hidratacijo kože in TEWL. Na podlagi rezultatov predštudije smo izbrali ustrezno disperzijo SLN, kateri smo v nadaljevanju varirali velikost delcev in ugotavljali ali velikost SLN, ki smo jih vgradili v hidrogel, značilno vpliva na hidratacijo kože in TEWL.

3.3.4.1 PREDŠTUDIJA: VPLIV KONCENTRACIJE IN VRSTE LIPIDA V SLN NA HIDRATACIJO KOŽE IN TEWL

IZBIRA VZORCEV

Za predštudijo smo izbrali disperzije SLN, izdelane po recepturah 2, 9 in 10. Za vgrajevanje v hidrogel smo potrebovali 21 mL disperzije SLN, ki smo jo pripravili naenkrat v epruveti s premerom 30 mm. Disperzije SLN smo vgradili v hidrogel. Na prostovoljki smo primerjali vpliv hidrogela brez SLN in hidrogelov s SLN z različno koncentracijo (2,5 % oz. 3,5 %) in vrsto (GMS oz. Compritol®) lipida na hidratacijo kože in TEWL.

PRIPRAVA PROSTOVOLJKE

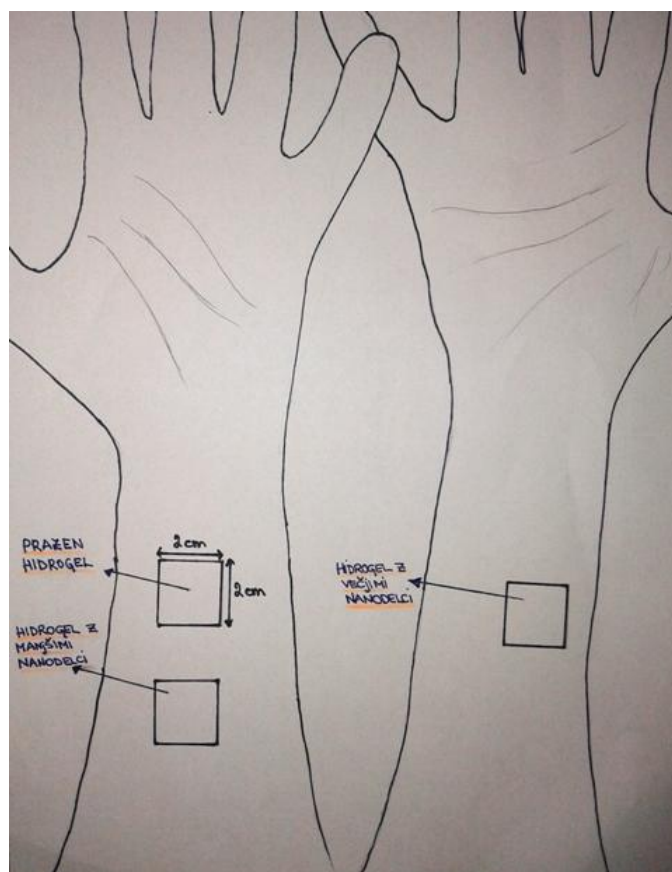
Prostovoljka je bila stara 23 let, zdrava, ni jemala zdravil, ni kadila in dva dni pred študijo na testiranem mestu ni uporabljala negovalnih kozmetičnih izdelkov. Pred meritvijo je 15 min mirovala v prostoru, da se je koža privadila na pogoje v prostoru ($T = 25,7 \text{ °C} \pm 3,3 \text{ °C}$, relativna vlažnost = $23,4 \% \pm 0,5 \%$) ter da na meritve ni vplival stres, hitrejše bitje srca, potenje ter drugi dejavniki. Na levo in desno podlakt smo narisali dve področji nanosa. Vsako področje je bilo veliko 4 cm^2 ($2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$). Izbrali smo notranjo stran podlakti, ki je najmanj izpostavljena zunanjim vplivom in neporaščena. Na prvo področje smo nanесли hidrogel brez SLN, na drugo področje hidrogel s SLN (2,5 % GMS), na tretje

področje hidrogel s SLN (3,5 % GMS) in na četrto področje hidrogel s SLN (3,5 % COM). Količina odmerjenega hidrogela je bila 0,5 mL (odmerjeno z odmerno žličko).

3.3.4.2 ŠTUDIJA: VPLIV RAZLIČNE VELIKOSTI SLN NA HIDRATACIJO KOŽE IN TEWL

IZBIRA VZORCEV

Za študijo smo izbrali disperzijo SLN, izdelano po recepturi 9. Disperzijo z večjimi delci smo izdelali naenkrat (21 mL) v epruveti s premerom 30 mm. 21 mL disperzije z manjšimi delci pa smo dobili z združenjem 7 vzorcev, ki smo jih izdelali v volumnu 3 mL v epruveh s premerom 16 mm. Disperziji SLN smo vgradili v hidrogel. Na 4 prostovoljkah smo primerjali vpliv hidrogela brez SLN, hidrogela z manjšimi SLN in hidrogela z večjimi SLN na hidratacijo kože in TEWL.



Slika 5: Prikaz področij nanosa uporabljenih hidrogelov.

PRIPRAVA PROSTOVOLJK

V študiji so sodelovale 4 prostovoljke, stare 23 let. Bile so zdrave, niso jemale zdravil, niso kadile in dva dni pred študijo na testiranem mestu niso uporabljale negovalnih kozmetičnih izdelkov. Pred meritvami so 15 min mirovale v prostoru, da se je koža privadila na pogoje v prostoru ($T = 22,7 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, relativna vlažnost = $28,5 \% \pm 3,6 \%$) ter da na meritve ni vplival stres, hitrejša bitja srca, potenje in drugi dejavniki. Na levo podlakt smo narisali dve področji nanosa, na desno podlakt pa tretje področje (slika 5). Vsako področje je bilo veliko 4 cm^2 ($2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$). Izbrali smo notranjo stran podlakti, ki je najmanj izpostavljena zunanjim vplivom in neporaščena. Na prvo področje smo nanесли hidrogel brez SLN, na drugo področje hidrogel z manjšimi SLN in na tretje področje hidrogel z večjimi SLN. Količina odmerjenega hidrogela je bila 0,5 mL (odmerjeno z odmerno žličko).

3.3.4.3 DOLOČANJE HIDRATACIJE KOŽE

Vpliv vzorcev na hidratacijo kože smo določali z napravo Corneometer[®] CM 825. Meritve smo v predštudiji izvedli pred nanosom vzorca, 30 min in 60 min po nanosu ter po 2 dneh, ko si je testirana oseba nanašala vzorce dvakrat na dan. Meritve v študiji pa smo izvedli pred nanosom vzorca ter po 30 min in 60 min po nanosu. V okviru predštudije, smo na vsakem področju v vsaki časovni točki naredili 6 meritev, v okviru študije pa 18 meritev.

3.3.4.4 DOLOČANJE TEWL

Vpliv vzorcev na TEWL smo določali z napravo Tewameter[®] TM 300. Meritve smo v predštudiji izvedli pred nanosom vzorca, 30 min in 60 min po nanosu ter po 2 dneh, ko si je testirana oseba nanašala vzorce dvakrat na dan. Meritve v študiji smo izvedli pred nanosom vzorca ter 30 min in 60 min po nanosu. V okviru predštudije, smo na vsakem področju v vsaki časovni točki naredili 1 meritev, v okviru študije pa 2 meritvi. Vsaka meritev je trajala 40 s, končni rezultat je vrednost z najnižjo standardno deviacijo.

3.3.5 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 OPTIMIZACIJA RECEPTURE DISPERZIJ TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

Za izdelavo disperzij trdnih lipidnih nanodelcev smo uporabili Compritol[®]ATO 888 (2,5 %) ali glicerol monostearat (GMS) (2,5 %), Phospholipon[®]80H (1,0 %), poloksamer 188 (0,5 %) in prečiščeno vodo (do 100 %). Cilj optimizacije disperzije SLN je bil dobiti delce ustrezne velikosti (< 400 nm) z monodisperzno porazdelitvijo (PDI blizu 0) in absolutno vrednostjo zeta potenciala > 30 mV.

Compritol[®]ATO 888 predstavlja lipid, ki je pri sobni temperaturi v trdnem agregatnem stanju in ima temperaturo tališča 69 - 74 °C (27). Zaradi visoke temperature tališča smo morali med izdelavo SLN zagotavljati temperaturo kopeli nad 80 °C (10 °C nad temperaturo tališča), kar je bilo za sam potek dela neugodno, prihajalo pa je tudi do zelo variabilnih vrednosti velikosti delcev. Zamenjava lipida z GMS, ki ima nižjo temperaturo tališča (58 - 59 °C) je omogočala lažje delo in manjšo variabilnost rezultatov. Samo izdelavo SLN iz GMS smo optimizirali s spreminjanjem koncentracije lipida in koncentracije stabilizatorja.

Ključna procesna parametra pri izdelavi trdnih lipidnih nanodelcev ustrezne velikosti sta hitrost in čas homogenizacije. Ahlin P. in sodelavci so raziskovali, kako hitrost in čas homogenizacije vplivata na povprečni premer trdnih lipidnih nanodelcev v disperziji. SLN so izdelali pri 15000, 20000, 25000 obratih/min, čas homogeniziranja je bil 1, 3, 5, 8 in 10 min. Dokazali so, da se povprečni premer SLN z naraščajočimi hitrostmi homogenizacije (15000 - 20000 obratov/min), zmanjšuje. Hitrost višja od 20000 obratov/min (25000 obratov/min) ni bistveno spremenila povprečni premer delcev, nekoliko je le izboljšala PDI. Hitrosti pod 15000 obratov/min pa niso zadostovale za nastanek ustreznih SLN, saj so bili v disperziji vidni večji delci. Ugotovili so tudi, da se je povprečni premer delcev zmanjšal, ko se je čas homogenizacije povečal (od 1 – 5 min). Po 5 min homogeniziranja se povprečni premer delcev ni več bistveno spremenil (24). Če homogenizacija poteka dlje

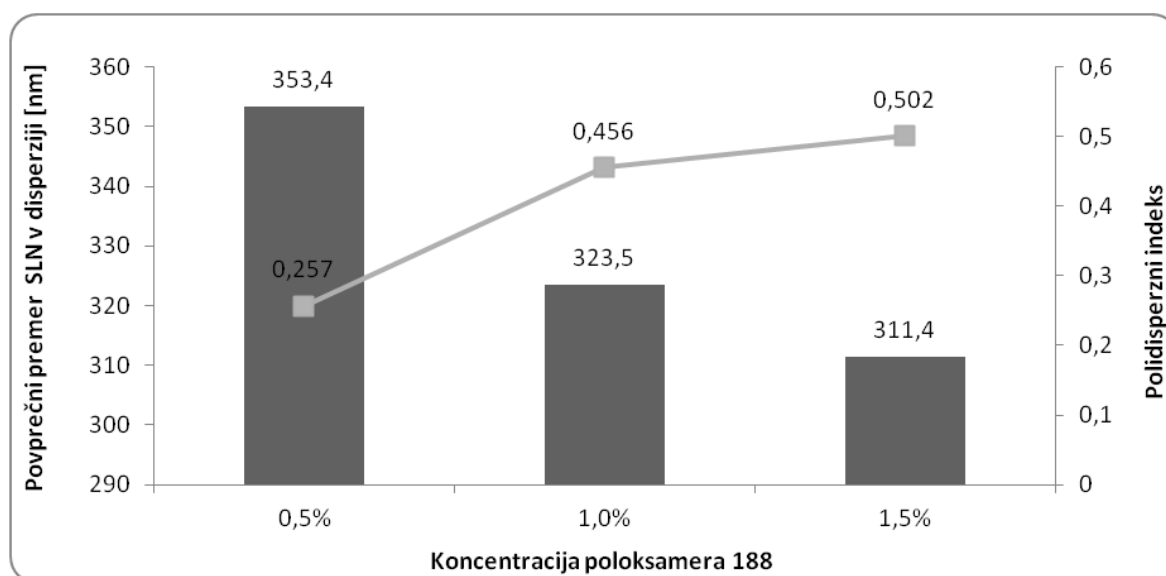
kot 10 min pa lahko pride do nestabilnosti delcev zaradi visokega vnosa energija, kar vodi k nastanku mikrodelcev.

V naši študiji smo disperzijo homogenizirali 10 minut pri 20000 obratih/min.

4.1.1 VPLIV KONCENTRACIJE STERIČNEGA STABILIZATORJA

Vrsta in koncentracija stabilizatorja imata velik vpliv na povprečno velikost delcev in fizikalno stabilnost disperzij. Višje koncentracije stabilizatorja zmanjšujejo površinsko napetost in omogočajo lažje nastajanje delcev (3).

Kot je razvidno s slike 6, se je povprečna velikost SLN v disperziji zmanjševala, med tem ko smo koncentracijo steričnega stabilizatorja povečevali (od 0,5 % do 1,5 %).



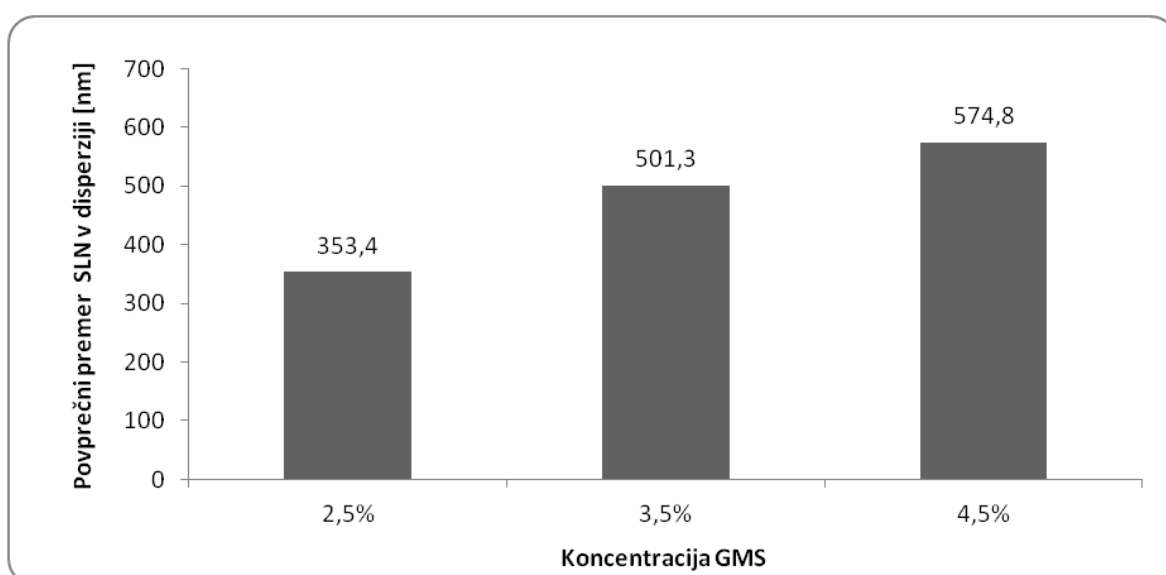
Slika 6: Povprečni premer in polidisperzni indeks SLN v disperziji v odvisnosti od koncentracije steričnega stabilizatorja poloksamera 188. Disperzije SLN so bile izdelane po recepturah 2, 9 in 10.

Mulla JS in Khazi ter Siekmann B. s sodelavci so prav tako z višjo koncentracijo stabilizatorja dobili manjše trdne lipidne nanodelce. Avtorji študij so tudi navedli, da so z višjo koncentracijo stabilizatorja dobili monodisperzno porazdelitev velikosti (23). Nasprotno pa se je v našem primeru polidisperzni indeks zaradi višje koncentracije steričnega stabilizatorja povečal (iz 0,260 na 0,502). Predvidevamo, da so poleg

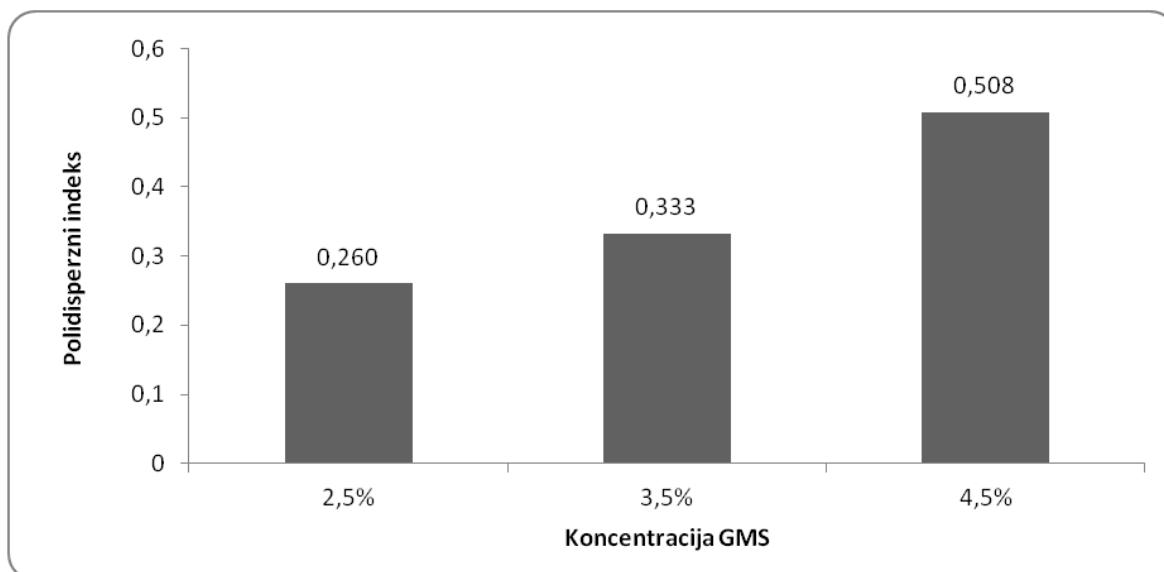
nanodelcev iz presežka poloksamera nastali tudi miceli z manjšo velikostjo. Posledično se je širina porazdelitve velikosti povečala. Drugi možen razlog pa je uporaba različne vrste stabilizatorja. Avtorji raziskovalnega dela so uporabili sojin lecitin, ki predstavlja fosfolipidni stabilizator, mi pa smo spreminjali koncentracijo steričnega stabilizatorja ob konstantni koncentraciji fosfolipidnega stabilizatorja.

4.1.2 VPLIV KONCENTRACIJE LIPIDA

Poleg vpliva koncentracije steričnega stabilizatorja smo opazovali tudi vpliv koncentracije lipida na povprečno velikost in PDI SLN v disperziji. Rezultati so se ujemali z rezultati že objavljenih študij (2, 11). Višja koncentracija lipida se je odražala z večjimi nanodelci in s širšo porazdelitvijo velikosti (slika 7 in 8).



Slika 7: Povprečni premer SLN v disperziji v odvisnosti od koncentracije lipida GMS. Disperzije SLN so bile izdelane po recepturah 2, 5 in 6.

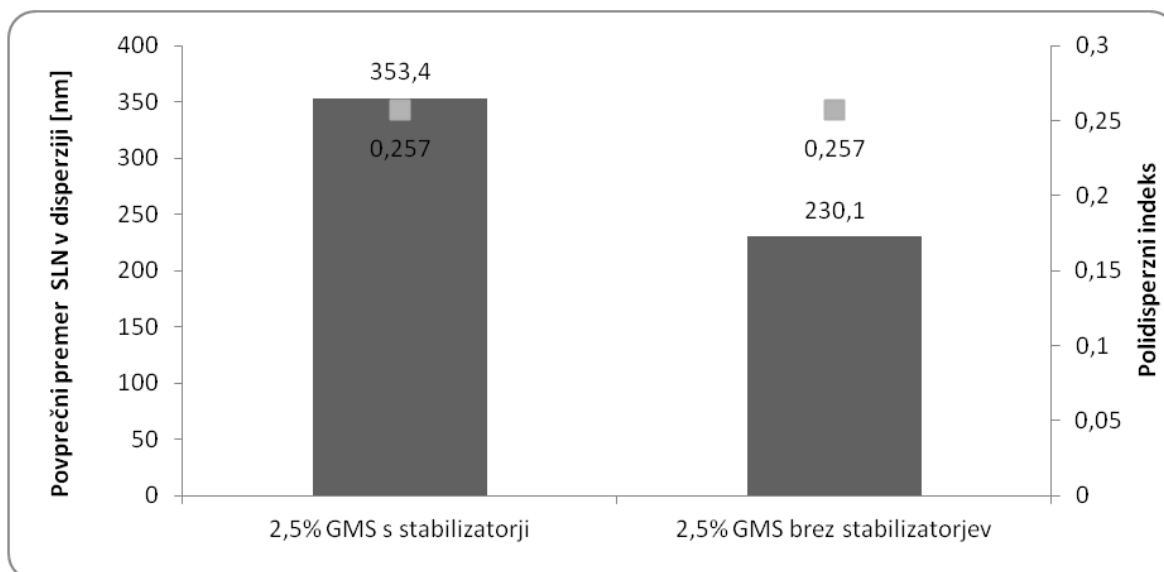


Slika 8: Polidisperzni indeks SLN v disperziji v odvisnosti od koncentracije lipida GMS. Disperzije SLN so bile izdelane po recepturah 2, 5 in 6.

4.1.3 VPLIV PRISOTNOSTI IN ODSOTNOSTI STABILIZATORJEV

Disperzije nanodelcev smo izdelali tudi brez stabilizatorjev poloksamera 188 in Phospholipona[®] 80H. Ker je glicerol monostearat površinsko aktivna snov, lahko sama tvori strukture nanometrskih velikosti (27).

Slika 9 prikazuje primerjavo velikosti delcev v prisotnosti in odsotnosti stabilizatorjev takoj po izdelavi. Kljub temu, da je velikost nastalih ND brez stabilizatorja manjša (230 nm v primerjavi z 353 nm), pa takšen disperzni sistem ni primeren za nadaljnjo uporabo, saj dolgoročno ni fizikalno stabilen (poglavje 4.2.1). Zeta potencial je zaradi odsotnosti stabilizatorjev postal manj negativen (iz - 50,8 mV na - 43,0 mV).



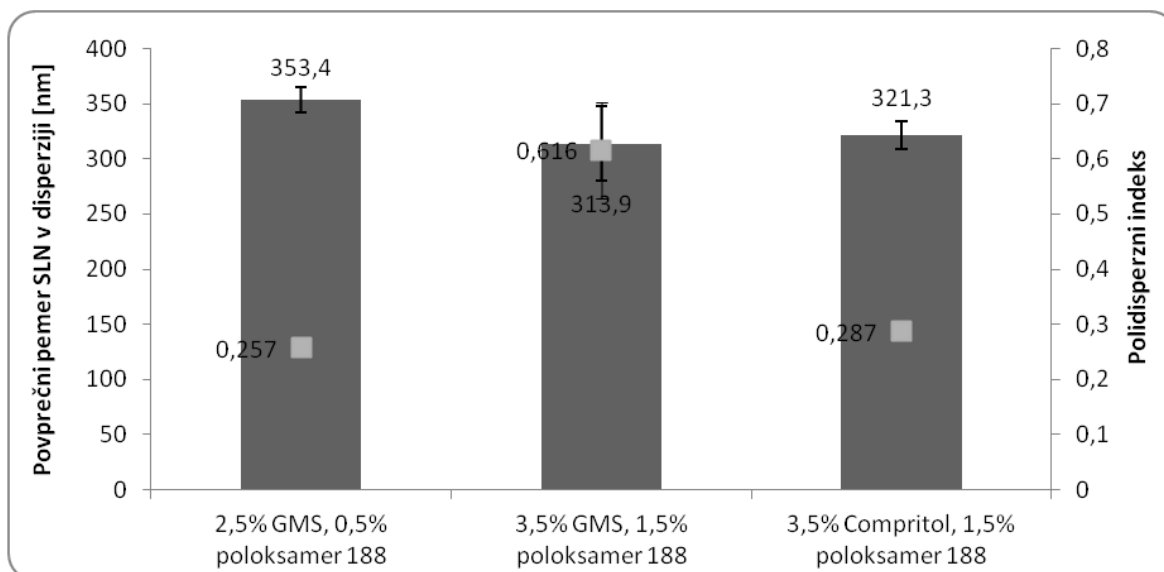
Slika 9: Povprečni premer in polidisperzni indeks SLN v disperziji v odvisnosti od prisotnosti oz. odsotnosti poloksamera 188 in Phospholipona® 80H. Disperziji SLN sta bili izdelani po recepturah 2 in 7.

Pri izbiri disperzije SLN, ki smo jo vgradili v hidrogel, smo morali upoštevati tudi dejavnike, ki vplivajo na stopnjo okluzivnega učinka. Pomembna faktorja sta velikost trdnih lipidnih nanodelcev in koncentracija lipidne faze. Kot so že ugotovili Wissing S.A. in sodelavci mora biti povprečna velikost SLN manjša od 400 nm, koncentracija lipidne faze pa čim večja (> 20%) (11).

4.1.4 VPLIV POVEČEVANJA KONCENTRACIJE LIPIDA OB HKRATNEM POVEČEVANJU KONCENTRACIJE STABILIZATORJA

Ko smo istočasno povečali koncentracijo lipida in koncentracijo stabilizatorja, se velikost SLN ni povečala. V obeh primerih je bila povprečna velikost SLN manjša kot pri disperzijah nanodelcev, ki so vsebovali 2,5 % GMS in 0,5 % poloksamera 188 (314 nm in 321 nm v primerjavi z 350 nm) (slika 5).

Disperzije s 3,5 % GMS in 1,5 % poloksamera 188 so vsebovale polidisperzne nanodelce (PDI = 0,616), disperzije s 3,5 % Compritol® in 1,5 % poloksamera 188 pa monodisperzne nanodelce (PDI = 0,287) (slika 10).



Slika 10: Vpliv povečevanja koncentracije lipida (GMS in Compritol®) ob hkratnem povečanju koncentracije steričnega stabilizatorja poloksamera 188 na povprečni premer in polidisperzni indeks SLN v disperziji. Kljub težji izvedbi, smo za boljšo primerjavo, izdelali tudi disperzijo SLN z lipidom Compritol® ATO 888. Rezultati predstavljajo povprečje dveh serij s standardno deviacijo. Disperzije SLN so bile izdelane po recepturah 2, 9 in 10.

Pri rezultatih zeta potenciala med posameznimi disperzijami SLN nismo opazili značilne razlike. Rezultati so se gibali med - 40 mV in - 60 mV.

Recepture 2, 9 in 10 so se izkazale kot najbolj primerne in zanimive za ugotavljanje vpliva na hidratacijo kože in transepidermalno izgubo vode. V *in vivo* predstudiji smo primerjali vpliv koncentracije (2,5 % in 3,5 %) in vrste lipida (GMS in Compritol®) v disperzijah SLN, ki smo jih vgradili v hidrogel, na hidratacijo kože in TEWL.

4.1.5 VPLIV VOLUMNA IZDELAVE DISPERZIJE NA FIZIKALNE LASTNOSTI SLN

Pri spremljanju vpliva sestave disperzij na velikost in PDI trdnih lipidnih nanodelcev (poglavje 4.1.) smo izdelovali vzorce z volumnom 3 mL. V nadaljevanju magistrske naloge smo zaradi izdelave hidrogelov, kjer smo prečiščeno vodo v celoti zamenjali z disperzijo SLN, potrebovali vzorce z večjim volumnom (21 mL). V ta namen smo epruvete

s premerom 16 mm zamenjali z epruvetami s premerom 30 mm. Izdelali smo 21 mL posamezne disperzije ter izmerili povprečni premer, PDI in zeta potencial delcev.

Tabela 4: Primerjava fizikalnih lastnosti različnih disperzij SLN izdelanih v različnih količinah (3 in 21 mL). Rezultati so podani kot povprečje najmanj dveh meritev s standardno deviacijo.

Receptura	V [mL]	d [nm] ± SD	PDI ± SD	ZP [mV] ± SD
2 (2,5 % GMS)	3	353 ± 12	0,257 ± 0,01	-50,8 ± 1,3
	21	506 ± 28	0,680 ± 0,01	-63,1 ± 4,7
9 (3,5 % GMS)	3	347 ± 57	0,520 ± 0,05	-43,0 ± 3,8
	21	859 ± 57	0,802 ± 0,04	-65,3 ± 0,0
10 (3,5 % COM)	3	321 ± 12	0,287 ± 0,01	-42,7 ± 4,6
	21	662 ± 41	0,492 ± 0,02	-51,6 ± 9,0

Tabela 4 prikazuje primerjavo fizikalnih lastnosti različnih disperzij SLN izdelanih v dveh različnih količinah: 3 in 21 mL. Na podlagi rezultatov lahko ugotovimo, da se je povprečna velikost trdnih lipidnih nanodelcev v disperziji izdelani v večji količini povečala. Prav tako se je povečal polidisperzni indeks. Razlog za slabše rezultate lahko najdemo v delovanju rotor – stator homogenizatorja. Rotor – stator homogenizator je sestavljen iz statorja (zunaj, mirujoči del glave) in rotorja (notranji, vrteči se del). Centrifugalna sila poganja emulzijo skozi režo med rotorjem in statorjem, kapljice pa se razbijejo zaradi velikih strižnih sil, ki se ustvarijo v reži in zaradi udarjanja v steno statorja (32). Večji premer epruvete pomeni daljšo razdaljo, ki jo morajo kapljice prepotovati in zato dosežajo nižje hitrosti in z manjšo silo udarjajo v steno statorja. Posledično se kapljice niso dovolj razbile in smo zato po ohlaiditvi na sobno T dobili večje delce.

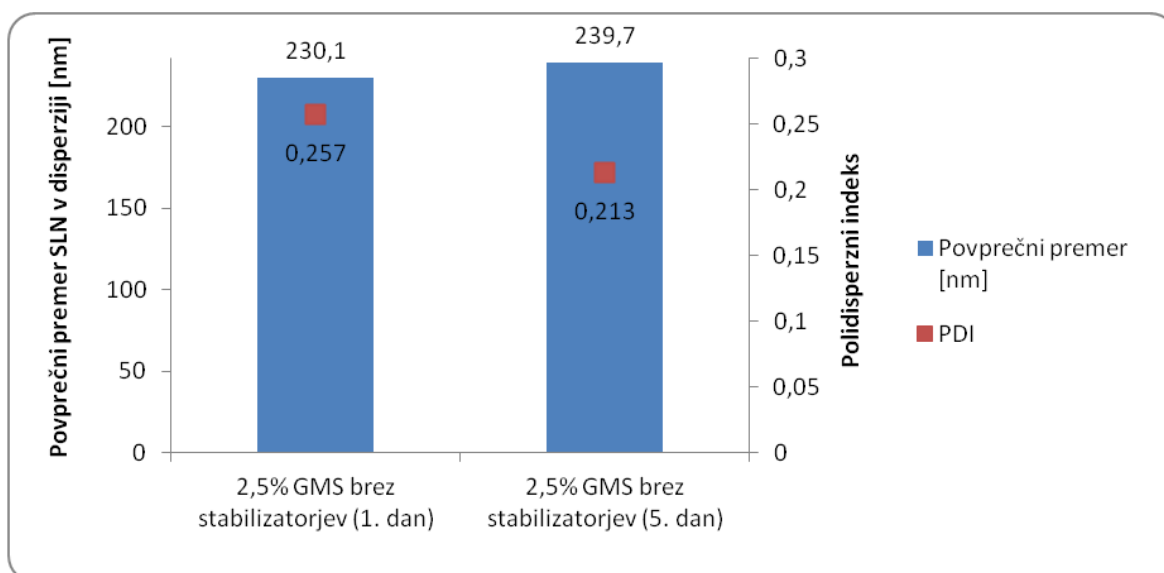
Disperzije trdnih lipidnih nanodelcev po recepturi 9 (3,5 % GMS), izdelane v različnem volumnu (3 oz. 21 mL) smo vgradili v hidrogelne in le-te uporabili v *in vivo* študiji, v kateri smo ugotavljali vpliv velikosti SLN na hidratacijo kože in TEWL. Disperzije z manjšimi SLN smo dobili preko sedmih vzorcev, izdelanih v volumnu 3 mL v epruvetah s premerom 16 mm, ki smo jih združili v 21 mL disperzije SLN. Disperzije z večjimi SLN pa smo izdelali naenkrat (21 mL) v epruveti s premerom 30 mm.

4.2 FIZIKALNA STABILNOST DISPERZIJ TRDNIH LIPIDNIH NANODELCEV

4.2.1 FIZIKALNA STABILNOST DISPERZIJ SLN RAZLIČNE SESTAVE PRED VGRADITVIJO V HIDROGEL

Disperzijam SLN različne sestave smo vrednotili fizikalne lastnosti (povprečni premer, PDI in ZP) skozi daljše časovno obdobje (45 ± 4 dni). Shranjevali smo jih v temi in pri sobni temperaturi ($22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$). Posamezne vzorce disperzij SLN smo pokrili s parafilmom, da smo se izognili vplivu vlage in kisika, zaradi katerih lahko pride do sprememb v disperziji SLN (hidroliza, oksidacija vzorcev).

Najprej smo izdelali disperzije SLN, ki so vsebovale 2,5 % GMS in so bile brez stabilizatorjev. S slike 11 je razvidno, da po 5 dneh shranjevanja ni bilo bistvenih razlik v fizikalnih parametrih delcev, po 49 dneh pa smo opazili usedlino, ki se je po stresanju dispergirala v velike vidne delce. Disperzija SLN brez dodanih stabilizatorjev dolgoročno ni fizikalno stabilna.

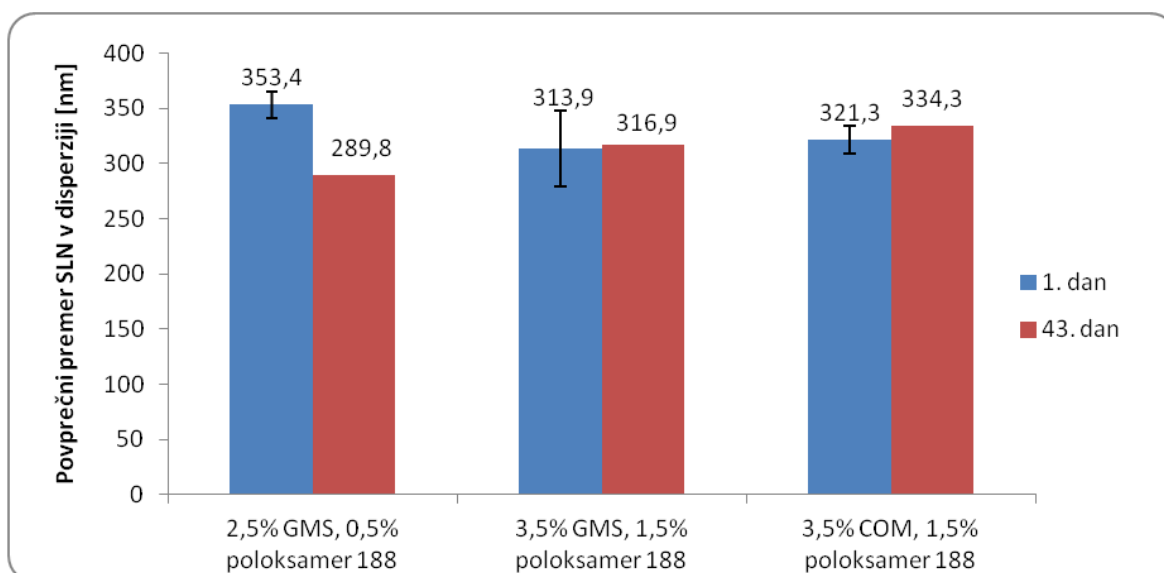


Slika 11: Primerjava povprečnega premera in polidisperznega indeksa SLN v disperziji po 1. in 5. dnevu shranjevanja pri sobni temperaturi. Disperzija SLN je bila izdelana po recepturi 7.

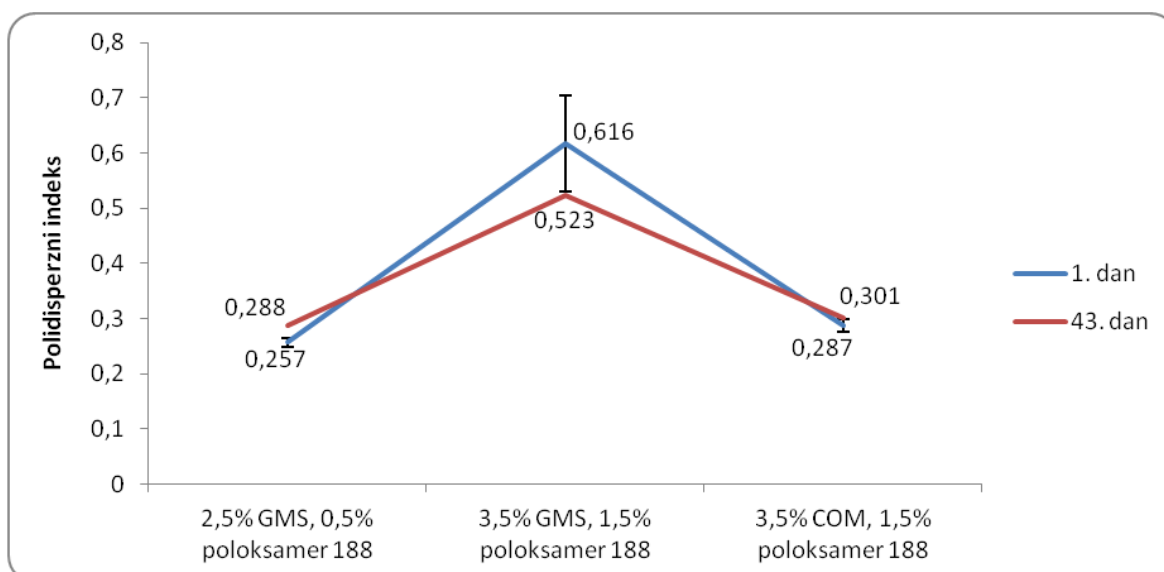
Izdelali smo tudi disperzijo SLN, kjer smo uporabili samo GMS, Phospholipon®80H ter prečiščeno vodo. Izmerili smo povprečni premer delcev 187 nm ter polidisperzni indeks 0,532. Že prvi dan shranjevanja smo v disperziji opazili večje delce. Vzorec je bil heterogen. Po 5 dneh shranjevanja smo opazili usedlino, ki se je po stresanju prav tako dispergirala v velike vidne delce.

Zaključili smo, da je prisotnost steričnega stabilizatorja v disperziji SLN bistvena za samo fizikalno stabilnost disperzij. Tudi v literaturi smo zasledili, da so disperzije, ki vsebujejo samo fosfolipid kot stabilizator (Phospholipon®80H), fizikalno nestabilne. Fizikalni nestabilnosti se izognemo tako, da disperziji SLN dodamo še sterični stabilizator (poloksamer 188) (30).

S slik 12 in 13 je razvidno, da po 43 dneh shranjevanja disperzij SLN z različno sestavo (prisoten sterični stabilizator) ni bilo bistvenih razlik v fizikalnih parametrih delcev. Disperzije SLN so po 43 dneh shranjevanja ostale transparentne, brez vidne usedline. Disperzije SLN izdelane po recepturah 2, 9 in 10 so se izkazale za fizikalno stabilne in primerne za nadaljno uporabo.



Slika 12: Primerjava povprečnega premera SLN v disperziji po 1. in 43. dnevu shranjevanja pri sobni temperaturi v odvisnosti od različne sestave disperzije SLN. Disperzije SLN so bile izdelane po recepturah 2, 9 in 10.



Slika 13: Primerjava polidisperznega indeksa SLN v disperziji po 1. in 43. dnevu shranjevanja pri sobni temperaturi v odvisnosti od različne sestave disperzije SLN. Disperzije SLN so bile izdelane po recepturah 2, 9 in 10.

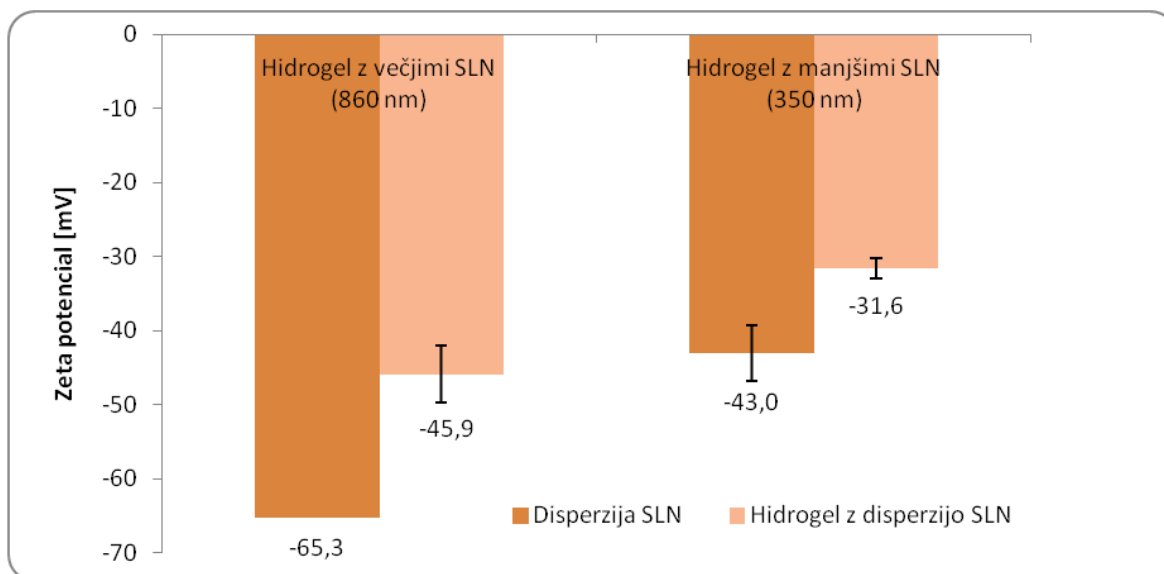
4.2.2 FIZIKALNA STABILNOST DISPERZIJ SLN RAZLIČNE SESTAVE IN VELIKOSTI PO VGRADITVI V HIDROGEL

Fizikalno stabilnost disperzij SLN po vgraditvi v hidrogel smo spremljali pri vzorcih, ki smo jih izdelali po recepturah 2, 9 in 10. Formulacije smo shranjevali 1 mesec pri sobni temperaturi, zaščiteno pred svetlobo. Po 1 mesecu shranjevanja so se pokazali znaki fizikalne nestabilnosti pri hidrogelu, ki je imel vgrajene SLN (3,5 % Compritol®). Hidrogel ni bil več homogen, v njem so se pojavili vidni delci. Preostale formulacije (hidrogel brez SLN, hidrogel s SLN (2,5 % GMS), hidrogel s SLN (3,5 % GMS)) so po 1 mesecu shranjevanja pod istimi pogoji ostale nespremenjene.

V poglavju 4.1.5 smo predstavili vpliv volumna izdelave disperzije na fizikalne lastnosti SLN pred vgraditvijo v hidrogel. Ker smo disperzije z različnimi velikostmi SLN vgradili v hidrokele, nas je zanimala tudi fizikalna stabilnost omenjenih disperzij SLN po vgraditvi hidrokele. Hidrokele z vgrajenimi SLN z različno velikostjo smo razredčili z vodo v razmerju 1:20 in izmerili fizikalne lastnosti (povprečni premer, PDI in ZP). Merjenje zeta potenciala nam omogoča napoved fizikalne stabilnosti vodnih disperzij trdnih lipidnih

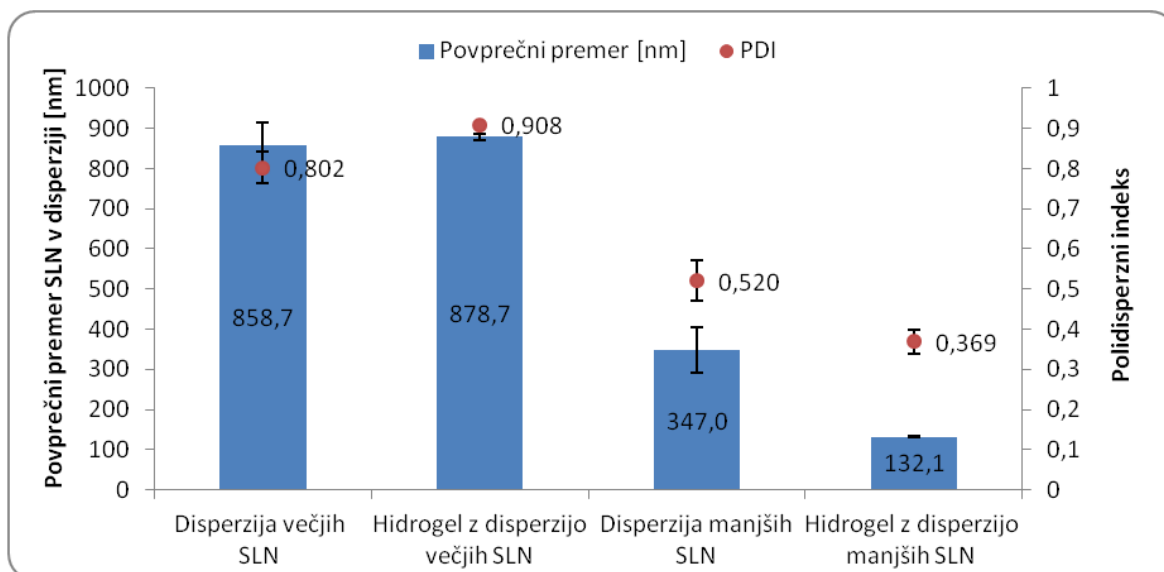
nanodelcev. Združevanje SLN je zaradi elektrostatskega odboja ponavadi manj verjetno za delce, ki imajo visoko absolutno vrednost zeta potenciala ($> |30|$ mV).

Kot je razvidno s slike 14, so trdni lipidni nanodelci po vgraditvi v hidrogel ostali negativno nabiti. Absolutna vrednost zeta potenciala se je v obeh primerih zmanjšala, vendar to ni vplivalo na fizikalno stabilnost.



Slika 14: Primerjava zeta potenciala SLN po izdelavi disperzije in po vgraditvi disperzije SLN v hidrogel. Rezultati predstavljajo povprečje dveh meritev s standardno deviacijo.

Povprečni premer delcev in PDI se po vgraditvi v hidrogel nista bistveno spremenila oziroma sta se zmanjšala. Pri hidrogelu z večjimi SLN je premer delcev ostal manjši od 900 nm, pri hidrogelu z manjšimi SLN pa manjši od 400 nm. PDI se je v primeru hidrogela z večjimi SLN povečal iz 0,802 na 0,908, v primeru hidrogela z manjšimi SLN pa se je zmanjšal iz 0,520 na 0,369 (slika 15).



Slika 15: Primerjava povprečnega premera in PDI SLN po izdelavi disperzije in po vgraditvi disperzije SLN v hidrogel. Rezultati predstavljajo povprečje dveh meritev s standardno deviacijo.

Na podlagi rezultatov lahko ugotovimo, da po vključitvi disperzij SLN v hidrogel do agregacije delcev ni prišlo. Do podobnih rezultatov so prišli avtorji študije Souto E.B. s sodelavci. Vrednotili so fizikalno stabilnost SLN in NLC pred in po vključitvi disperzij v hidrogel. Za pripravo hidrogelov so uporabili štiri različne tvorilce gela, med njimi tudi hidroksietilcelulozo. SLN so pripravili z visokotlačno homogenizacijo. Uporabili so Dynasan[®]116, tiloksapol in prečiščeno vodo. Fizikalne lastnosti so vrednotili s fotonsko korelacijsko spektroskopijo in lasersko difrakcijo. Pri vseh testiranih formulacijah ni prišlo do agregacije delcev, zeta potencial, povprečni premer in PDI so ostali nespremenjeni ali so se zmanjšali.

4.3 IN VIVO PREDŠTUDIJA: VPLIV HIDROGELA BREZ IN S SLN RAZLIČNE SESTAVE NA HIDRATACIJO KOŽE IN TEWL

In vivo predštudijo smo izvedli na eni prostovoljki s štirimi formulacijami:

1. Hidrogel brez SLN
2. Hidrogel z 2,5 % GMS SLN
3. Hidrogel s 3,5 % GMS SLN

4. Hidrogel s 3,5 % Compritol®SLN

Namen *in vivo* predštudije je bil izbrati ustrezne vzorce za nadaljnjo študijo in ugotoviti ali imata koncentracija in vrsta lipida, ki tvorijo SLN, vpliv na hidratacijo kože in TEWL. V študijah, ki smo jih proučili, so trdne lipidne nanodelce vgrajevali v kremo tipa O/V. Lipidno in vodno fazo so ločeno segreti. Nato so vročo vodno fazo med mešanjem dodali lipidni fazi in ohladili. Disperzijo SLN so v kremo vključili tako, da so del (40 – 50 %) ali celotno količino vode nadomestili z disperzijo SLN (9, 16, 25).

Za *in vivo* predštudijo in študijo smo se odločili izdelati hidroksietilcelulozni hidrogel. Odločitev je temeljila predvsem na enostavnosti izdelave ter na odsotnosti lipofilne faze, ki močno vpliva na vlažnost kože in TEWL.

Hidroksietilcelulozni hidrogel, izdelan po recepturi iz Formularium Slovenicum (HEC 2,5 %, glicerol 10 %, prečiščena voda 87,5 %) je bil viskozen, brezbarven in lepljiv na otip. Lepljivost smo zmanjšali z znižanjem koncentracije glicerola na 5 %. Zaradi velike vsebnosti vode, ki predstavlja mikrobiološko gojišče, smo hidrogel konzervirali z 0,1 % Na-benzoatom, ki smo ga raztopili v prečiščeni vodi.

V raziskovalnem delu avtorja Yingngam B. so tudi proučevali vpliv trdnih lipidnih nanodelcev na hidratacijo kože. Primerjali so rezultate, ki so jih dobili po aplikaciji disperzije SLN brez aktivne spojine, disperzije SLN z vključeno aktivno spojino, kreme tipa O/V, kreme tipa O/V z vključeno aktivno spojino, kreme tipa O/V z vključeno disperzijo trdnih lipidnih nanodelcev in kreme tipa O/V z vključeno disperzijo trdnih lipidnih nanodelcev z vgrajeno aktivno spojino. Dobili so popoln pregled, kako posamezne komponente vzorcev vplivajo na hidratacijo kože (31). V naši študiji smo želeli poleg hidrogela brez SLN in hidrogelov z vključeno disperzijo trdnih lipidnih nanodelcev različne sestave, uporabiti še same disperzije SLN. Na podlagi dobljenih rezultatov bi ugotovili doprinos posamezne sestavine k hidrataciji kože in TEWL. Nanosa omenjenih disperzij SLN nismo uspeli izvesti, saj nam sestava disperzije SLN zaradi visoke vsebnosti vode (> 80 %), tega ni omogočala. Pri nanosu disperzije SLN na kožo je vzorec stekel z označenega področja.

Rezultati, ki smo jih dobili pri merjenju hidratacije kože in TEWL na označenih področjih brez nanešenih hidrogelov, so nam služili kot kontrola. Štiri različne hidrokele smo nanesli

na označena področja ter po 30 in 60 min ponovno izmerili hidracijo kože in TEWL. Meritve s Corneometrom[®] in Tewametrom[®] so bile opravljene v skladu z navodili, ki smo jih predstavili v uvodu. Prostovoljka je bila nameščena v sobo, kjer je bila temperatura $25,7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ in relativna vlažnost $23,4\text{ \%} \pm 0,5\text{ \%}$. Pred samim začetkom meritev se je testirana oseba 15 min aklimatizirala na pogoje v prostoru.

S slik 16 in 17 je razvidno, da se je hidracija kože izboljšala po aplikaciji vseh štirih hidrogelov po določenem času. Povečanje hidracije kože smo potrdili tudi s parnim t-testom, kjer smo v vseh štirih primerih dobili statistično značilne razlike v vrednostih pred nanosom in po nanosu posameznega hidrogela ($p < 0,05$) (tabela 5).

Tabela 5: Povečanje hidracije kože po 30 in 60 minutah od nanosa hidrogelov brez in s SLN različne sestave. Rezultati so podani kot povprečna razlika med vrednostjo hidracije po 30 oz. 60 min in vrednostjo pred nanosom, s standardno deviacijo.

	ΔHidracija30 (SD)	p	ΔHidracija60 (SD)	p
Hidrogel brez SLN	9,8 (1,72)	0,000	9,48 (2,91) ^a	0,000
Hidrogel s SLN (2,5 % GMS)	12,75 (4,48)	0,001	14,72 (4,06) ^b	0,000
Hidrogel s SLN (3,5 % GMS)	13,95 (4,16)	0,000	15,7 (3,18) ^{a, c}	0,000
Hidrogel s SLN (3,5 % COM)	10,60 (3,18)	0,000	8,48 (2,39) ^{b, c}	0,000
p-ANOVA	0,192		0,001	

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

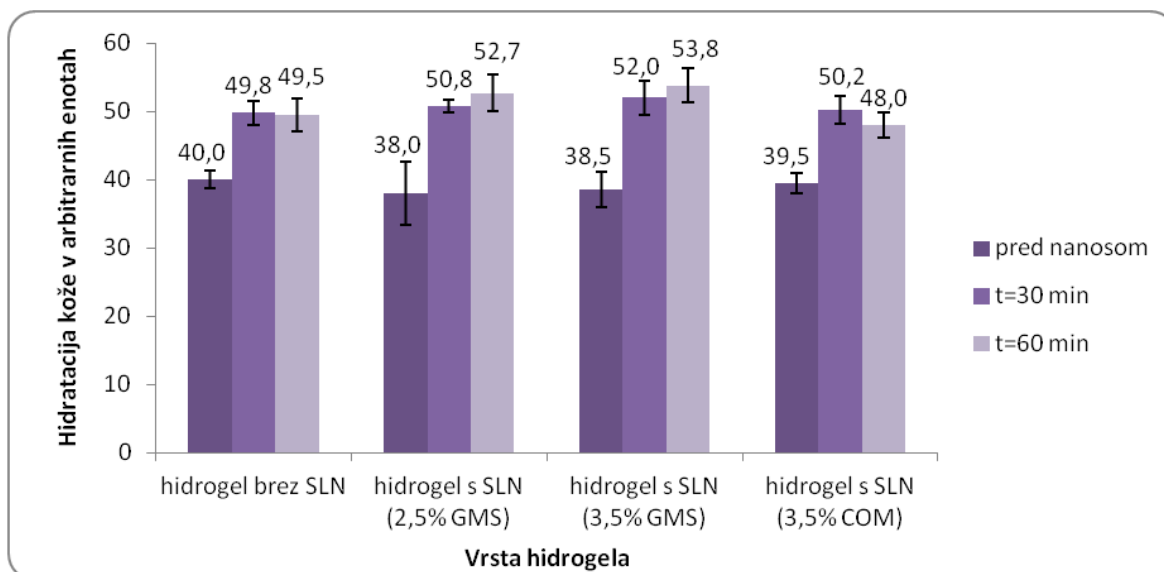
p-ANOVA podaja značilnost razlike med posameznimi hidrogeli (ANOVA enega faktorja).

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

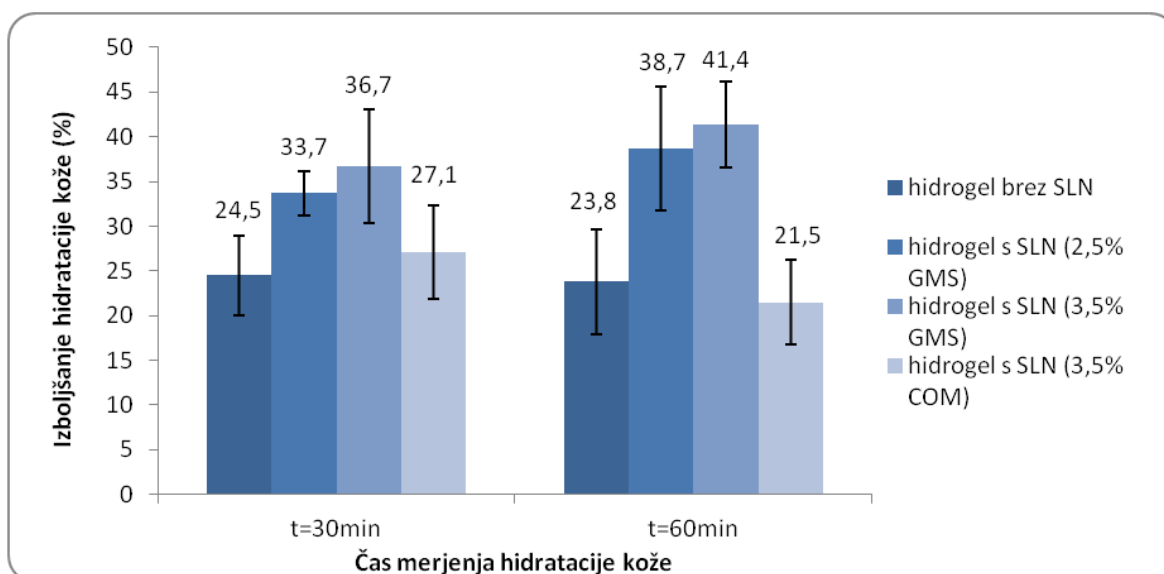
Na sliki 17 vidimo, da že hidrogel brez SLN poveča hidratacijo kože za 24,5 % oz. 23,8 % (po 30 min oz. 60 min). Hidrogeli z vgrajenimi trdnimi lipidnimi nanodelci so v primerjavi s hidrogelom brez SLN bolj povečali hidratacijo kože. Po statistični analizi podatkov (analiza variance (ANOVA) enega faktorja) smo dobili značilne razlike med povprečji po 60 min ($p = 0,001$) (tabela 5). Po 30 min se povprečja značilno niso razlikovala ($p = 0,192$) (tabela 5). Pri času 60 min smo izvedli Post Hoc test, ki je pokazal značilno razliko med hidrogelom brez SLN in hidrogelom s 3,5 % GMS SLN ($p = 0,018$), značilno razliko med hidrogeloma z 2,5 % GMS SLN in 3,5 % COM SLN ($p = 0,018$) ter značilno razliko med hidrogeloma s 3,5 % GMS SLN in 3,5 % COM SLN ($p = 0,005$) (tabela 5).

Hidrogel s 3,5 % Compritol[®] SLN se je izkazal kot najslabša formulacija med hidrogeli z vgrajenimi SLN, saj je bila hidratacija kože po 30 min (27,1 %) v primerjavi s hidrogelom brez SLN (24,5 %) boljše le za 2,6 %. Hidrogela z 2,5 % in 3,5 % GMS SLN sta v primerjavi s hidrogelom brez SLN izboljšala hidratacijo kože po 30 min za 9,7 % oz. 12,7 %. Hidrogel s Compritolom[®] se je razlikoval tudi po izgledu in po občutku pri aplikaciji na kožo. Bil je homogeno bele barve, v kožo se je slabo vpijal ter na njej puščal učinek sijaja. Po 1 mesecu shranjevanja hidrogela na sobni temperaturi, so se pokazali znaki fizikalne nestabilnosti (poglavje 4.2).

Hidratacija kože se po 60 min od nanosa hidrogelov z različno sestavo disperzije SLN ni bistveno spremenila v primerjavi z vrednostmi, ki smo jih dobili 30 min po nanosu. Vpliv hidrogela in časa na povečanje hidratacije kože smo ovrednotili z multivariantno analizo. Z ANOVO dveh faktorjev smo potrdili, da je na hidratacijo kože vplivala samo vrsta hidrogela ($p = 0,000$). Čas na hidratacijo kože ni imel vpliva ($p > 0,05$).



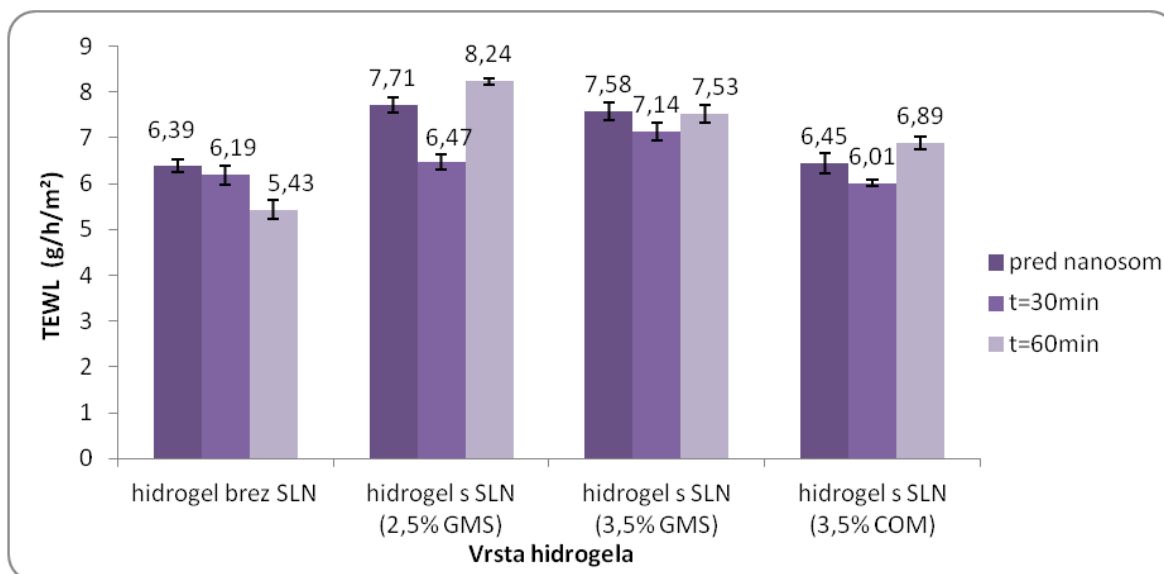
Slika 16: Hidratacija kože (izražena v arbitrarnih enotah) pred nanosom hidrogela ter po 30 in 60 min od nanosa v odvisnosti od vrste hidrogela. Rezultati so podani kot povprečje 6 meritev pri 1 prostovoljki s standardno deviacijo.



Slika 17: Izboljšanje hidratacije kože (%) po 30 in 60 min od nanosa hidrogela glede na začetno hidratacijo kože. Rezultati so podani kot povprečje 6 meritev pri 1 prostovoljki s standardno deviacijo.

Transepidermalna izguba vode se je po 30 min od nanosa hidrogelov zmanjšala v primeru vseh štirih hidrogelov (slika 18). Največje zmanjšanje TEWL lahko opazimo pri hidrogelu z 2,5 % GMS SLN (za 16,1 %). Hidrogel brez SLN je transepidermalno izgubo vode po 30

min zmanjšal za 3,1 %, hidrogela s 3,5 % GMS in 3,5 % COM pa sta TEWL zmanjšala za 5,8 % oz. 6,8 %. Po 60 min od nanosa različnih vrst hidrogelov so bili rezultati pri vseh hidrogelih s SLN presenetljivi, saj so bile končne vrednosti TEWL višje od začetnih. Statistične analize podatkov za transepidermalno izgubo vode nismo izvedli, ker smo za vsak vzorec imeli samo eno končno meritev (aparatura poda povprečje in SD neznanega števila meritev v določenem času (30 s)).



Slika 18: Transepidermalna izguba vode pred nanosom hidrogela ter po 30 in 60 min od nanosa v odvisnosti od vrste hidrogela. Vrednosti predstavljajo meritev pri 1 prostovoljki. Aparatura poda povprečje in SD neznanega števila meritev v določenem času (30 s).

Wissing S.A. in Muller R.H. sta študijo zasnovala tudi na dolgi rok. Prostovoljke so si nanašale dve formulaciji (krema O/V brez SLN in krema O/V z vgrajenimi cetil palmitat SLN) dvakrat na dan, 28 dni, pod kontroliranimi pogoji (25). Tudi v naši študiji smo izvedli poskus, v katerem si je prostovoljka 2 dni nanašala štiri vrste hidrogelov dvakrat na dan. Rezultati niso pokazali bistvene spremembe v hidrataciji kože in TEWL v primerjavi z vrednostmi po 30 min od enkratnega nanosa hidrogelov. Pri hidrataciji kože so se vrednosti gibale med 44 in 49 arbitrarnih enot, pri TEWL pa med 6,0 in 8,0 g/h/m².

Zaradi približno enakih rezultatov se v nadaljevanju raziskave nismo odločili za meritve po večkratnem nanosu.

Na podlagi dobljenih rezultatov predštudije smo se odločili, da bomo nadaljna testiranja izvajali s hidrogelom s 3,5 % GMS SLN. 3,5 % disperzijo GMS SLN smo izdelali po dveh

postopkih, ki sta omogočala nastanek različno velikih SLN. Želeli smo ugotoviti ali velikost SLN v hidrogelih značilno vpliva na hidratacijo kože in TEWL.

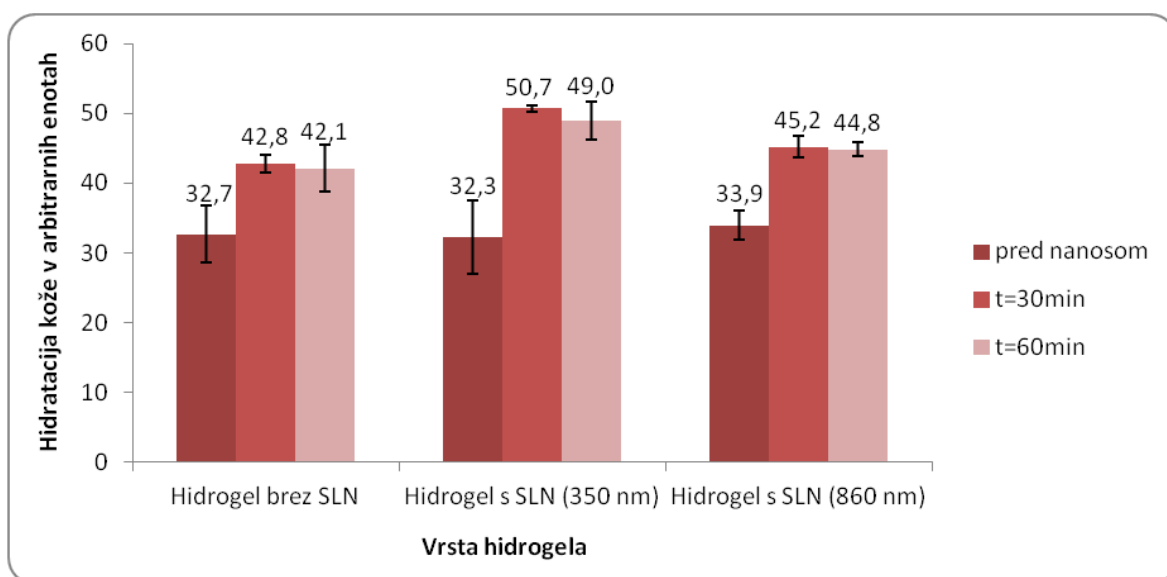
4.4 *IN VIVO* ŠTUDIJA: VPLIV HIDROGELOV Z VGRAJENIMI SLN Z RAZLIČNO VELIKOSTJO NA HIDRATACIJO KOŽE IN TEWL

In vivo študijo smo izvedli na 4 prostovoljkah s tremi formulacijami:

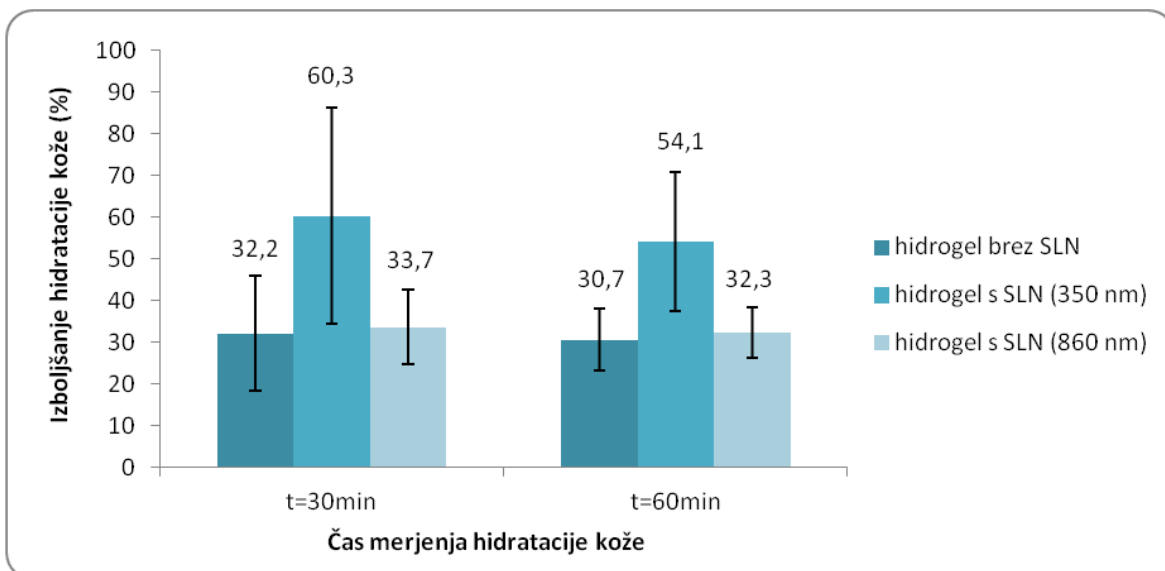
1. Hidrogel brez SLN
2. Hidrogel z manjšimi trdnimi lipidnimi nanodelci (3,5 % GMS SLN 350 nm)
3. Hidrogel z večjimi trdnimi lipidnimi nanodelci (3,5 % GMS SLN 860 nm)

Vsakemu narisanemu področju smo izmerili hidratacijo kože in TEWL pred nanosom treh vrst hidrogelov. Na podlagi podatkov pred nanosom smo lahko izračunali odstotek izboljšanja hidratacije kože in zmanjšanje TEWL po nanosu hidrogelov. Grafi, ki prikazujejo hidratacijo kože v arbitrarnih enotah, izboljšanje hidratacije kože v odstotkih in vrednosti TEWL v g/h/m² pred nanosom hidrogelov ter po 30 in 60 min od nanosa posameznega hidrogela, so za vsako prostovoljko predstavljeni v prilogi I.

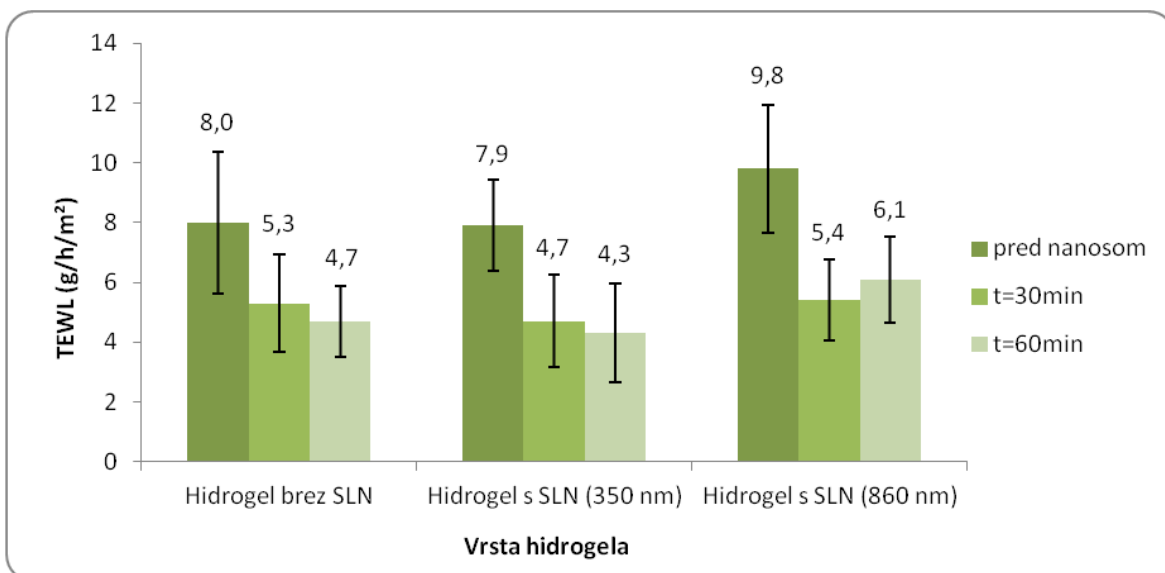
Ker so se začetne vrednosti hidratacije kože in TEWL razlikovale od osebe do osebe, smo za boljši pregled rezultatov vse dobljene vrednosti povprečili in jih prikazali v stolpičnih grafikonih (slika 19, 20, 21).



Slika 19: Hidratacija kože (izražena v arbitrarnih enotah) pred nanosom hidrogela ter po 30 in 60 min od nanosa v odvisnosti od vrste hidrogela. Rezultati so podani kot povprečje meritev pri 4 prostovoljках s standardno deviacijo.



Slika 20: Izboljšanje hidratacije kože (%) po 30 in 60 min od nanosa hidrogela glede na začetno hidratacijo kože. Rezultati so podani kot povprečje meritev pri 4 prostovoljках s standardno deviacijo.



Slika 21: Transepidermalna izguba vode (g/h/m²) pred nanosom hidrogela ter po 30 in 60 min od nanosa v odvisnosti od vrste hidrogela. Rezultati so podani kot povprečje meritev pri 4 prostovoljках s standardno deviacijo.

S slik 19 in 20 je razvidno, da se je hidratacija kože izboljšala po aplikaciji vseh treh hidrogelov po določenem času. Povečanje hidratacije kože smo potrdili tudi s parnim t-testom, kjer smo v vseh treh primerih dobili statistično značilne razlike v vrednostih pred nanosom in po nanosu posameznega hidrogela ($p < 0,05$) (tabela 6).

Tabela 6. Povečanje hidratacije kože po 30 in 60 minutah od nanosa hidrogelov brez in z SLN različne velikosti. Rezultati so podani kot povprečna razlika med vrednostjo hidratacije po 30 oz. 60 min in vrednostjo pred nanosom, s standardno deviacijo.

	ΔHidratacija30 (SD)	p	ΔHidratacija60 (SD)	p
Hidrogel brez SLN	10,10 (3,04) ^a	0,007	9,45 (0,94) ^a	0,000
Hidrogel s SLN (manjši)	18,40 (5,64) ^a	0,007	16,75 (3,38) ^{a, b}	0,002
Hidrogel s SLN (večji)	11,33 (2,50)	0,003	10,88 (1,50) ^b	0,001
p-ANOVA	0,033		0,003	

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, $p < 0,05$).

Že sam hidrogel brez SLN je izboljšal hidratacijo kože, saj je bil sestavljen iz hidrofilnega polimera (hidroksietilceluloza), ki tvori premreženo 3D strukturo, v katero sprejme večjo količino vode (33). Poleg hidrofilnega polimera je vseboval glicerol, ki je v farmacevtski in kozmetični industriji poznan kot vlažilec, ki je sposoben vezati vodo in prehajati v roženo plast kože. Glicerol vpliva na stopnjo vlažnosti, upočasni ali prepreči prekomerno sušenje in izhlapevanje (27). S statistično analizo (ANOVA enega faktorja) smo ugotovili značilne razlike med hidrogelom brez SLN, hidrogelom s SLN (350 nm) in hidrogelom s SLN (860 nm) glede povečanja hidratacije kože po 30 min ($p = 0,033$) in 60 min ($p = 0,003$) (tabela 6).

Z rezultati *in vivo* študije smo tudi dokazali, da je hidrogel z vgrajenimi manjšimi trdnimi lipidnimi nanodelci bolj učinkovit v smislu povečanja hidratacije kože kot hidrogel brez

SLN. Trdni lipidni nanodelci zaradi okluzivnih lastnosti povečajo hidratacijo kože in zmanjšajo transepidermalno izgubo vode (11).

Wissing S.A. in sodelavci so proučevali dejavnike, ki vplivajo na stopnjo okluzivnega učinka. Z *in vitro* testi so prišli do zaključka, da dobro okluzijo povzročajo trdni lipidni nanodelci s premerom 400 nm. Pri SLN, s premerom večjim od 600 nm, so opazili velik padec okluzije. Poleg velikosti trdnih lipidnih nanodelcev so proučevali tudi stopnjo okluzivnega učinka v odvisnosti od časovnih točk (po 6, 24 in 48 urah). Za trdne lipidne nanodelce s premerom med 200 in 400 nm so ugotovili, da stopnja okluzije med eksperimentom ostaja konstantna, kar podpira ugotovitev, da se okluzivni film tvori v prvi uri (11). Z našo *in vivo* študijo smo potrdili omenjene rezultate. Pri vseh štirih prostovoljkah je bil hidrogel s trdnimi lipidnimi nanodelci s premerom 350 nm, učinkovitejši glede povečanja hidratacije kože v primerjavi s hidrogelom s trdnimi lipidnimi nanodelci s premerom 860 nm. Post Hoc testi so pokazali značilno razliko v povečanju hidratacije kože med hidrogelom brez SLN in med hidrogelom z manjšimi SLN (350 nm) po 30 min ($p = 0,048$) in 60 min ($p = 0,003$) ter značilno razliko med hidrogelom z manjšimi SLN (350 nm) in hidrogelom z večjimi SLN (860 nm) po 60 min ($p = 0,013$) (tabela 6). Nanodelci manjših velikosti enostavneje in bolj učinkovito izoblikujejo in tvorijo film na koži, kar ima za posledico izboljšanje hidratacije kože in zmanjšanje transepidermalne izgube vode (11). V časovni odvisnosti smo opazili izboljšanje hidratacije kože po 30 min. Po 60 min bi pričakovali konstantnost, vendar se vrednosti nekoliko znižajo. Vpliv hidrogela in časa na povečanje hidratacije kože smo ovrednotili z multivariatno analizo. Z ANOVO dveh faktorjev smo potrdili, da na hidratacijo kože čas ni imel vpliva ($p > 0,05$), vplivala je samo vrsta hidrogela ($p = 0,000$).

Wissing S.A. in sodelavci so uporabili cetil palmitat, kjer je lipidna faza predstavljala 40 % celotne recepture. V našem primeru je bila koncentracija lipidne faze ($< 5,0$ %) premajhna, da bi zagotavljala primerljivo okluzijo in posledično konstantno izboljšanje hidratacije kože kot v omenjeni študiji. Do drugačnih rezultatov je lahko prišlo tudi zaradi razlik med *in vitro* testi in *in vivo* študijo, kjer se pogoji razlikujejo. Pri *in vitro* testih lahko pogoje stalno kontroliramo in prilagajmo.

Transepidermalna izguba vode (TEWL) predstavlja količino vode, ki z difuzijo in izhlapevanjem preide iz notranjosti telesa skozi roženo plast kože. Visoka vrednost TEWL (nad 25 g/h/m^2) nam pove, da se je pregradna funkcija rožene plasti spremenila in da

TEWL raste sorazmerno s stopnjo poškodbe rožene plasti. Bolj ko zaščitna plast kože opravlja svojo funkcijo, nižja je vrednost TEWL. Poleg tega, so povišane vrednosti TEWL povezane z nizko hidratacijo rožene plasti (34). V magistrski nalogi so rezultati pokazali, da so imele testirane osebe vrednosti TEWL nižje od 10 g/h/m² (zelo zdravo stanje kože). Pri vseh treh uporabljenih hidrogelih so se TEWL vrednosti po 30 min zmanjšale (slika 21). Pri hidrogelu brez SLN in hidrogelu z manjšimi SLN (350 nm) se je po 60 min TEWL še dodatno zmanjšal. Odstopanja smo dobili pri hidrogelu z večjimi delci (860 nm), kjer se je TEWL po 60 min povišal. Na podlagi vseh rezultatov smo potrdili hipotezo, da so aplicirani hidrogeli zmanjšali vrednosti TEWL v primerjavi z vrednostmi TEWL pred nanosom posameznega hidrogela, kar smo tudi dokazali s parnim t-testom ($p < 0,05$) (tabela 8). Glede na statistično analizo (ANOVA enega faktorja) pa značilnih razlik v zmanjšanju TEWL med različnimi hidrogeli nismo dokazali (tabela 7).

Tabela 7. Zmanjšanje TEWL po 30 in 60 minutah od nanosa hidrogelov brez in z SLN 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 SLN	-2,70 (1,08)	0,015	-3,33 (1,80)	0,034
Hidrogel s SLN (manjši)	-3,20 (0,51)	0,001	-3,60 (1,55)	0,009
Hidrogel s SLN (večji)	-4,45 (1,06)	0,004	-3,73 (2,13)	0,039
p-ANOVA	0,063		0,947	

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, $p < 0,05$).

Zaradi velike variabilnosti rezultatov ne moremo trditi, da je vgrajena disperzija trdnih lipidnih nanodelcev vplivala na manjše vrednosti TEWL, saj se je zmanjšanje (v odstotkih) pri vseh treh hidrogelih gibalo med 35,0 in 45,0 %. Glede na rezultate ANOVE dveh faktorjev smo prišli do zaključka, da je na transepidermalno izgubo vode vplivala samo vrsta hidrogela ($p = 0,003$), čas pa ne ($p > 0,05$).

Avtorji raziskovalnega dela Jennings V. s sodelavci so raziskovali vpliv različnih nanosistemov vgrajenih v kremo tipa O/V na okluzivne lastnosti. TEWL vrednosti so se zmanjšale v vseh primerih, kar je sovpadalo z našimi rezultati. Njihovi rezultati so pokazali najboljšo učinkovitost v primeru disperzije SLN in kreme, v katero so vgradili disperzijo SLN. Dokazali so tudi, da so se TEWL vrednosti po določenem času (po 24 h) v primeru uporabe SLN disperzije, še dodatno zmanjšale (9). Do boljših rezultatov so verjetno prišli zaradi drugačne metode izdelave SLN (visokotlačna homogenizacija), vključene aktivne spojine (vitamin A) in uporabe kreme tipa O/V (doprinos lipidne faze).

Kot smo že spoznali v uvodu, sta Corneometer[®] in Tewameter[®] merilni napravi, ki omogočata natančno in hitro merjenje hidratacije kože in TEWL. Poleg vseh prednosti, ki jih napravi nudita, moramo biti pozorni tudi na njune slabosti, saj lahko sam način merjenja vpliva na pravilnost dobljenih rezultatov. Na merjenje hidratacije kože in transepidermalne izgube vode vplivajo različni endogeni, eksogeni in okoljski faktorji. Med endogene faktorje prištevamo starost, anatomsko pozicijo, temperaturo kože, znojenje, krvni obtok in zdravstveno stanje kože. Med eksogene dejavnike pa prištevamo umivanje kože, delo v vodi, uporaba raznih detergentov in čistil in drugih dermalnih pripravkov, poškodbe kože ter kajenje. Endogenim dejavnikom smo se v našem primeru izognili tako, da smo izbrali osebe enake starosti z zdravim stanjem kože. Nekaterim zunanjim dejavnikom smo se izognili na način, da smo izbrali osebe, ki niso kadile in niso imele poškodb na koži. Prostovoljkam smo tudi prepovedali uporabo drugih dermalnih pripravkov dva dni pred študijo, ker nas je zanimal samo vpliv pripravljenih hidrogelov, vendar nismo mogli zagotoviti popolne kontrole nad njimi. Med okoljske dejavnike pa prištevamo konvekcijo zraka, temperaturo v prostoru, relativno vlažnost v prostoru, direktno svetlobo in različne letne čase. Corneometer[®] in Tewameter[®] zahtevata merjenje v prostoru, kjer je temperatura 20 °C, relativna vlažnost pa se giblje med 40,0 in 60,0 %. V naši *in vivo* študiji sta temperatura (22,7 °C ± 1,5 °C) in relativna vlažnost (28,5 % ± 3,6 %) odstopali od priporočenih vrednosti, kar je verjetno vplivalo na pravilnost rezultatov.

5 SKLEP

Na osnovi rezultatov optimizacije recepture disperzij SLN smo ugotovili, da prisotnost in koncentracija steričnega stabilizatorja ter vrsta in koncentracija lipida vplivajo na povprečni premer SLN in PDI ter na fizikalno stabilnost disperzij SLN. Za najbolj fizikalno stabilne in primerne za nadaljnjo uporabo so se izkazale disperzije z 2,5 % GMS SLN, 3,5 % GMS SLN in 3,5 % GMS COM. Ugotavljali smo vpliv koncentracije (2,5 % in 3,5 %) in vrste lipida (GMS in Compritol®) v disperziji SLN vgrajenih v hidrogel na hidratacijo kože in TEWL. Poleg omenjenih disperzij SLN smo za primerjavo uporabili tudi hidrogel brez vgrajenih SLN.

V *in vivo* predštudiji magistrske naloge smo ugotovili:

- Hidratacija kože se je značilno povečala po 30 in 60 min od nanosa vseh hidrogelov, tako brez SLN kot s SLN z različno sestavo.
- Že sam hidrogel brez SLN je izboljšal hidratacijo kože za 24,5 % oz. 23,8 % (30 min oz. 60 min), vendar smo boljše rezultate dosegli s hidrogeli z vgrajenimi disperzijami SLN.
- Vrsta lipida, ki tvori SLN, vpliva na hidratacijo kože. Dokazali smo statistično značilno razliko v povečanju hidratacije kože, ki smo jo določili po nanosu hidrogelov 3,5 % GMS SLN in 3,5 % GMS COM SLN. Hidratacija kože se je bolj povečala v primeru nanosa hidrogela s 3,5 % GMS SLN.
- Koncentracija lipida vpliva na hidratacijo kože, vendar se statistično značilna razlika pokaže šele med hidrogelom brez SLN in hidrogelom s 3,5 % GMS SLN.
- Transepidermalna izguba voda se je po 30 min od nanosa vseh hidrogelov zmanjšala.

Na podlagi dobljenih rezultatov predštudije, smo nadaljna testiranja izvajali s hidrogelom s 3,5 % GMS SLN, kjer smo 3,5 % GMS SLN izdelali po dveh postopkih, tako da smo dobili različno velike SLN. Ugotavljali smo vpliv velikosti SLN v hidrogelih na hidratacijo kože in TEWL.

V *in vivo* študiji magistrske naloge smo ugotovili:

- Hidracija kože se je 30 in 60 min po nanosu vseh hidrogelov (tako brez SLN kot s SLN različne velikosti) značilno povečala, vrednost TEWL pa značilno zmanjšala.
- Velikost SLN, ki so vgrajeni v hidrogel, vpliva na hidracijo kože. Dokazali smo statistično značilno razliko v povečanju hidracije kože, ki smo jo določili po nanosu hidrogela brez SLN in hidrogela z manjšimi SLN (350 nm) po 30 in 60 min ter značilno razliko v povečanju hidracije kože med hidrogelom z manjšimi SLN (350 nm) in hidrogelom z večjimi SLN (860 nm) po 60 min. V obeh primerih je bil hidrogel z manjšimi SLN (350 nm) učinkovitejši.
- Statistično značilnih razlik v zmanjšanju TEWL med različnimi hidrogeli nismo dokazali.

Za optimalnejšo izvedbo meritev bi bilo bolje, če bi testiranje izvedli v spomladanskih dneh, ko bi imeli bolj primerno temperaturo in relativno vlažnost v zraku. Kljub temu, da smo ugotovili, kako različne disperzije SLN vgrajene v hidrogel vplivajo na hidracijo kože, bi bilo smiselno, da bi ponovno izvedli študije, kjer bi lipidno fazo pri izdelavi SLN iz 3,5 % povečali na 20 %. S tem bi zagotovili tudi manjšo variabilnost rezultatov v primeru TEWL.

6 LITERATURA

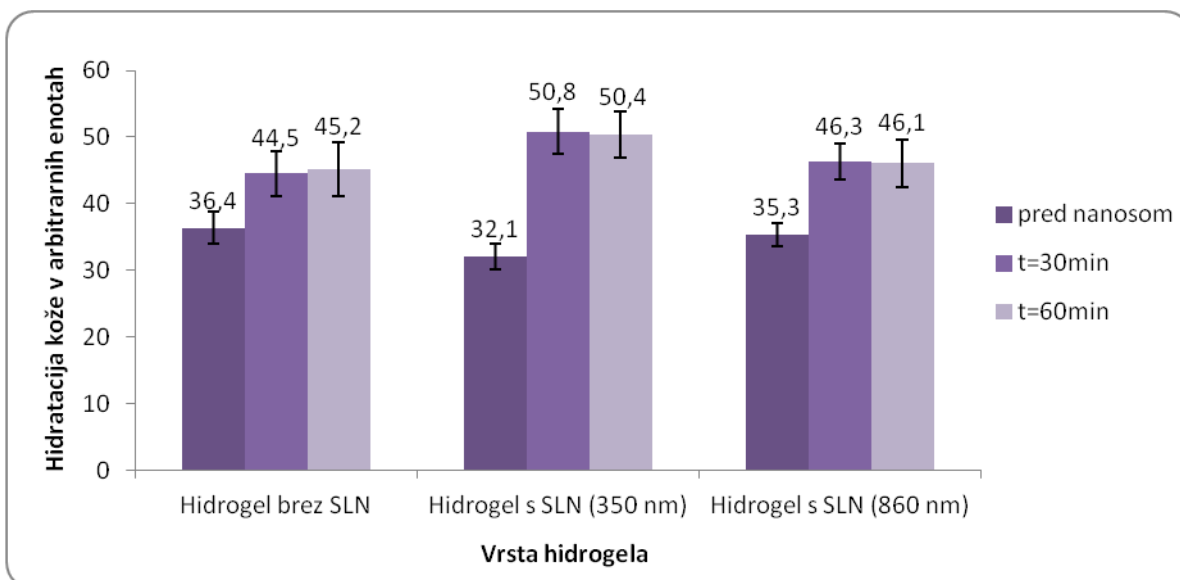
1. Kristl J: Vpliv nanotehnologije na razvoj zdravil. *Farm Vestn* 2012; 63: 65-142.
2. Sinha VR, Srivastava S, Goel H, Jindal V: Solid Lipid Nanoparticles (SLN'S) – Trends and Implications in Drug Targeting. *IJAPR* 2010; 1: 212-238.
3. Mehnert W, Mader K: Solid lipid nanoparticles. Production, characterization and application. *Adv Drug Delivery Rev* 2001; 47: 165-196.
4. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP: Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 2003; 24: 4283-4300.
5. Westesen K, Bunjes H: Do nanoparticles prepared from lipids solid at room temperature always possess a solid lipid matrix? *Int J Pharm* 1995; 41: 62-69.
6. Chen YC, Liu DZ, Liu JJ, Chang TW, Ho HO, Sheu MT: Development of terbinafine solid lipid nanoparticles as a topical delivery system. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 4409-4418.
7. Eposito E, Drechsler M, Mariani P, Sivieri E, Bozzinis R, Montesis L, Menegatti E, Cortesi R: Nanosystems for skin hydration: a comparative study. *Int J Cosmetic Sci* 2007; 29: 39-47.
8. Pardeike J, Hommoss A, Müller R.H: Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm* 2009; 366(1-2): 170-184.
9. Jennings V, Gysler A, Korting-Schafer M, Gohla SH: Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 49: 211-218.
10. Bunjes H, Westesen K, Koch MHJ: Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. *Int J Pharm* 1996; 129: 159-173.
11. Wissing SA, Lippacher A, Muller RH: Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN). *J Cosmet Sci* 2001; 52: 313-324.
12. Almdal K, Dyre J, Hvidt S, Kramer O (1993) What is a gel? *Makromol Chem Macromol Symp* 76:49–51.
13. <http://moja-kozmetika.blogspot.com/2013/11/kako-zasnujemo-formulo-za-hidrogel.html> (dostop: 27.1.2014, 16:32)
14. Heymann E: *Haut, Haar un Kosmetik*. Verlag Hans Huber, Bern, 2003.
15. Gosenca M, Gašperlin M: Membrane za in vitro testiranje dermalne absorpcije. *Farm Vestn* 2009; 60: 8-13.

16. Rawlings AV, Harding CR: Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther* 2004; 17 Suppl 1: 43-8.
17. Silva CL, Topgaard D, Kocherbitov V, Sousa JJS, Pais AACC, Sparr E: Stratum corneum hydration: Phase transformations and mobility in stratum corneum, extracted lipids and isolated corneocytes. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768: 2647-2659.
18. Loo CH, Basri M, Ismail R, Lau HLN, Tejo BA, Kanthimathi MS, Hassan HA, Choo YM: Effect of compositions in nanostructured lipid carriers (NLC) on skin hydration and occlusion. *Int J Nanomed* 2013; 8:13-22.
19. <http://www.dolenjske-lekarne.si/sl/svetovanje/suha-koza> (dostop: 25.1.2014, 22:10)
20. Plessis J, Stefaniak A, Eloff F, John S, Agner T, Chou TC, Nixon R, Steiner M, Franken A, Kudla I, Holness L: International guidelines for the in vivo assessment of skin properties in non – clinical settings: Part 2. transepidermal water loss and skin hydration. *Skin Res Technol* 2013; 1: 1-10.
21. Courage+Khazaka electronic GmbH: Information and operating instruction for the Corneometer CM825; 05/2010.
22. Courage+Khazaka electronic GmbH: Information and operating instruction for the Tewameter TM 300; 07/2011.
23. Mulla JS, Khazi IM: Influence of process variables on particle size of solid lipid nanoparticles. *IJNDD* 2009; 1: 47-49.
24. Ahlin P, Kristl J, Korbar JŠ: Optimization of procedure parameters and physical stability of solid lipid nanoparticles in dispersions. *Acta Pharmaceut* 1998; 48: 259-267.
25. Wissing SA, Muller RH: The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity – in vivo study. *Eur J Pharm Biopharm* 2003; 56:67-72.
26. Effat SF, Saman AN, Zahra T: Novel formulation and evaluation of a Q10 – loaded solid lipid nanoparticle cream: in vitro and in vivo studies. *Int J Nanomed* 2011; 6: 611 – 617.
27. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME: *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Sixth Edition, Pharmaceutical Press in American Pharmacists Associations, London, Washington, 2009: 308-310, 304-305, 662-663.

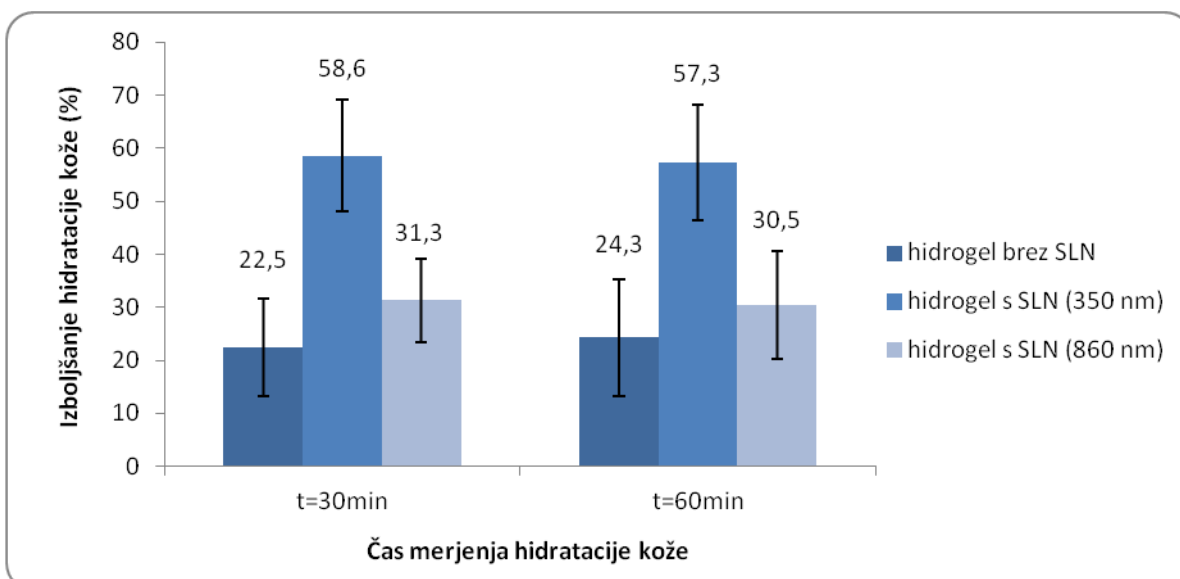
28. Špiclin P, Gašperlin M, Kmetec V: Stability of ascorbyl palmitate in topical microemulsions. *Int J Pharm* 2001; 222: 271 – 279.
29. Tekavčič Glover T, Trobevšek P: *Formularium Slovenicum 3,0: slovenski dodatek k Evropski farmakopeji*. 3rd ed. 2011: 168
30. Rebolj N, Kozjek F, Kristl J: Fizikalno kemične osnove nestabilnosti emulzij. *Farm Vestn* 1997; 48: 478-486.
31. <http://www.ist.cmu.ac.th/researchunit/pcrnc/paper/seminar/proc2.pdf>. (dostop 30.1.2014, 14:22)
32. Lee J, Lim G, Chung H.: Methods of preparation of drug nanoparticles. In: Kumar C. *Biological and pharmaceutical nanomaterials. Nanotechnologies for the life sciences Vol. 2*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2006; 255-286.
33. Rošič R, Kristl J, Baumgartner S: Hidrogelne obloge za vlažno celjenje ran s proteinsko učinkovino. *Farma Vestn* 2010. 61: 187-193.
34. Pardeike J, Schwabe K, Muller RH: 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

PRILOGA

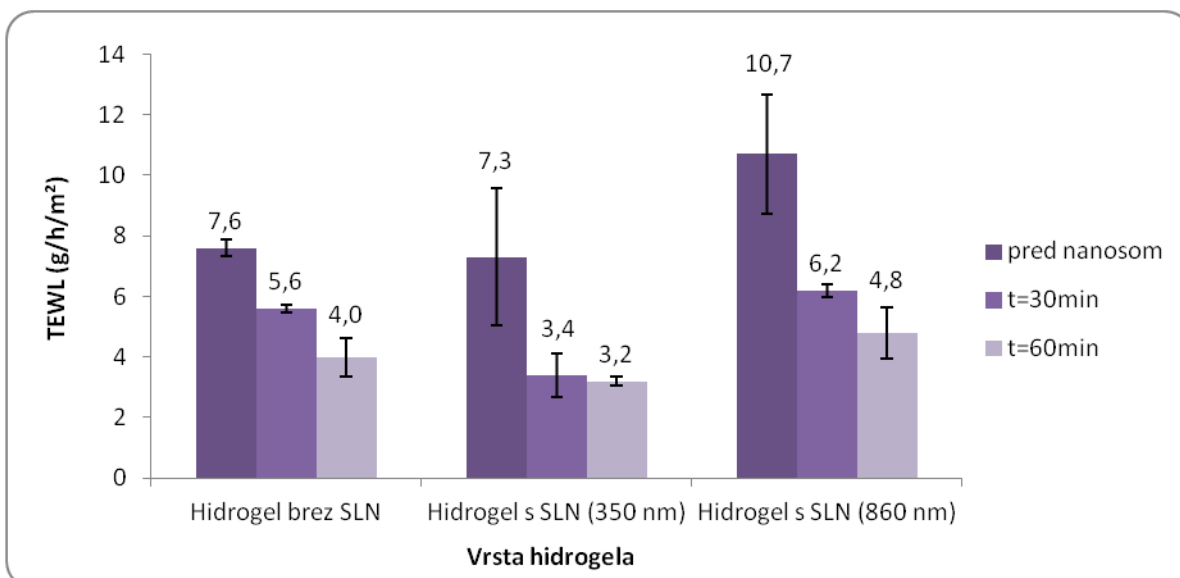
TESTIRANA OSEBA ŠT. 1



Slika 1: Hidratacija kože (izražena v arbitrarnih enotah) pred nanosom in po 30 ter 60 min od nanosa hidrogelov v odvisnosti od vrste hidrogela. Rezultati so podani kot povprečje 18 meritev s standardno deviacijo.

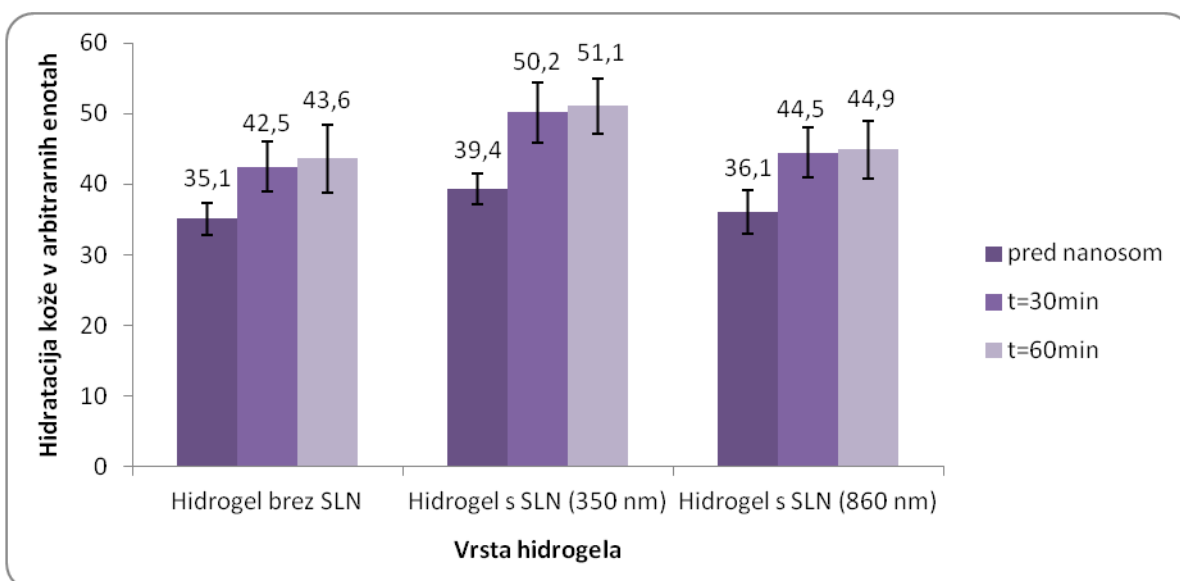


Slika 2: Izboljšanje hidratacije kože (%) po 30 in 60 min od nanosa različnih vrst hidrogelov glede na začetno hidratacijo kože. Rezultati so podani kot povprečje 18 meritev s standardno deviacijo.

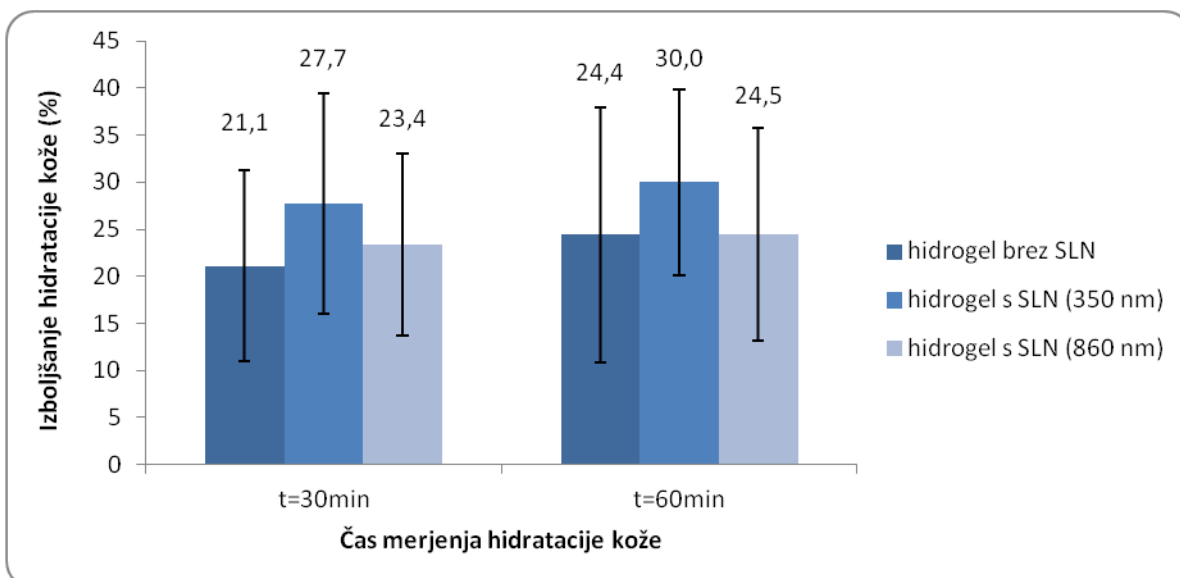


Slika 3: Transepidermalna izguba vode pred nanosom hidrogelov in po 30 ter 60 min od nanosa hidrogelov v odvisnosti od vrste hidrogela. Rezultati so podani kot povprečje 2 meritev v času 40 s standardno deviacijo.

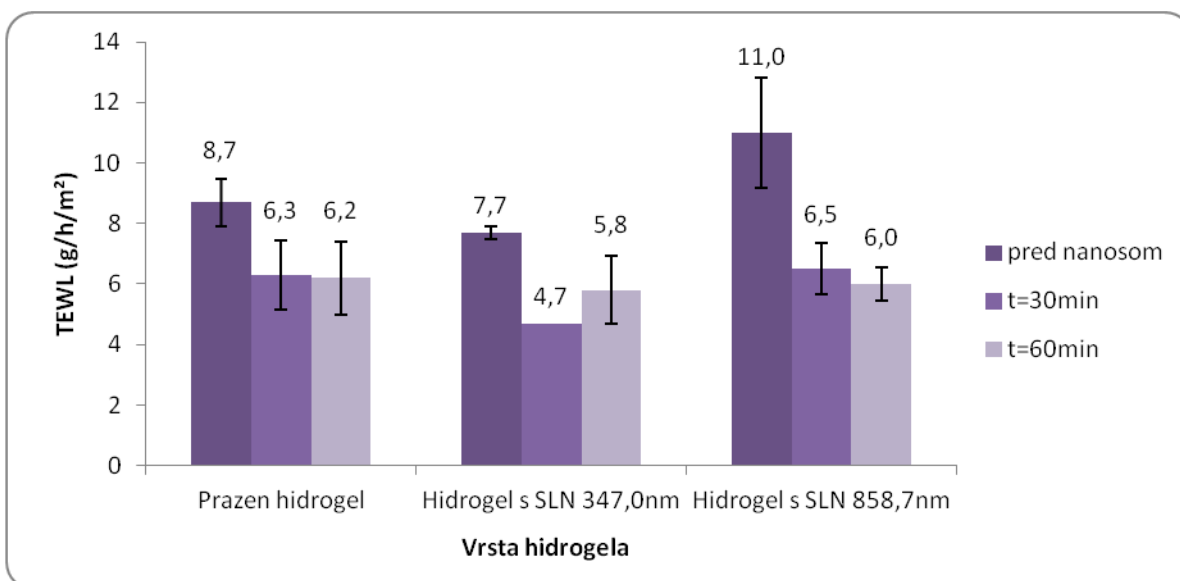
TESTIRANA OSEBA ŠT. 2



Slika 4: Hidratacija kože (izražena v arbitrarnih enotah) pred nanosom in po 30 ter 60 min od nanosa hidrogelov v odvisnosti od vrste hidrogela. Rezultati so podani kot povprečje 18 meritev s standardno deviacijo.

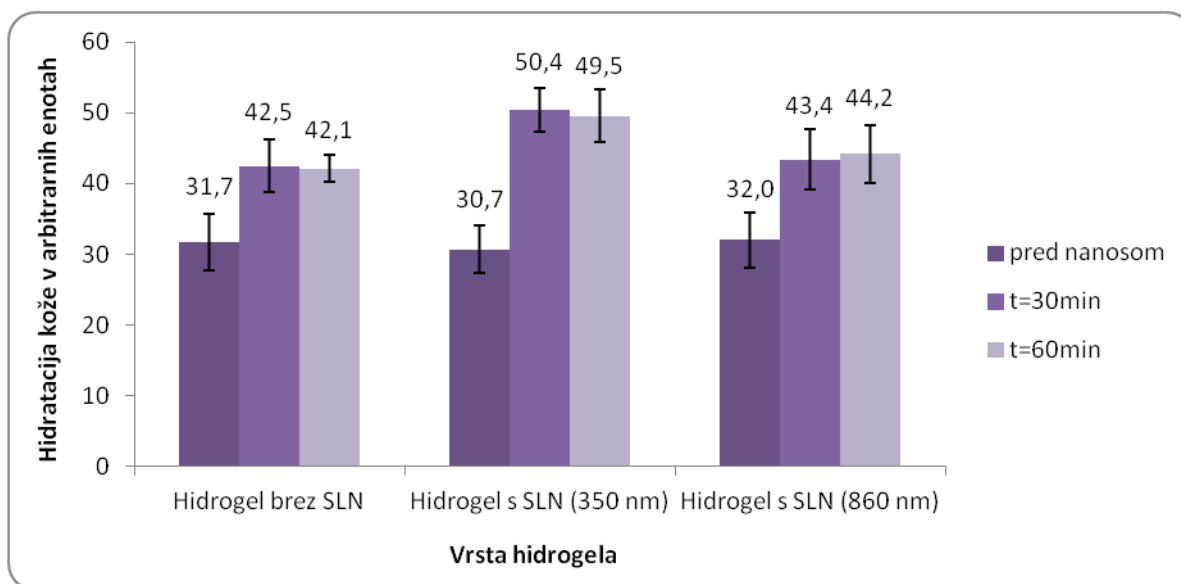


Slika 5: Izboljšanje hidratacije kože (%) po 30 in 60 min od nanosa različnih vrst hidrogelov glede na začetno hidratacijo kože. Rezultati so podani kot povprečje 18 meritev s standardno deviacijo.

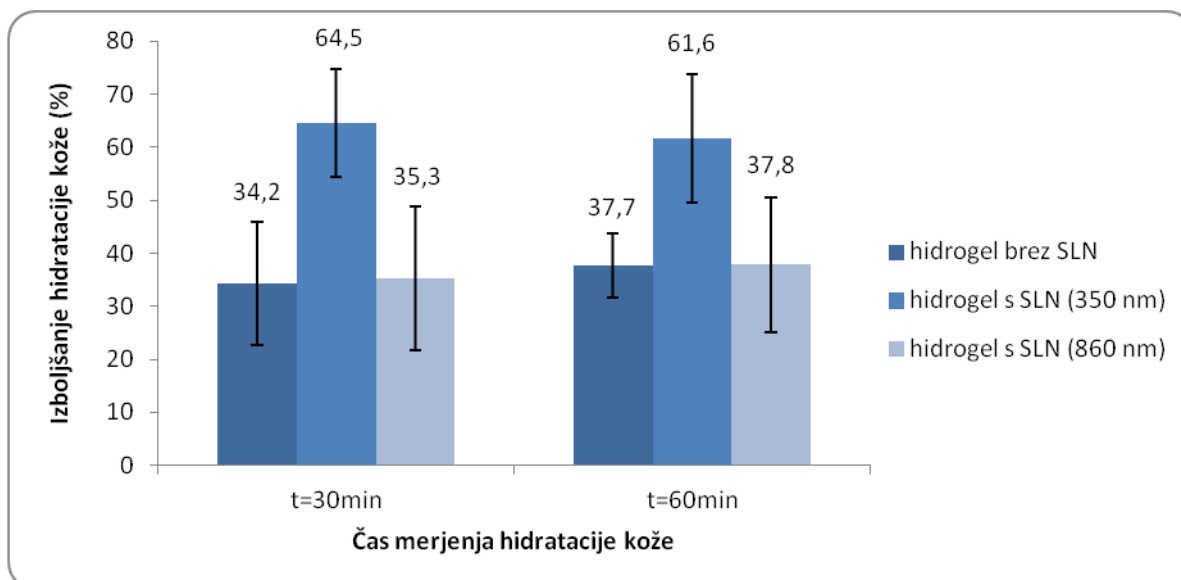


Slika 6: Transepidermalna izguba vode pred nanosom hidrogelov in po 30 ter 60 min od nanosa hidrogelov v odvisnosti od vrste hidrogela. Rezultati so podani kot povprečje 2 meritev v času 40 s standardno deviacijo.

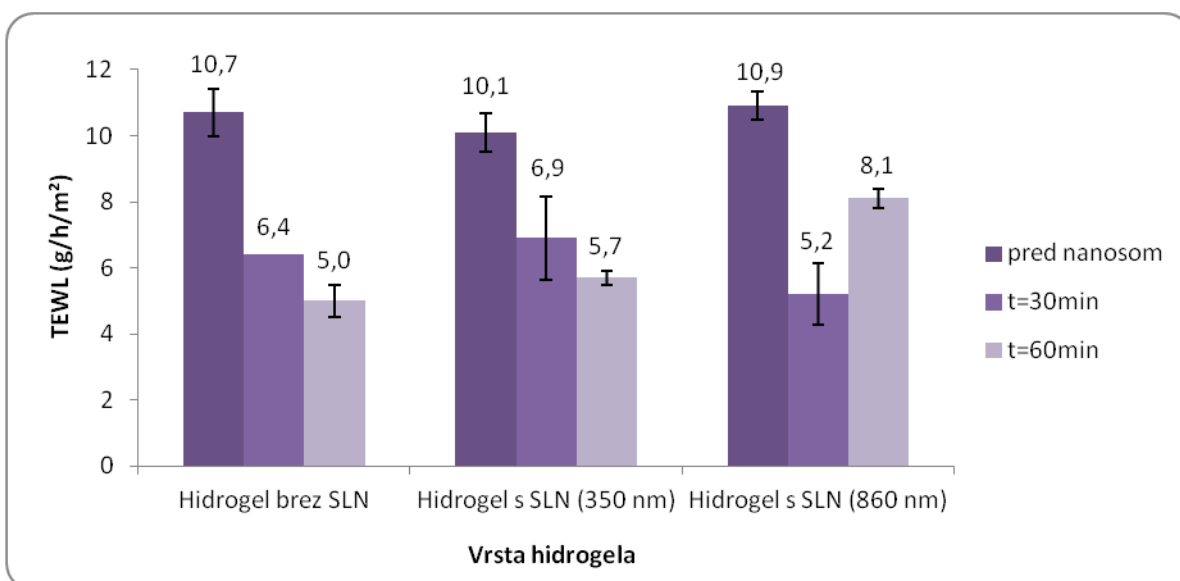
TESTIRANA OSEBA ŠT. 3



Slika 7: Hidratacija kože (izražena v arbitrarnih enotah) pred nanosom in po 30 ter 60 min od nanosa hidrogelov v odvisnosti od vrste hidrogela. Rezultati so podani kot povprečje 18 meritev s standardno deviacijo.

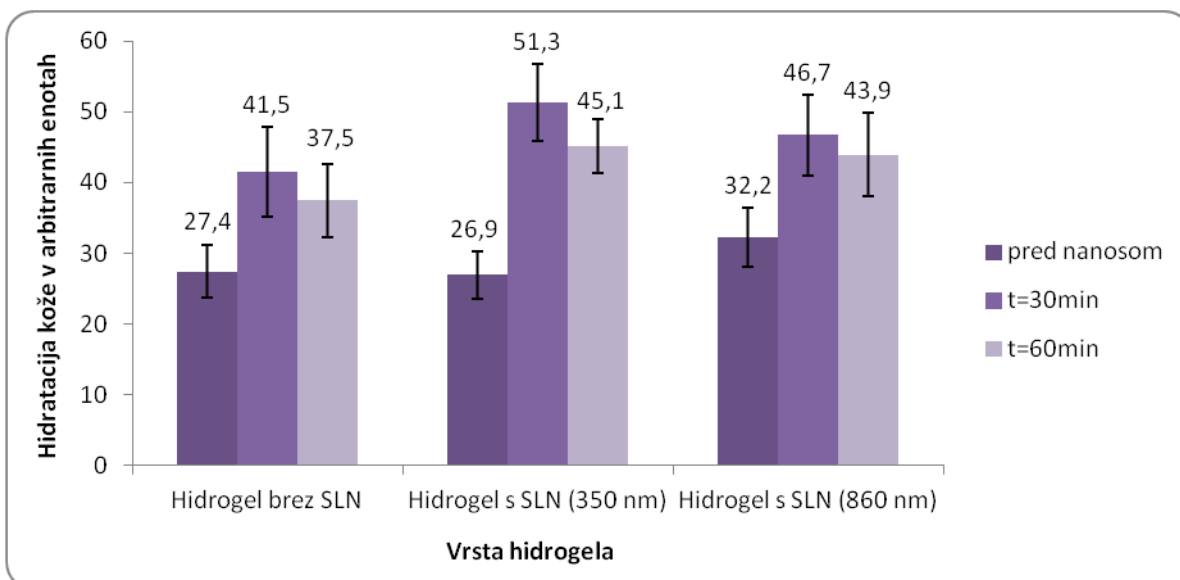


Slika 8: Izboljšanje hidratacije kože (%) po 30 in 60 min od nanosa različnih vrst hidrogelov glede na začetno hidratacijo kože. Rezultati so podani kot povprečje 18 meritev s standardno deviacijo.

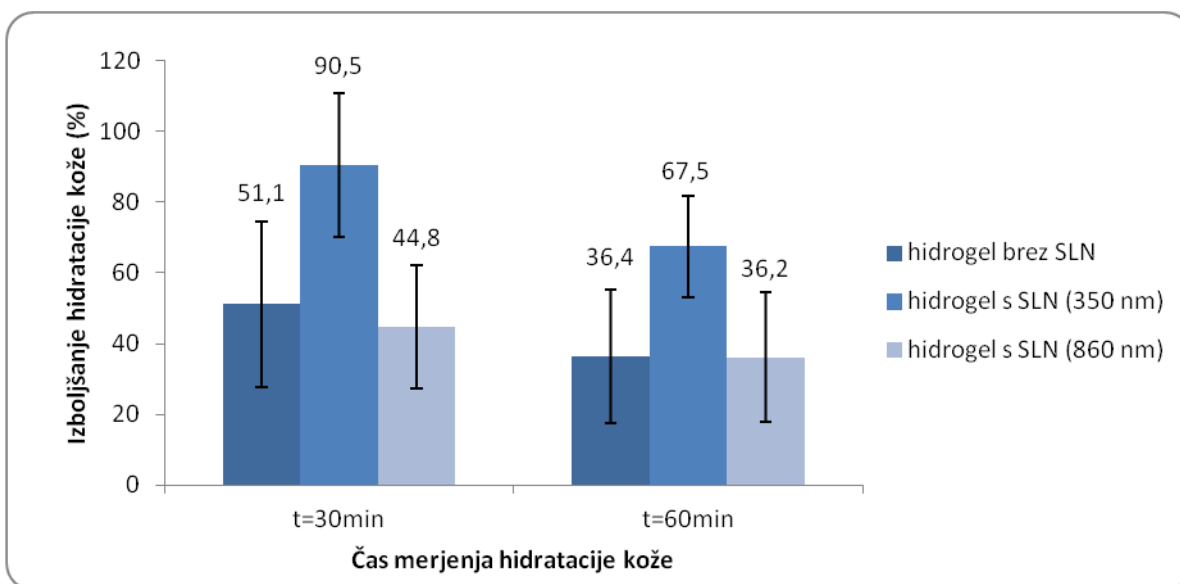


Slika 9: Transepidermalna izguba vode pred nanosom hidrogelov in po 30 ter 60 min od nanosa hidrogelov v odvisnosti od vrste hidrogela. Rezultati so podani kot povprečje 2 meritev v času 40 s standardno deviacijo.

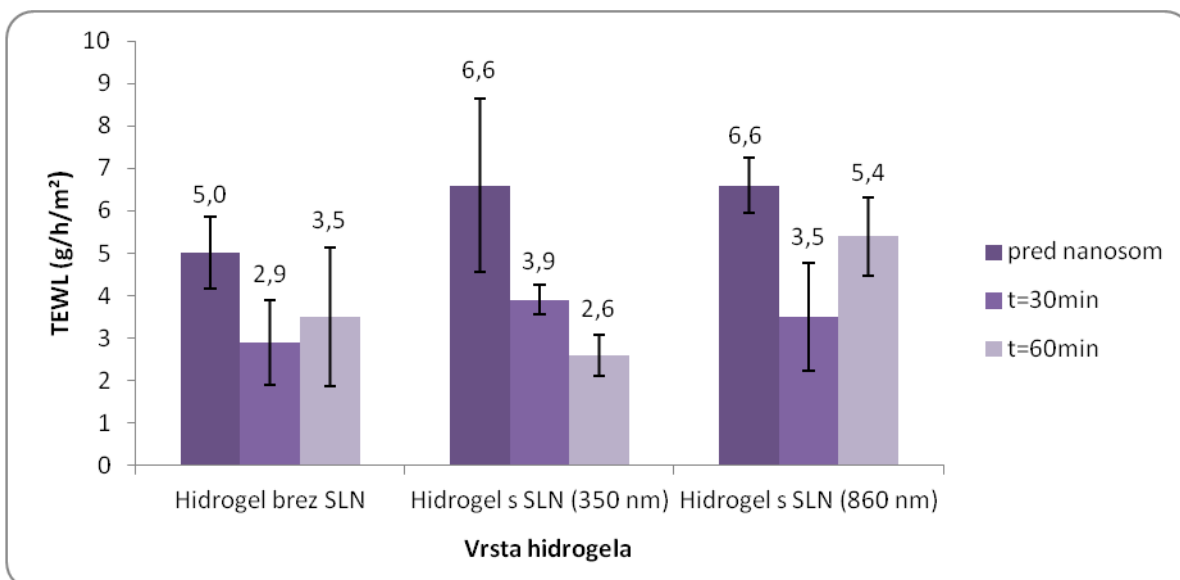
TESTIRANA OSEBA ŠT. 4



Slika 10: Hidratacija kože (izražena v arbitrarnih enotah) pred nanosom in po 30 ter 60 min od nanosa hidrogelov v odvisnosti od vrste hidrogela. Rezultati so podani kot povprečje 18 meritev s standardno deviacijo.



Slika 11: Izboljšanje hidratacije kože (%) po 30 in 60 min od nanosa različnih vrst hidrogelov glede na začetno hidratacijo kože. Rezultati so podani kot povprečje 18 meritev s standardno deviacijo.



Slika 12: Transepidermalna izguba vode pred nanosom hidrogelov in po 30 ter 60 min od nanosa hidrogelov v odvisnosti od vrste hidrogela. Rezultati so podani kot povprečje 2 meritev v času 40 s standardno deviacijo.