

Politechnika Łódzka
Wydział Technologii Materiałowych i Wzornictwa Tekstyliów
Instytut Włókiennictwa



Rozprawa doktorska

Terapeutyczne tekstylia wykorzystujące transdermalne systemy dostarczania substancji aktywnych

mgr Monika Owczarek

Promotor: prof. dr hab. inż. Dawid Stawski

Promotor pomocniczy: dr inż. Lucyna Herczyńska

Łódź 2024

*Panu prof. dr hab. inż. Dawidowi Stawskiemu
wyrazy wdzięczności za życzliwość, poświęcony czas,
cenne wskazówki merytoryczne oraz nieocenioną
pomoc w trakcie przygotowywania rozprawy doktorskiej,*

*Pani dr inż. Lucynie Herczyńskiej
serdeczne podziękowania za życzliwość, cierpliwość, wyrozumiałość,
wsparcie, budujące rozmowy, udostępnienie zaplecza badawczego,
cenne rady i merytoryczną pomoc w trakcie przygotowywania
rozprawy doktorskiej,*

*Panu dr hab. n. farm. Przemysławowi Sitarkowi, prof. uczelni
oraz dr hab. Tomaszowi Kowalczykowi
wyrazy wdzięczności za wsparcie,
i możliwość przeprowadzenia badań biologicznych.*

*Koleżankom i Kolegom z Łukasiewicz – ŁIT serdeczne podziękowania
za pomoc przy badaniach i ogromne wsparcie.*

*Na koniec pragnę podziękować moim Najbliższym,
Mamie, Tacie, Marcinowi i Anecie za bezgraniczną wiarę w moją osobę,
nieustające wsparcie, mobilizację i pomocną dłoń w momentach zwątpienia.*

SPIS TREŚCI:

Wykaz skrótów	6
Streszczenie	11
Summary.....	14
I CZĘŚĆ TEORETYCZNA	16
1. Wprowadzenie	16
2. Biotekstylia i tekstyilia medyczne	18
2.1. Biokompatybilność i biostabilność biotekstyliów	20
2.2. Polimery naturalne i syntetyczne do produkcji biotekstyliów	20
2.3. Materiały włókniste do zastosowań medycznych	22
2.3.1. Bawełna	25
3. Budowa i funkcje skóry	26
3.1. Transport substancji aktywnych przez skórę	29
4. Polimery naturalne i syntetyczne jako nośniki substancji aktywnej	34
4.1. Chitozan jako pochodna chityny	35
4.2. Alginian	37
4.3. Etyloceluloza	39
5. Ekstrakt z <i>Ginkgo biloba</i>	40
6. Nanocząstki	42
6.1. Nanocząstki nieorganiczne	42
6.2. Nanocząstki lipidowe	43
6.3. Nanonośniki polimerowe	45
6.3.1. Micele	46
6.3.2. Dendrymery	47
6.3.3. Nanocząstki polimerowe	49
6.3.3.1. Nanocząstki z polimerów syntetycznych	50
6.3.3.2. Nanocząstki z polimerów naturalnych	52
6.3.3.2.1. Nanocząstki chitozanowe	52
7. Metody otrzymywania ChNP	55
7.1. Żelowanie jonowe	55
7.2. Metoda uzyskiwania kompleksów polielektrolitowych	56
7.3. Metody mikroemulsyfikacji	56
7.4. Metoda wytrącania	57
8. Charakterystyka fizykochemiczna NPs	57
8.1. Morfologia–badanie z użyciem techniki mikroskopii elektronowej (SEM/TEM) ...	57
8.2. Wielkość cząstek i potencjał Zeta (potencjał ζ)	58
8.3. Wydajność enkapsulacji (EE%) – wyznaczenie zawartości związanej substancji aktywnej	58
8.4. Badanie uwalniania <i>in vitro</i>	58
9. Technologia mikrokapsułkowania	59
9.1. Techniki mikrokapsułkowania	61
9.1.1. Metody emulsyjne	61
9.1.2. Suszenie rozpyłowe	63
9.1.3. Powlekanie w warstwie fluidalnej	64
9.1.4. Powlekanie w bębnie drażerskim	65
9.1.5. Proces koacerwacji	66

9.1.6. Formowanie mikrosferowych form hydrożelowych w wyniku kontrolowanego procesu tworzenia kompleksów polielektrolitowych (KPE)	67
9.1.7. Polimeryzacja międzyfazowa i polimeryzacja <i>in situ</i>	68
9.1.8. Metoda ekstruzji	69
9.1.9. Topliwa dyspersja	70
10. Techniki modelowe dot. badania przenikania przez materiał imitujący skórę	70
10.1. Metody ilościowe	72
10.1.1. Komory Franza	72
10.1.2. Testy PAMPA	75
10.1.3. Metoda strippingu	76
10.2. Metody jakościowe i półilościowe	79
10.2.1. Techniki mikroskopowe	79
11. Metoda oceny cytotoksyczności wobec linii komórkowych (prawidłowych i nowotworowych) – test MTT <i>in vitro</i>	79
II CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	81
1. Cel, zakres i hipoteza pracy badawczej	81
2. Materiały i metody	82
2.1. Materiały	82
2.2. Metody	84
2.2.1. Otrzymywanie nanocząstek chitozanowych (ChNP) oraz nanocząstek chitozanowych z ekstraktem z liści <i>Ginkgo biloba</i> (Ch(GB)NP)	84
2.2.2. Otrzymywanie mikrokapsulek alginianowych [Al(Ch(GB)NP) oraz Al(GB)]	85
2.2.3. Otrzymywanie mikrokapsulek etylocelulozowych [Et(Ch(GB)NP) i Et(GB)]	85
2.2.4. Charakterystyka nanocząstek chitozanowych oraz mikrokapsulek alginianowych i etylocelulozowych	86
2.2.4.1. Analiza wielkości Ch(GB)NP oraz współczynnika polidispersji (PDI)	86
2.2.4.2. Morfologia nanocząstek i mikrokapsulek	86
2.2.4.3. Wydajność enkapsulacji w Ch(GB)NP	87
2.2.4.4. Kinetyka uwalniania GBE z Ch(GB)NP oraz mikrokapsulek [Al(GB), Al(Ch(GB)NP), Et(GB) oraz Et(Ch(GB)NP)]	87
2.2.4.5. Analiza FTIR-ATR	88
2.2.5. Określenie efektu cytotoksycznego GBE, ChNP oraz Ch(GB)NP. wobec różnych linii komórkowych	88
2.2.5.1. Hodowle linii komórkowych	88
2.2.5.2. Test cytotoksyczności MTT (określenie żywotności komórek)	88
2.2.6. Badania mikrobiologiczne (wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego wzrost drobnoustrojów – bakterii i grzybów)	89
2.2.7. Przygotowanie funkcjonalnych tekstyliów	91
2.2.8. Badania przenikania nanocząstek przez pory w błonie dializacyjnej w medium soli fizjologicznej	91
2.2.9. Badania przenikania i uwalniania nanocząstek oraz ekstraktu z <i>Ginkgo biloba</i> z przygotowanych tekstyliów funkcjonalnych	92
3. Wyniki	93
3.1. Charakterystyka wielkości kształtu uzyskanych Ch(GB)NP	93
3.2. Wydajność procesu enkapsulacji GBE w Ch(GB)NP	95
3.3. Stopień uwalniania GBE z Ch(GB)NP	96

3.4. Charakterystyka mikrokapsulek alginianowych Al(Ch(GB)NP) oraz Al(GB)	97
3.5. Stopień uwalniania GBE z Al(GB) i Al(Ch(GB)NP)	97
3.5.1. Stopień uwalniania GBE z Al(GB)	97
3.5.2. Stopień uwalniania GBE z Al(Ch(GB)NP)	98
3.6. Charakterystyka mikrokapsulek etylocelulozowych Et(Ch(GB)NP) oraz Et(GB)	99
3.7. Stopień uwalniania GBE z Et(GB) i Et(Ch(GB)NP)	100
3.7.1. Stopień uwalniania GBE z Et(GB)	100
3.7.2. Stopień uwalniania GBE z Et(Ch(GB)NP)	101
3.8. Analiza FTIR-ATR nanocząstek chitozanowych	101
3.9. Badania oceny cytotoksyczności Ch(GB)NP	103
3.10. Badania mikrobiologiczne (wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego wzrost drobnoustrojów – bakterii i grzybów)	105
3.11. Funkcjonalne tekstylia	106
3.11.1. Morfologia powierzchni funkcjonalnych tekstyliów	107
3.11.2. Przenikanie nanocząstek przez pory w błonie dializacyjnej w medium soli fizjologicznej	107
3.11.3. Określenie przenikania i uwalniania nanocząstek oraz ekstraktu z <i>Ginkgo biloba</i> z przygotowanych tekstyliów funkcjonalnych	109
4. Wnioski i dyskusja	110
4.1. Ch(GB)NP	110
4.2. Badania cytotoksyczności i mikrobiologiczne	114
4.3. Mikrokapsułki alginianowe [Al(GB) i Al(Ch(GB)NP)]	119
4.4. Mikrokapsułki etylocelulozowe [Et(GB) i Et(Ch(GB)NP)]	121
4.5. Funkcjonalne tekstylia	123
5. Podsumowanie	127
Literatura	129
Spis Rysunków	157
Spis Tabel	160

Wykaz Skrótów

- 2-PFM** – ang. *2-Piezoresponse Force Microscopy* (mikroskopia dwufotonowa)
- Al(GB)** – mikrokapsuły alginianowe z zamkniętym ekstraktem z *Ginkgo biloba*
- Al(Ch(GB)NP)** – mikrokapsuły alginianowe z nanocząstkami chitozanowymi z zamkniętym ekstraktem z *Ginkgo biloba*
- ATCC** – ang. *American Tissue Culture Collection* (Amerykańska Kolekcja Szczepów Wzorcowych)
- ATR** – ang. *Attenuated Total Reflectance* (spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni)
- AuNPs** – nanocząstki zawierające złoto
- BBB** – ang. *Blood-Brain Barrier* (bariera krew-mózg)
- BEL7402** – ang. *Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line* (linia komórkowa ludzkiego raka wątrobowokomórkowego)
- BGC823** – ang. *Human Gastric Carcinoma Undifferentiated Cell Line* (niezróżnicowana linia komórkowa ludzkiego raka żołądka)
- BSA** – ang. *Bovine Serum Albumin* (albumina surowicy bydłowej)
- C18** – kwas oleinowy
- Ch(GB)NP** – nanocząstki chitozanowe z zamkniętym ekstraktem z *Ginkgo biloba*
- ChNP** – nanocząstki chitozanowe bez ekstraktu
- CLSM** – ang. *Confocal Laser Scanning Microscopy* (konfokalna laserowa mikroskopia skaningowa)
- CMC** – ang. *Critical Micelle Concentration* (krytyczne stężenie micelizacji)
- Colo320** – ang. *Human Colon Adenocarcinoma Cell Line* (linia komórkowa ludzkiego gruczolaka okrężnicy)
- Cz.** – czysty
- Cz.d.a.** – czysty do analiz
- DBC** – ang. *Dibutrylchitin* (dibutrylochityna)
- DD** – ang. *Degree of Deacetylation* (stopień deacetylacji)
- DLS** – ang. *Dynamic light scattering* (metoda dynamicznego rozproszenia światła)
- DNA** – ang. *Deoxyribonucleic acid* (kwas deoksyrybonukleinowy)
- DM** – dendrymery
- DMEM** – ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMF** – ang. *Dimethylformamide* (dimetyloformamid)
- DMSO** – ang. *Dimethyl sulfoxide* (dimetylosulfotlenek)

EC - etyloceluloza

ECACC – ang. *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (Europejska Kolekcja Hodowli Komórkowych)

EE – ang. *Encapsulation efficiency* (wydajność enkapsulacji)

ePTFE – ang. *expanded Polytetrafluoroethylene* (ekspandowany politetrafluoroetylen)

EGb 761 – standaryzowany ekstrakt z *Ginkgo biloba*

EMA – ang. *European Medicines Agency* (Europejska Agencja Leków)

EMEM – ang. *Eagle's Minimum Essential Medium*

Et(GB) – Mikrokapsuły etylocelulozowe z zamkniętym ekstraktem z *Ginkgo biloba*

Et(Ch(GB)NP) – Mikrokapsuły etylocelulozowe z nanocząstkami chitozanowymi z zamkniętym ekstraktem z *Ginkgo biloba*

FDA – ang. *Food and Drug Administration* (Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków)

FTIR – ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (pomiar spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera)

G⁻ – Gram-ujemne bakterie (zabarwione na fioletowo w barwieniu metodą Grama)

G⁺ – Gram-dodatnie bakterie (zabarwione na różowo w barwieniu metodą Grama)

GBE – ekstrakt z liści zielonych z *Ginkgo biloba*

HaCaT – ang. *Immortalized human keratinocytes* (linia ludzkich keratynocytów, komórki skóry)

HeLa – ang. *Human Cervical Cancer* (linia komórek adherentnych raka szyjki macicy)

HGF-1 – ang. *Human Gingival Fibroblast* (linia adherentnych fibroblastów dziąsłowych)

HLB – ang. *Hydrophilic-Lipofilic Balance* (równowaga hydrofilowo-lipofilowa)

HPLC – ang. *High-Performance Liquid Chromatography* (wysokosprawna chromatografia cieczowa)

IC₅₀ – ang. *Half-maximal inhibitory concentration 50* (stężenie leku lub inhibitora potrzebne do zahamowania procesu biologicznego lub odpowiedzi biologicznej o 50%)

IR – ang. *Infrared* (promieniowanie podczerwone)

IVRT – ang. *In Vitro Release Tests* (testy uwalniania *in vitro*)

IVPT – ang. *In Vitro Skin Permeation Tests* (testy przenikania przez skórę *in vitro*)

iPP – ang. *isotactic Polypropylene* (polipropylen izotaktyczny)

L-02 – ang. *Human Fetal Hepatocyte Cell Line* (linia komórkowa ludzkich hepatocytów płodowych)

LC₅₀ – ang. *Lethal Concentration 50* (stężenie substancji aktywnej powodujące śmierć 50% komórek w określonych warunkach)

LDH – ang. *lactate dehydrogenase* (dehydrogenaza mleczanowa)

LPS – lipopolisacharyd

MBC – ang. *Minimal Bactericidal Concentration* (minimalne stężenie bakteriobójcze)

MHB – ang. *Müller Hilton II Broth* (pożywka bulionowa Müller Hilton II)

MIC – ang. *Minimal Inhibitory Concentration* (minimalne stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów)

MFC – ang. *Minimal Fungicidal Concentration* (minimalne stężenie grzybobójcze)

MPEG-PCL – ang. *Methoxy poly(ethylene glycol)-poly(ε-caprolactone)* (Metoksypoli(glikol etylenowy)-poli(ε-kaprolakton))

MPEG-PMBC – ang. *Methoxy poly(ethylene glycol)-poly(2-methyl-2-carboxyl-propylene carbonate)* (metoksypoli(glikol etylenowy)-poli(2-metylo-2-karboksylopropylen))

MSNP – nanocząstki krzemionki

MSSA – ang. *Methicillin-Sensitive Staphylococcus aureus* (szczep *S. aureus* wrażliwy na metycylinę)

MRSA – ang. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (szczep *S. aureus* oporny na metycylinę)

MRSE – ang. *Methicillin-Resistant Staphylococcus epidermidis* (szczep *S. epidermidis* oporny na metycylinę)

MTT – bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)- 2,5-difenylo-tetrazoliowy

MWCO – ang. *Molecular weight cut-off* (wartość graniczna masy cząsteczkowej)

NADH/NAD⁺ – ang. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide* (dinukleotyd nikotynoaminoadeninowy zredukowany/utleniony)

NCs – ang. *Nanocarriers* (nanonośniki)

NEAA – ang. *Non Essential Amino Acids* (aminokwasy endogenne)

NLCs – ang. *Nanostructured Lipid Carriers* (nanostrukturalne nośniki lipidowe)

NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne

NNKT – Niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe

NPs/NP – ang. *Nanoparticles* (nanocząstki)

OD – ang. *Optical Density* (gęstość optyczna)

OECD – ang. *Organisation for Economic Cooperation and Development* (Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju)

O/W – emulsja typu olej w wodzie

O/W/O – emulsja wielofazowa (faza olejowa rozproszona w wodzie, zdyspergowana dodatkowo w oleju)

OVCAR-3 – ang. *Ovarian Adenocarcinoma cell line* (linia komórkowa gruczolakoraka jajnika)

P53 – białko zaangażowane w regulację wielu procesów komórkowych, a w szczególności aktywacji mechanizmów naprawy DNA lub indukcji apoptozy w odpowiedzi na uszkodzenia DNA

PAA – ang. *Polyacrylic acid* (kwas poliakrylowy)

PAMAM – ang. *Polyamidoamine dendrimers* (dendrymery poli(amidoaminowe))

PAMPA - ang. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay* (równoległy test przepuszczalności sztucznej błony)

PBS – ang. *Phosphate buffered saline* (sól fizjologiczna buforowana fosforanami)

PCA – ang. *Plate Count Agar* (standardowy agar do oznaczania ogólnej liczby bakterii)

PCL – ang. *Polycaprolactone* (polikaprolakton)

PCM – ang. *Phase Change Materials* (materiały o przemianie fazowej)

PDI – ang. *Polydispersity Index* (współczynnik polidispersyjności)

PDS – ang. *Polydioxanone* (polidioksanon)

PEA1 – ang. *Human Ovarian Cancer* (linia komórek adherentnych raka jajnika)

PEC/KPE – ang. *Polyelectrolyte Complex* (kompleks polielektrolitowy)

PEG – ang. *Polyethylene glycol* (glikol polietylenowy)

PET – ang. *Polyethylene terephthalate* (poli(tereftalan etylenu))

PGA – ang. *Polyglycolide* (poliglikolid)

PLA – ang. *Poly(lactic acid)* (polilaktyd)

PLGA – ang. *Poly(lactic-co-glycolic acid)* (poli(kwas mlekowy-ko-glikolowy))

PLL – ang. *Poly-L-lysine dendrimers* (dendrymery polilizyowe)

PNPs – ang. *Polymer Nanoparticles* (polimerowe nanocząstki)

PPI – ang. *Poly(propylene imine) dendrimers* (dendrymery polipropylenoiminowe)

PVA – ang. *Poly(vinyl alcohol)* (alkohol poliwinylowy)

RAW264.7 – ang. *Mice macrophage cell line* (linia mysich makrofagów)

RNA – ang. *Ribonucleic acid* (kwas rybonukleinowy)

RPM – ang. *Revolutions per minute* (obroty na minutę, obr./min)

SA – substancja aktywna

SC – łac. *stratum corneum* (warstwa rogowa naskórka)

SDA – ang. *Sabouraud Dextrose Agar* (podłoże agarowe do hodowli i oznaczania liczby do hodowli grzybów)

SEM – ang. *Scanning Electron Microscopy* (skaningowa mikroskopia elektronowa)

siRNA – ang. Small interfering RNA (krótki interferujący RNA)

SLNs – ang. *Solid Lipid Nanoparticles* (stałe nanocząstki lipidowe)

TDDS – ang. *Transdermal Drug Delivery System* (przezskórny system dostarczania leków)

TEM – ang. *Transmission Electron Microscopy* (Transmisyjna mikroskopia elektronowa)

TEWL - ang. *Transepidermal Water Loss* (transepidermalna utrata wody)

TGFβR-1 – ang. *Transforming Growth Factor Beta Receptor 1* (receptor transformującego czynnika wzrostu beta 1)

TPP – ang. *Triphosphate* (trifosforan pentasodu, czynnik sieciujący chitozan)

TTS – ang. *Transdermal Therapeutic System* (transdermalny system terapeutyczny)

UHMWPE – ang. *Ultra-High-Molecular-Weight Polyethylene* (Polietylen o ultrawysokiej masie cząsteczkowej)

UV – ang. *Ultraviolet* (promieniowanie nadfioletowe)

UV-VIS – ang. *Ultraviolet-visible spectroscopy* (spektroskopia w zakresie światła UV i światła widzialnego)

VDC – ang. *Vertical diffusion cell* (pionowa komora dyfuzyjna)

VEGF – ang. *Vascular Endothelial Growth Factor* (czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego)

VRSA – ang. *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus* (szczep *S. aureus* oporny na działanie wankomycyny)

VREF – ang. *Vancomycin-resistant Enterococcus faecalis* (szczep *E. faecalis* oporny na działanie wankomycyny)

W/O – emulsja typu woda w oleju

W/O/W – emulsja wielofazowa (faza wodna rozproszona w oleju, zdyspergowana dodatkowo w wodzie)

WHO – ang. *World Health Organization* (Światowa Organizacja Zdrowia)

WZW typu B – Wirus Zapalenia Wątroby typu B

STRESZCZENIE

Dynamiczny rozwój różnych gałęzi medycyny i farmacji oraz powstawanie nowych wizji profilaktyki oraz terapii alternatywnych różnych schorzeń daje możliwości do wykorzystania tekstylnych wyrobów medycznych z nośnikami różnych substancji aktywnych. Ich terapeutyczne działanie może zachodzić poprzez bezpośredni kontakt ze zmianami chorobowymi na skórze oraz pośrednio, gdzie substancje lecznicze przedostają się do położonej w głębszych warstwach skóry sieci naczyń włosowatych i docierają do krwioobiegu.

Celem pracy badawczej jest opracowanie i scharakteryzowanie komponentów oraz produktu końcowego – funkcjonalnych tekstyliów wykorzystujących transdermalne systemy dostarczania substancji aktywnych. Hipoteza przedkładanej rozprawy doktorskiej brzmi, że „możliwe jest wytworzenie materiałów włókienniczych zawierających mikrokapsuły z nanocząstkami z substancją aktywną jako terapeutyczne tekstylia do dostarczania substancji leczniczej drogą transdermalną”.

Zakres badawczy w ramach pracy doktorskiej obejmował następujące zadania:

1. Wybór substancji aktywnych, które odgrywają istotną rolę jako środki lecznicze w wybranych dolegliwościach (np. stopa cukrzycowa lub nowotwór), wytypowano ekstrakt z miłorzębu japońskiego (łac. *Ginkgo biloba*) – GBE).
2. Selekcja polimerów będących matrycą osadzania substancji bioaktywnych w nanocząstkach (wytypowano sól chitozanu) oraz w mikrokapsułkach (wytypowano najpierw alginian a następnie etylocelulozę).
3. Opracowanie metody otrzymywania i charakterystyka fizykochemiczna nanocząstek z zamkniętym GBE – Ch(GB)NP (użyte metody: metoda żelowania jonowego, analiza wielkości i wskaźnika polidispersyjności (PDI) za pomocą aparatury Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK), analiza FTIR-ATR, badania mikrobiologiczne wobec szczepów bakteryjnych i grzybowych).
4. Określenie uwalniania ekstraktu z nanocząstek w różnych mediach badawczych (za pomocą techniki spektrofotometrycznej UV-VIS).
5. Wytworzenie i charakterystyka mikrokapsuł zawierających GBE lub nanocząstki (użyte metody: metoda zewnętrznego żelowania jonowego, metoda odparowania rozpuszczalnika z emulsji, mikroskopia SEM).
6. Określenie uwalniania ekstraktu z mikrokapsuł z GBE lub nanocząstkami w różnych mediach badawczych (za pomocą techniki spektrofotometrycznej UV-VIS).

7. Opracowanie sposobów nanoszenia mikrokapsuł z substancją aktywną na nośnik włókienniczy (użyte metody: technika immobilizacji mikrokapsuł przy użyciu kleju chitozanowego).
8. Badania biologiczne na liniach komórkowych prawidłowych i nowotworowych (test cytotoksyczności MTT).
9. Określenie przenikania nanocząstek z ekstraktem zawartych w mikrokapsułach przymocowanych do nośnika włókienniczego przez membranę o wielkości porów zbliżonej do porów w skórze (wg własnej procedury).

Otrzymano nanocząstki chitozanowe zawierające GBE, które scharakteryzowano pod kątem morfologii oraz właściwości fizykochemicznych. Zostało po raz pierwszy udowodnione, że Ch(GB)NP wykazują aktywność cytotoksyczną wobec użytych komórek nowotworowych (PEA1 i HeLa) i jednocześnie nie wykazują aktywności wobec komórek prawidłowych (HGF-1) a także wykazują aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą wobec wytypowanych szczepów bakterii i grzybów. Otrzymano mikrokapsułki wielordzeniowe z otoczką alginianową lub etylocelulozową z zamkniętym GBE lub Ch(GB)NP, które również scharakteryzowano pod kątem morfologii i rozmiaru. Przeprowadzono badania uwalniania ekstraktu *Ginkgo biloba* z nanocząstek i różnych typów mikrokapsulek do dwóch mediów badawczych i wykazano, że więcej ekstraktu uwalnia się do soli fizjologicznej niż do wody w pierwszych 24h prowadzonego badania i następnie uwalnianie ekstraktu albo się stabilizuje albo w powolny sposób rośnie.

Otrzymano dwa rodzaje funkcjonalnej dzianiny bawełnianej. Pierwszy typ obejmuje dzianinę, do której zostały immobilizowane za pomocą kleju chitozanowego mikrokapsuły etylocelulozowe z zamkniętym ekstraktem z *Ginkgo biloba*. Taki typ dzianiny bawełnianej jest dobrze opisany w literaturze w aspekcie otrzymywania i potencjalnych zastosowań. Drugi rodzaj stanowi dzianina bawełniana z immobilizowanymi za pomocą kleju chitozanowego mikrokapsułami etylocelulozowymi z nanocząstkami chitozanowymi z ekstraktem (GBE zabezpieczony jest za pośrednictwem 2 powłok polimerowych: chitozanowej i etylocelulozowej). Ten rodzaj dzianiny funkcjonalnej stanowi nowość naukową pod kątem tekstyliów funkcjonalnych i ich aplikacji w różnych dziedzinach nauki. Badania przenikania (przeprowadzone za pomocą aparatu Zeta Sizer oraz techniką spektrofotometryczną UV-VIS) nanocząstek z ekstraktem GBE oraz samego ekstraktu *Ginkgo biloba* z mikrokapsuł immobilizowanych do dzianin bawełnianych potwierdziły penetrację nanocząstek i przenikanie ekstraktu przez błonę dializacyjną o wielkości porów zbliżonej do wielkości

porów w skórze w środowisku soli fizjologicznej. Potwierdza to tezę badawczą przedłożonej pracy badawczej.

ABSTRACT

The dynamic development of various branches of medicine and pharmacy and the emergence of new visions of prevention and alternative therapies for various diseases provide opportunities to use textile medical products with carriers of various active substances. Their therapeutic effect may occur through direct contact with skin lesions and indirectly, where medicinal substances penetrate the capillary network located in the deeper layers of the skin and reach the bloodstream.

The aim of the research is to develop and characterize the components and the final product – functional textiles using transdermal systems for delivering active substances. The hypothesis of the submitted doctoral dissertation is that "it is possible to produce textile materials containing microcapsules with nanoparticles with an active substance as therapeutic textiles for delivering the drug substance transdermally."

The research scope of the doctoral thesis included the following tasks:

1. Selection of active substances that play an important role as therapeutic agents in selected ailments (e.g. diabetic foot or cancer), *Ginkgo biloba* extract (GBE) was selected.
2. Selection of polymers that are the matrix for the deposition of bioactive substances in nanoparticles (chitosan salt was selected) and in microcapsules (first alginate and then ethylcellulose).
3. Development of a method for obtaining and physicochemical characterization of nanoparticles loaded with GBE – Ch(GB)NP (methods used: ion gelation method, size and polydispersity index (PDI) analysis using the Zetasizer Nano ZS device (Malvern, UK), FTIR-ATR analysis, microbiological tests for bacterial and fungal strains).
4. Determination of the release of extract from nanoparticles in various research media (using UV-VIS spectrophotometric technique).
5. Preparation and characterization of microcapsules containing GBE or nanoparticles (methods used: external ionic gelation method, solvent evaporation method from emulsion, SEM microscopy).
6. Determination of the release of extract from microcapsules with GBE or nanoparticles in various research media (using UV-VIS spectrophotometric technique).
7. Development of methods for applying microcapsules with the active substance to a textile carriers (methods used: microcapsule immobilization technique using chitosan glue).
8. Biological tests on normal and cancer cell lines (MTT cytotoxicity test).

9. Determination of the penetration of nanoparticles with extract contained in microcapsules attached to a textile carrier through a membrane with a pore size similar to pores in the skin (according to own procedure).

Chitosan nanoparticles containing GBE were obtained and characterized in terms of morphology and physicochemical properties. It has been proven for the first time that Ch(GB)NP have cytotoxic activity against the cancer cells used (PEA1 and HeLa) and at the same time have no activity against normal cells (HGF-1) and also show antibacterial and antifungal activity against selected strains of bacteria and fungi. .

Multicore microcapsules with an alginate or ethylcellulose shell with encapsulated GBE or Ch(GB)NP were obtained, which were also characterized in terms of morphology and size. Studies on the release of *Ginkgo biloba* extract from nanoparticles and various types of microcapsules into two research media were carried out and it was shown that more of the extract is released into physiological saline than into water in the first 24 hours of the study and then the release of the extract either stabilizes or slowly increases.

Two types of functional cotton knitted fabric were obtained. The first type includes knitted fabric to which ethylcellulose microcapsules with closed *Ginkgo biloba* extract have been immobilized using chitosan glue. This type of cotton knit fabric is well described in the literature in terms of preparation and potential applications. The second type is cotton knitted fabric with ethylcellulose microcapsules containing chitosan nanoparticles with extract immobilized using chitosan glue (GBE is protected by two polymer coatings: chitosan and ethylcellulose). This type of functional knit fabric is a scientific novelty in terms of functional textiles and their applications in various fields of science. Penetration tests (conducted using the Zeta Sizer device and UV-VIS spectrophotometric technique) of nanoparticles with GBE extract and *Ginkgo biloba* extract from microcapsules immobilized into cotton knitted fabrics confirmed the penetration of nanoparticles and the permeation of the extract through a dialysis membrane with a pore size similar to the pore size in the skin in physiological saline environment. This confirms the research thesis of the submitted research work.

I CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Wprowadzenie

Rynek tekstyliów medycznych bardzo prężnie się rozwija a jego globalna wielkość w 2022 roku została oszacowana na 32,20 mld USD. Prognozy rynkowe wykazują, że w 2023 roku, wartość tego rynku osiągnie poziom 35,87 mld USD, a do roku 2030 będzie rosła w tempie skumulowanej rocznej stopy wzrostu równej 4,3% i osiągnie wartość 48,04 mld USD [1]. Rosnąca świadomość społeczeństwa w związku z udoskonalonymi metodami leczenia, usługami opieki medycznej oraz odpowiednia jakość i komfort życia osób schorowanych napędza popyt na wyroby tekstylne klasy medycznej, w tym protez, wyrobów wszczepialnych takich jak sztuczne ścięgna, więzadła i inne, oraz biomateriałów. Ponadto starzejące się społeczeństwo również przyczyni się do globalnej ekspansji rynku wyrobów tekstylnych z powodu zwiększonej ilości zabiegów operacyjnych, wzmożonej opieki (w tym opieki paliatywnej) oraz stosowania różnego typu opatrunków. Pożądanym rozwiązaniem byłoby stosowanie systemów terapeutycznych (w tym transdermalnych systemów terapeutycznych), które uwalniałyby lek/substancję aktywną/ekstrakt roślinny z określoną szybkością w zadanym czasie. Jedną z form transdermalnych systemów terapeutycznych są tekstylia biomedyczne, w których są immobilizowane aktywne substancje, np. za pomocą przyłączonych mikrokapsuł.

W trakcie leczenia pacjentów są wykorzystywane różne drogi podawania leków, które można podzielić na dwie główne grupy:

a) Przez przewód pokarmowy (Enteralne):

- doustnie *per os*,
- doodbytniczo *per rectum*,
- podjęzykowo *sublinguale*,

b) Pozajelitowe (Parenteralne):

- wstrzyknięcie *iniectio*:
 - ✓ domięśniowe *intramuscularis*,
 - ✓ dożylnie *intravenosa*,
 - ✓ dotętnicze *intraarterialis*,
 - ✓ dosercowe *intracardialis*,
 - ✓ dootrzewnowe *intraperitonealis*,
 - ✓ dopoliczkowe *buccalis*,

✓ podskórne *subcutanea*,

- przez drogi oddechowe *per inhalationem*.

Ponadto jako jedną z metod leczenia stosuje się przezskórne podawanie substancji leczniczych za pomocą transdermalnych systemów terapeutycznych. Tą drogę podawania leków zaleca się pacjentom z dysfagią (utrudnionym połykaniem) oraz nudnościami i wymiotami. Droga przezskórna jest również dedykowana jako metoda alternatywna i wspomagająca tradycyjne podawanie leków i chemioterapeutyków u pacjentów chorujących na choroby cywilizacyjne zwłaszcza pacjentów onkologicznych. Przeprowadzona ankieta wśród polskiego społeczeństwa dała zatrważające rezultaty. Badania wykazały, że 56% Polaków w czasie ostatnich 5 lat chorowała lub wciąż jest chora na co najmniej jedną z chorób cywilizacyjnych XXI wieku takich jak: nowotwory, cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, miażdżycy lub depresja [2]. Zgodnie z danymi oszacowanymi przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) w 2022 roku prawie 61% wszystkich zgonów (ok. 35 mln) i 49% globalnego obciążenia chorobami jest przypisana ww. chorobom przewlekłym. Szacuje się, że do 2030 r. udział wszystkich zgonów na świecie, których powodem będą choroby przewlekłe wzrośnie do poziomu 70%, a globalne obciążenie chorobami przewlekłymi będzie stanowiło 56% całej populacji. W związku z powyższymi statystykami ważne jest odpowiednio wczesne wdrożenie działań profilaktycznych pozwalających na zmniejszenie ryzyka zapadania na choroby cywilizacyjne [3].

2. Biotekstylia i tekstyilia medyczne

Od kilku dekad w przemyśle włókienniczym rozwija się trend dotyczący tekstyliów funkcjonalnych o podwyższonym komforcie użytkowania. Jedną z istotnych grup tego typu wyrobów, które stanowią innowację zarówno produktową jak i procesową są biotekstylia. Rozwój biotekstyliów wspomagany jest badaniami interdyscyplinarnymi łączącymi wiedzę z takich dziedzin nauki jak: inżynieria materiałowa, inżynieria biomedyczna, nauki biologiczne, nanotechnologia, biomimetyka, bioinformatyka oraz nauki medyczne (w zakresie anatomii i fizjologii człowieka).

Tekstylia medyczne (medtekstylia) są definiowane jako struktury włókniste wytwarzane z materiałów naturalnych lub syntetycznych, używane jako materiały medyczne służące do zapobiegania, leczenia lub diagnozowania różnego rodzaju urazów i chorób. Celem ich stosowania jest poprawa zdrowia i samopoczucia pacjenta [4]. Wykorzystywane są też jako biotrwałe lub biodegradowalne komponenty wyrobów medycznych stosowanych do implantacji, jako część systemów do modyfikowania środowiska biologicznego w warunkach *ex vivo* oraz do hodowli i testowania linii komórkowych w warunkach *in vitro* [5].

Biomedyczne tekstylia, które mogą mieć postać wyrobów liniowych lub płaskich, w zależności od kryterium zastosowania dzieli się na kilka ważnych grup:

- ✓ tekstylia ochronne i chroniące zdrowie, np. fartuchy chirurgiczne, uniformy pracowników, itp.
- ✓ materiały do użytku zewnętrznego, np. opatrunki przyspieszające gojenie się ran, bandaże, odzież uciskająca, skarpety protetyczne, opaski uciskowe itp.
- ✓ materiały implantacyjne: nici chirurgiczne, protezy naczyń krwionośnych, protezy kości, sztuczne więzadła i ścięgna, siatki chirurgiczne (protezy powięzi mięśni), itp.
- ✓ akcesoria higieniczne: pieluchy, podpaski, tampony, mokre chusteczki, itp.
- ✓ sztuczne narządy pozaustrojowe: sztuczna wątroba, sztuczna nerka, sztuczne płuca, itp. [4-7].

Proces wytwarzania biotekstyliów obejmuje dwie kluczowe aktywności [8-10]. W pierwszej kolejności są wytwarzane przędze zbudowane z włókien z różnych polimerów (zarówno naturalnych jak i syntetycznych) przy użyciu różnych metod przędzenia. Najczęściej stosowanymi metodami przędzenia znanymi w inżynierii włókienniczej są:

przędzenie ze stopu, przędzenie na sucho i przędzenie na mokro [11]. Otrzymane przędze są poddawane przetwarzaniu na różne formy tekstylne o określonych kształtach, porowatości i parametrach mechanicznych przy wykorzystaniu technik tkania, dziania i oplatania tekstyliów oraz innych metod formowania tekstyliów 3D. Przędze włókniste są główną jednostką używaną do konstruowania biotekstyliów, a odpowiednio dobrane właściwości przędzy wpływają na parametry końcowe wytworzonych biotekstyliów. W głównej mierze do produkcji biotekstyliów są stosowane komercyjnie przędze z mikrowłókien (zazwyczaj o średnicach większych niż 10 μm). W przypadku wytwarzania materiałów wszczepialnych średnice włókien są w zakresie wymiarów włókienek białkowych tj. od kilku do kilkuset nanometrów [12,13]. W zastosowaniach bioelektronicznych w tekstyliach duże średnice włókien konwencjonalnych mikrowłókien negatywnie wpływają na miniaturyzację urządzenia, jego wagę i wydajność [14]. Dlatego ważnym aspektem jest zmniejszenie średnicy włókien przędzy do zastosowań tekstylnych w celu poprawienia struktury i właściwości mikrowłóknistych biotekstyliów [15-17].

Innym ważnym elementem wytwarzania tekstyliów biomedycznych, zwłaszcza tekstyliów stosowanych do implantacji, jest wybór biomateriałów. Przeprowadzone wcześniej badania wykazały, że określone materiały wpływają w znaczący sposób na właściwości biologiczne biotekstyliów [18]. Dostępne komercyjnie wyroby tekstylne do aplikacji jako materiały implantacyjne są wytwarzane w głównej mierze z niedegradowalnych i bioobojętnych polimerów tj. celulozy, poliamidu, polipropylenu, poliestru, poli(eteroeteroketonu), poli(tetrafluoroetyleny) itp. [19]. Wszczepialne produkty tekstylne znane pod nazwą handlową: ULTRAPRO, AQUACEL, INTERGARD i TIGR Matrix, stosowane odpowiednio w leczeniu przepuklin, ran, urazów i chorób naczyniowych oraz w zapobieganiu wypadaniu narządów miednicy mniejszej, należą do grupy materiałów niewchłaniających, albo częściowo wchłaniających [11,20]. Polimery o zwiększonej biokompatybilności i kontrolowanej biodegradowalności są bez wątpienia bardziej odpowiednie do wytwarzania implantów biotekstylnych, od których oczekuje się stopniowego wchłaniania, któremu towarzyszy wytwarzanie struktur fizjologicznie prawidłowych a także gojenie chorych lub uszkodzonych tkanek i narządów [21,22].

2.1. Biokompatybilność i biostabilność biotekstyliów

Działanie biotekstyliów zależy w dużej mierze od interakcji ze środowiskiem komórek oraz płynów ustrojowych mierzonych pod kątem „biokompatybilności” oraz „biostabilności” [23]. Termin „biokompatybilność” dotyczy zdolności biomateriałów lub biotekstyliów do wywołania niedużej i akceptowalnej odpowiedzi komórkowej/biologicznej przez osobę stosującą ww. biomateriał. Ważne są wszystkie działania prowadzące do jak największego zminimalizowania reakcji zapalnej oraz immunologicznej wynikającej z obecności ciała obcego w organizmie [23,24]. Efekt terapeutyczny biotekstyliów jest wyższy w przypadku zastosowania biomateriału obojętnego, który organizm bardziej toleruje [23]. W warunkach rzeczywistych oznacza to wykonywanie szeregu modyfikacji właściwości warstwy wierzchniej opisywanych materiałów poprzez np. nałożenie dodatkowych powłok z biokompatybilnych polimerów tj. kolagenu, kwasu hialuronowego, chitozanu, żelatyny, heparyny, albuminy lub węgla pirolitycznego; aby zmniejszyć odpowiedź organizmu i zwiększyć biokompatybilność całego wyrobu [23].

Z kolei „biostabilność” to termin, który dotyczy zdolności biomateriału/biotekstyliów do zachowania swoich pierwotnych wymiarów oraz właściwości mechanicznych i chemicznych podczas długotrwałego użytkowania np. w wyniku implantacji, lub narażenia na działanie niekorzystnego środowiska biologicznego. Jest to dość oczywiste wymaganie inżynierijskie dla biomateriałów do użytku wewnętrznego i długoterminowego, takich między innymi jak: poliestrowe protezy naczyniowe i aorty brzusznej, czy też protezy zastawek serca [5,23]. Dlatego konieczne są wysiłki badawcze w celu znalezienia nowych, biokompatybilnych i stabilnych rozwiązań biomateriałów do szerokiego spektrum zastosowań.

2.2. Polimery naturalne i syntetyczne do produkcji biotekstyliów

Podstawowymi jednostkami budulcowymi biotekstyliów są pojedyncze włókna wytwarzane w postaci ciągłej przędzy lub włókien odcinkowych. Charakter biochemiczny tych włókien w znaczny sposób odpowiada za ich biokompatybilność a także biostabilność i profil biodegradacji. Włókna naturalne są otrzymywane jako efekt uprawy i hodowli, czyli w sposób naturalny. Bawełna, wełna, juta, len czy jedwab to tylko nieliczne przykłady włókien pozyskiwanych ze źródeł naturalnych [5]. Naturalne polimery mają budowę białkową, tj. kolagen, elastyna i jedwab, oraz polisacharydową, tj. celuloza, chitozan, chityna, kwas hialuronowy i alginian. Te biopolimery izoluje się

zarówno z tkanek roślinnych, zwierzęcych i mikroorganizmów, charakteryzują się one złożonością struktury z obecnymi grupami funkcyjnymi pozwalającymi na modyfikacje po procesie przędzenia [25]. Ze względu na swoje liczne zalety polimery naturalne oraz biotekstyliia wytworzone z ich użyciem cieszą się ogromnym zainteresowaniem w aplikacjach w branży medycznej i farmaceutycznej. Należą do nich m.in. biodegradowalność, wysoka biokompatybilność, niska toksyczność (zarówno wyjściowych produktów jak również produktów rozkładu), łatwa dostępność chemiczna i rynkowa a także możliwość modyfikacji chemicznych [26].

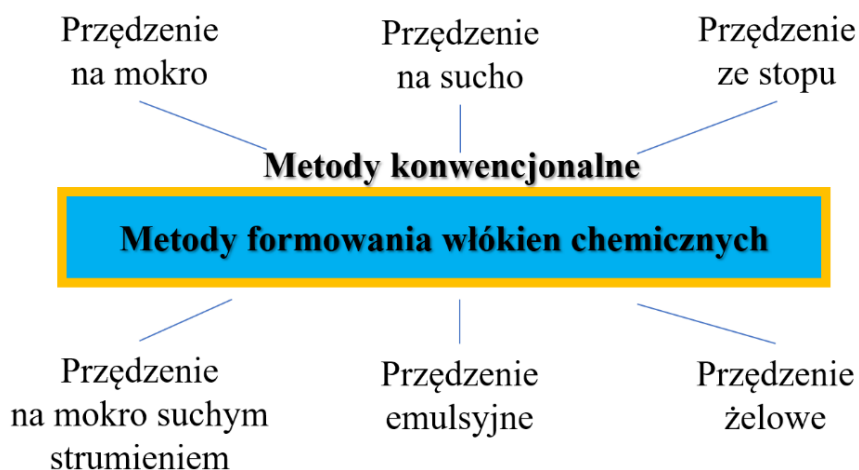
Polimery naturalne są również poddawane odpowiedniej obróbce chemicznej a następnie przetwarzane przy zastosowaniu technik właściwych do uzyskiwania włókien sztucznych. Drewno jako surowiec naturalny i źródło celulozy poddaje chemicznej modyfikacji, w wyniku której można uzyskać odpowiedni roztwór i następnie wytlaczać włókna. Przykładami włókien uzyskiwanych w ten sposób są m.in. włókna wiskozowe, rayon, cupro, tencel, lyocell, acetat i bemberg [27]. Znaczna część biopolimerów zawiera grupy funkcyjne, dzięki którym biopolimery zyskują bioaktywność taką jak np. wiązanie receptorów i markerów komórkowych, wiązanie i wzbogacenie czynników wzrostu a także aktywność trombogenna związana z aktywacją czynników dopełniacza [5,27]. Włókna polisacharydowe, takie jak np. włókna celulozowe, były i są stosowane jako składowe opatrunków na rany i środki o działaniu hemostatycznym ze względu na ich trombogenność. Alginiany, chitozan, dekstran uzyskiwany z fermentacji bakteryjnej były używane do wytwarzania nici chirurgicznych oraz siatek przepuklinowych. Z kolei białka, takie jak fibrynogen, kolagen, elastyna czy jedwab, są używane do wytworzenia struktur włóknistych stosowanych w regeneracji tkanek, zwłaszcza do protez nerwów obwodowych oraz naczyń krwionośnych a także nici chirurgicznych [5,27].

Z kolei polimery syntetyczne muszą być najpierw wytworzone poprzez polimeryzację monomerów w makrocząsteczki, a następnie wytlaczane we włókna. Łańcuchy polimerowe są budowane w wyniku dwóch reakcji: polikondensacji lub addycji [27]. Poliamid i poliester to przykłady polimerów powstających w wyniku polikondensacji, natomiast polipropylen, polietylen, politetrafluoroetylen i akryl to z kolei przykłady polimerów otrzymywanych w wyniku procesu addycji [28].

Podstawowym wymaganiem przy wyborze polimeru jest jego zdolność do tworzenia włókien (włóknotwórczość), a to z kolei jest powiązane z szeregiem kryteriów strukturalnych, które dany polimer musi spełnić. Należą do nich:

- masa cząsteczkowa w zakresie około 20–250 kDa (roztwór lub stop polimerów będzie wykazywał wystarczającą lepkość);
- liniowa i uporządkowana struktura bez licznych odgałęzień bocznych lub wiązań poprzecznych pozwalających na łatwiejsze i ściślejsze upakowanie łańcuchów lub tworzenie fazy krystalicznej po zestaleniu ze stopu lub po wytrąceniu z roztworu;
- interakcje międzyłańcuchowe, stabilizujące upakowane segmenty łańcuchowe i domeny krystaliczne, umożliwiające wyrównanie sąsiadujących łańcuchów polimerowych i ich przesuwanie się wzdłuż osi włókien [28].

Polimery spełniające powyższe kryteria są następnie wytłaczane we włókna jedną z dostępnych metod przędzenia. W pierwszej kolejności rozpuszcza się je w odpowiednim rozpuszczalniku albo topi, co powoduje rozplątywanie się łańcuchów i gwarantuje swobodny przepływ. Powstały roztwór lub stop, jest następnie wytłaczany w drobne strumienie przez przetłaczanie polimeru przez otwory o wymaganej średnicy w dyszy przędzalniczej. Strumienie następnie zestalają się, dając włókno. Poniżej na Rys. 1 przedstawiono konwencjonalne metody wytłaczania włókien [27].



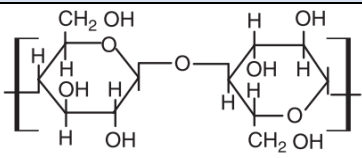
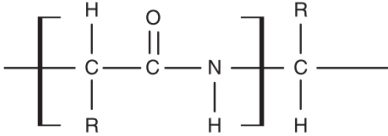
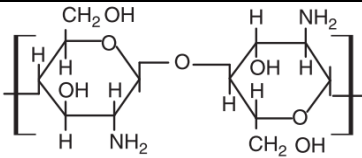
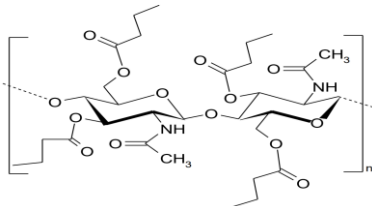
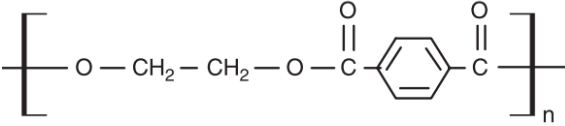
Rys. 1 Metody formowania włókien chemicznych [27]

2.3. Materiały włókniste do zastosowań medycznych

Otrzymane włókna, przędze lub nitki zostają w kolejnym kroku przetworzone w określoną strukturę tekstylną o pożądanym kształcie i wymaganych właściwościach mechanicznych dla potencjalnego wyrobu medycznego. Są znane cztery formy alternatywnych struktur tekstylnych, które mają zastosowanie jako tekstylia medyczne. Wśród nich można wymienić: tkaniny, dzianiny, plecionki oraz włókniny. Każda

z wymienionych struktur ma zarówno zalety jak i wady. Tkaniny są zazwyczaj mocniejsze i wymiarowo bardziej stabilne w stosunku do dzianin, są sztywniejsze w dotyku, mniej elastyczne i trudniejsze w obróbce mechanicznej. Dzianiny wykazują natomiast większą elastyczność i przepuszczalność pary wodnej w odniesieniu do tkanin, ale za to mogą charakteryzować się mniejszą stabilnością wymiarów w stosunku do tkanin, co jest istotne po implantacji wyrobu medycznego. Plecionki z kolei mają wysoką wytrzymałość na rozciąganie w kierunku wzdłużnym, ale mogą wykazywać niestabilność pod wpływem obciążeń skrętnych. Biorąc pod uwagę wymienione aspekty podczas projektowania wyrobu biotekstylnego należy starannie określić rodzaj struktury tekstylnej, uwzględniając zastosowanie medyczne oraz dokładne miejsce aplikacji [29]. W poniższej tabeli (Tabela 1) zaprezentowano zarówno naturalne jak i syntetyczne materiały stanowiące bazę biotekstyliów wraz z ich podstawowymi merami budowy chemicznej [27,29].

Tabela 1 Naturalne i syntetyczne bazy włókniste do wytworzenia biotekstyliów [27,29]

Nazwa polimeru stanowiącego bazę włókna	Rodzaj włókien	Podstawowa podjednostka budowy
Celuloza	Bawełna, wiskoza, lyocell	
Białka	keratyna, jedwab	
Chitozan	Włókna chitozanowe	
Chityna i pochodne chityny	Włókna dibutyrylochityny	
Poliester	(Polietylenoteraftalan - PET)	

Poliamid 6	Nylon 6, stilon, kapron, perlon, polan	$-\text{NH} \left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \end{array} (\text{CH}_2)_5 - \text{NH} \right]_n \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \end{array} -$
Poliamid 66	Nylon 66	$\left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \end{array} (\text{CH}_2)_4 \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \end{array} - \text{NH} (\text{CH}_2)_6 - \text{NH} \right]_n$
Polietylen	UHMWHDPE	$\left[\begin{array}{cc} \text{H} & \text{H} \\ & \\ -\text{C} & - & \text{C}- \\ & \\ \text{H} & \text{H} \end{array} \right]_n$
Polipropylen	Włókna polipropylenowe (iPP)	$\left[\begin{array}{cc} \text{CH}_3 & \text{CH}_3 \\ & \\ -\text{C} & - & \text{C}- \\ & \\ \text{H} & \text{H} \end{array} \right]_n$
Aramid	Kevlar, Nomex	$\left[\text{HN} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{C}(=\text{O}) \right]_n$
Politetrafluoroetylen (ePTFE)	Teflon	$\left[\begin{array}{cc} \text{F} & \text{F} \\ & \\ -\text{C} & - & \text{C}- \\ & \\ \text{F} & \text{F} \end{array} \right]_n$
Poliglikolid	Włókna poliglikolidowe (PGA)	$\text{H} \left[\text{O} - \text{CH}_2 - \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \end{array} \right]_n \text{OH}$
Polilaktyd	Włókna polilaktydowe (PLA)	$\text{H} \left[\text{O} - \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH} \end{array} - \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \end{array} \right]_n \text{OH}$
Polikaprolakton	Włókna polikaprolaktonowe (PCL)	$\left[\text{O} - (\text{CH}_2)_5 - \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \end{array} \right]_n$
Polidoksanon	Włókna PDS	$\left[\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{CH}_2 - \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \end{array} - \text{O} \right]_n$
Poliglikonian	Maxon	$\left[\text{CH}_2 - \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \end{array} - \text{O} \right]_m \left[\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O} - \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \end{array} - \text{O} \right]_n$

2.3.1. Bawełna

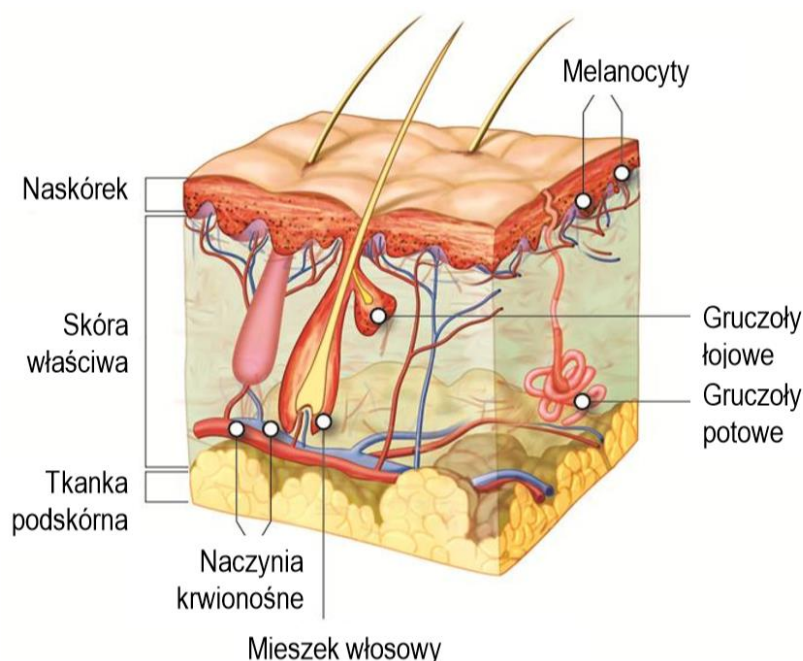
Jednym z najwcześniej historycznie używanym materiałem do wytworzenia wyrobów do zastosowań leczniczych było i nadal jest naturalne włókno celulozowe, czyli bawełna. Bawełnę (rzęd ślázowce, łac. *Malvales*, rodzina ślázowate, łac. *Malvaceae*, rodzaj *Gossypium L.*) dzieli się na dwa typy: bawełnę uprawną i dziko rosnącą [30]. Znanych jest 50 gatunków, spośród których tylko cztery są uprawiane, a pozostałe 46 to gatunki dziko rosnące w klimacie tropikalnym i subtropikalnym [30,31]. Do czterech powszechnie uprawianych gatunków bawełny należą *Gossypium hirsutum*, *G. herbaceum*, *G. barbadense* i *G. arboreum*. Ww. gatunki są zróżnicowane pod względem jakości włókna określonej długością, dojrzałością, wytrzymałością oraz kolorem i stopniem zanieczyszczenia [32]. Opisane różnice w jakości, wydajności oraz adaptacji do określonych warunków klimatu przyczyniły się do preferowania niektórych gatunków bawełny nad innymi [31]. Wszystkie cztery uprawne gatunki *Gossypium L.* są również wykorzystywane do innych celów, np. do produkcji żywności czy zastosowań leczniczych [33,34].

Bawełnę stosuje się w niciach do szwów pooperacyjnych, w wyrobach medycznych takich jak: wkładki chłonne, opatrunki oraz bandaże. Pod względem chemicznym każda podstawowa, powtarzająca się jednostka zawiera trzy grupy –OH, które mogą się łączyć z sąsiadującymi łańcuchami polimerowymi za pośrednictwem mostków wodorowych. Grupy hydroksylowe (zwłaszcza gdy nie są związane lub występują w regionach nieuporządkowanych) wiążą cząsteczki wody. Wiązania wodorowe między powtarzającymi się merami zapewniają elastyczność włókien poprzez możliwość zginania i skręcania się łańcuchów. Łańcuchy charakteryzują się dość znaczną długością, a włókno zawiera w swoim składzie ok. 60% struktury krystalicznej. Po pozbyciu się zanieczyszczeń w wyniku procesu chemicznego włókno zyskuje właściwości silnie hydrofilowe, a powierzchnia przy kontakcie z wodą natychmiast ulega zwilżeniu. Włókna bawełniane są w stanie wchłonać wodę z powietrza na poziomie 8% w odniesieniu do suchej masy tych włókien. Unikatową cechą włókien bawełnianych związaną z jej charakterystyczną budową, jest to, że staje się ona w stanie mokrym mocniejsza pod względem parametrów mechanicznych (nawet do 20%). To powoduje, że staje się ona bardziej atrakcyjna do aplikacji, w których pożądanymi parametrami są m.in. wysoka chłonność a także integralność mechaniczna, jak na przykład ręczniki i tekstylia szpitalne, które muszą być często prane. Dzięki dużej ilości grup funkcyjnych w łańcuchach

struktura bawełny może być modyfikowana chemicznie w celu poprawy jej właściwości chemicznych, fizycznych i biologicznych [27].

3. Budowa i funkcje skóry

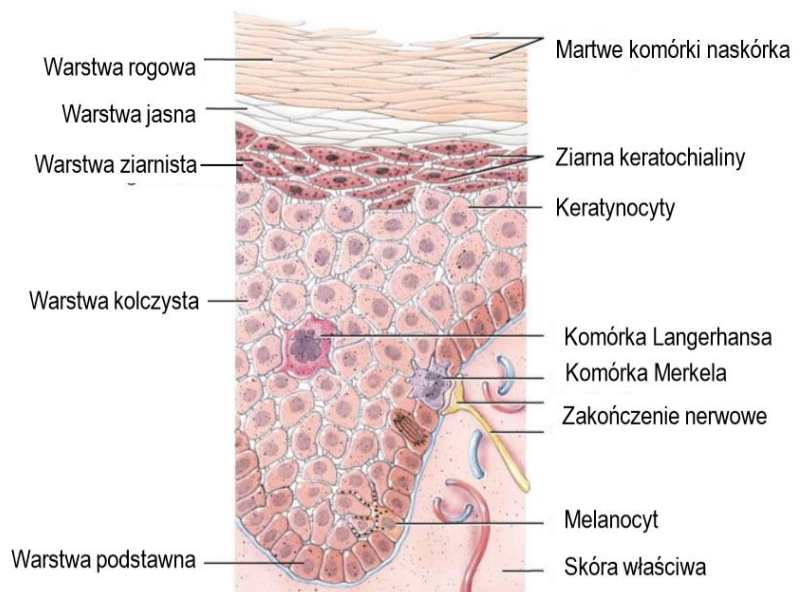
Największym, wielowarstwowym organem ludzkiego ciała jest skóra, która ma powierzchnię od 1,5 do 2m² i stanowi blisko 1/6 masy ciała. Skóra pełni kilka istotnych funkcji w organizmie m.in. stanowi barierę między ustrojem a środowiskiem zewnętrznym, chroni przed działaniem szkodliwych czynników biologicznych, chemicznych i mechanicznych, utrzymuje homeostazę płynów w organizmie oraz pełni funkcje czynne: termoregulacyjną, wydzielniczą, wydalniczą, czuciową, regulacyjną metaboliczną i obronną [35-38].



Rys. 2 Schemat budowy skóry człowieka (zaadaptowano z [38])

Skóra ludzka składa się z trzech warstw: naskórka (łac. *epidermis*), skóry właściwej (łac. *cutis vera*) oraz tkanki podskórnej (łac. *subcutis*) – schemat budowy skóry przedstawiono na Rys. 2.

Naskórek (łac. *epidermis*) stanowi zewnętrzną warstwę skóry i jest zbudowany z pięciu warstw zróżnicowanych pod względem budowy oraz funkcji komórek (Rys. 3). Naskórek składa się z: warstwy podstawnej, kolczystej, ziarnistej, jasnej oraz rogowej [38,39].



Rys. 3 Schemat budowy naskórka ludzkiej skóry (zaadaptowano z [38])

Warstwa podstawna naskórka (łac. *stratum basale*) stanowi najgłębiej położoną warstwę naskórka składającą się z komórek, w których są obecne charakterystyczne wydłużone, zasadochłonne jądra komórkowe. *Stratum basale* nazywana jest inaczej warstwą rozrodczą, ponieważ zachodzą tu intensywne, mitotyczne podziały komórkowe. Komórki macierzyste naskórka ulegają podziałom (mitozie) z zachowaniem pewnej asymetrii, ponieważ jedna z powstałych komórek potomnych kieruje się ku zewnętrznej powierzchni naskórka i w związku z tym przechodzi przez kolejne jego warstwy, natomiast druga z komórek pozostaje w warstwie rozrodczej. Okres przejścia komórki – keratynocytu z warstwy najniżej położonej do warstwy zrogowaciałej wynosi około 28 dni [40]. Komórki tej warstwy łączą się z błoną podstawną za pośrednictwem struktur zwanych hemidesmosomami. Desmosomy w postaci uwypukleń błony komórkowej z kolei stanowią połączenia między komórkami warstwy rozrodczej a także łączą je z komórkami z wyższej warstwy kolczastej. W *s. basale* znajdują się receptory dotyku (komórki Merkela), komórki Langerhansa odpowiedzialne za reakcje odpornościowe w skórze oraz melanocyty, które produkują i magazynują melanicę – barwnik skóry [38,41,42]. Warstwa kolczysta (łac. *stratum spinosum*) jest najgrubszą warstwą naskórka i sąsiaduje od dołu z warstwą podstawną a od góry z warstwą ziarnistą. Komórki *s. spinosum* oraz *s. basale* stanowią warstwę Malphigiego, czyli tzw. żywy naskórek, gdzie po przekroczeniu tej warstwy kierując się ku powierzchni naskórka rozpoczyna się rogowacenie komórek naskórka (proces keratynizacji). Komórki warstwy kolczastej w wyniku stopniowej migracji do wyższej warstwy – ziarnistej, ulegają procesowi spłaszczenia (Rys. 3) [41]. Kolejną warstwą „idącą do góry” jest warstwa ziarnista (łac.

stratum granulosum). Jest ona zbudowana z kilku poziomów komórek o wrzecionowatym kształcie posiadających spłaszczone jądra komórkowe (Rys. 3). Obecność w jądrach ziaren keratohialiny, która uczestniczy w procesie biosyntezy białka – keratyny, dała podstawę do nadania nazwy tej warstwie – warstwa ziarnista [43]. W *s. granulosum* są syntetyzowane glikolipidy, przede wszystkim acyloglukozylceramidy, które są wydzielane na zewnątrz komórek tej warstwy i migrują następnie w kierunku warstwy rogowej, gdzie się gromadzą (akumulacja następuje na granicy warstwy ziarnistej i rogowej) i pełnią tam funkcję ochronną zapobiegając przed nadmierną, transepidermalną utratą wody określaną w skrócie jako TEWL (ang. *transepidermal water loss*). Pomiędzy *s. granulosum* a *s. corneum* jest położona warstwa jasna (łac. *stratum lucidum*), która występuje tylko w ściśle określonych miejscach ciała, np. na podszewkach stóp czy wewnętrznych częściach dłoni), głównie tam, gdzie skóra stanowi nieco grubszą warstwę. Tą warstwę tworzy od 3 do 5 rzędów silnie przylegających i spłaszczonych keratynocytów (Rys. 3) [44]. Ostatnią, najbardziej zewnętrzną, zbudowaną z bezjądrzastych, płaskich komórek zawierających keratynę jest warstwa rogowa (łac. *stratum corneum*). Ze względu na brak jądra komórki te nie są zdolne do podziałów. Komórki w tej warstwie są połączone spoiwem lipidowym („cement międzykomórkowy”), które składa się z: ceramidów–40%, steroli–25%, wolnych kwasów tłuszczowych–18% oraz węglowodorów–11%). Główną funkcją spoiwa jest wypełnienie pustych przestrzeni międzykomórkowych w warstwie rogowej, uszczelnienie tej warstwy i stanowienie bariery nieprzepuszczalnej dla wody [45,46]. Powierzchnię *s. corneum* okrywa płaszcz hydrolipidowy, który stanowi mieszaninę wody i sebum produkowanego przez gruczoły łojowe [47]. W warstwie rogowej wyróżniamy 2 części: część zbitą, w której komórki – keratynocyty dachówkowato zachodzą na siebie i część złuszczejącą, gdzie keratynocyty są luźno ułożone (Rys. 3).

Pod warstwą naskórka znajduje się skóra właściwa (łac. *cutis vera*). Stanowi ona środkową tkankę skórną, którą budują 3 warstwy: brodawkowa, podbrodawkowa i siateczkowa. Warstwa brodawkowa wplata się w naskórek tworząc charakterystyczne brodawki, podbrodawkowa jest zbudowana z tkanki łącznej luźnej, natomiast siateczkowata jest utworzona z tkanki łącznej zbitej, której strukturę przecinają liczne włókna.). Fibroblasty stanowią kluczowy element budulcowy tkanki łącznej i są odpowiedzialne za wytwarzanie istoty międzykomórkowej i włókien [48]. W obrębie skóry właściwej są umiejscowione włókna kolagenowe typu I, III oraz typu V (pełniące rolę dopełnienia dla włókien kolagenowych typu I) odpowiadające za odporność na urazy

mechaniczne a także włókna elastynowe, które są odpowiedzialne za sprężystość i jędrność skóry [49]. W tej warstwie skóry znajduje się cała struktura naczyń włosowatych, których główną rolą jest dostarczenie składników odżywczych i tlenu a także odebranie szkodliwych metabolitów z żywych komórek naskórka. Ponadto w skórze właściwej znajdują się wolne zakończenia nerwowe, które są odpowiedzialne za funkcje czuciowe – uczucie dotyku, bólu, ucisku ciepła czy zimna [50].

Najbardziej wewnętrzną warstwą skóry usytuowaną pod warstwą tkanki właściwej jest podskórna tkanka tłuszczowa (łac. *subcutis*), która składa się z tzw. zrazików tłuszczowych oddzielonych tkanką łączną włóknistą. Pełni funkcję izolacyjną i w warunkach ekstremalnych stanowi rezerwuuar energii dla organizmu.

3.1. Transport substancji aktywnych przez skórę

Substancje aktywne, które mają bezpośredni kontakt z powłoką skórną przenikają przez nią przede wszystkim na zasadzie biernej dyfuzji, która została opisana przez I prawo Ficka [38,51]:

$$dq = -DS \frac{dC}{dx} dt \quad (1)$$

gdzie:

dq – masa substancji dyfundującej w czasie dt przez powierzchnię S . Masa ta jest proporcjonalna do zmiany stężenia dC na odcinku dx ,

D – współczynnik dyfuzji, czyli masa substancji dyfundującej w jednostce czasu przez jednostkę powierzchni (1cm^2), przy gradiencie stężenia $dC/dx=1$, odwrotnie proporcjonalny do masy cząsteczkowej substancji,

S – powierzchnia, na której zachodzi dyfuzja,

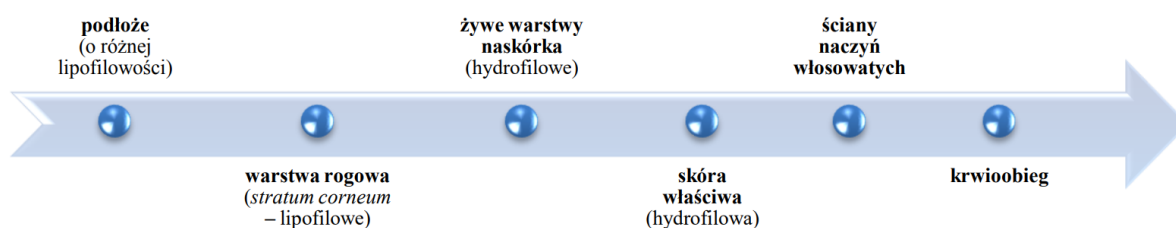
dC/dx – tzw. gradient stężenia, czyli zmiana stężenia odniesiona do jednostki długości. [38,51].

Proces biernej dyfuzji nie wymaga dostarczenia energii, zachodzi na zasadzie wyrównywania stężeń, a cząsteczki przemieszczają się zgodnie z gradientem stężeń, co jest uzależnione tylko od sił fizycznych – dyfuzji, osmozy i ich energii kinetycznej [51,52]. Cząstki substancji leczniczej tym szybciej przenikają przez błony im wykazują lepszą rozpuszczalność w tłuszczach [52,53]. Bierna dyfuzja cząsteczek substancji aktywnej przebiega zgodnie z następującymi krokami:

- wydzielenie cząsteczek substancji leczniczej pomiędzy formę aplikacyjną a warstwę rogową naskórka,

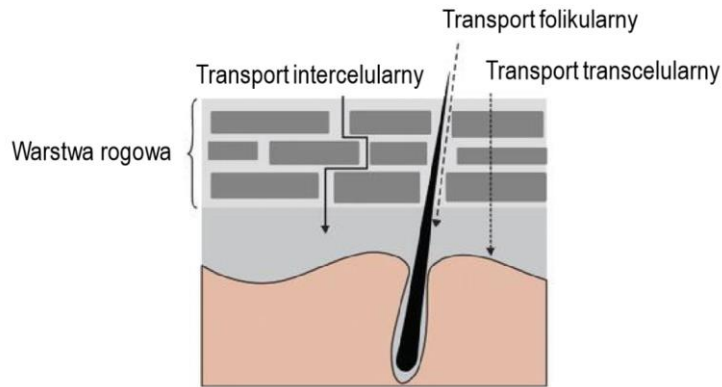
- dyfuzja cząsteczek substancji aktywnej przez lipofilową *s. corneum* naskórka,
- wydzielanie cząsteczek substancji pomiędzy warstwę rogową a ziarnistą zrogowaciałego naskórka,
- postępująca dyfuzja cząsteczek przez kolejne warstwy naskórka, w których wzrasta hydrofilowość,
- partycja substancji pomiędzy *stratum basale* a górną część skóry właściwej,
- dyfuzja cząsteczek substancji do skóry właściwej,
- przenikanie związku do krwi przez ściany naczyń włosowatych [38,51].

Poniżej przedstawiono schemat procesu biernej dyfuzji (Rys. 4).



Rys. 4 Schemat procesu biernej dyfuzji substancji aktywnej przez skórę [51]

Substancje aktywne mogą wnikać przez warstwę naskórka na dwa sposoby – poprzez warstwę rogową naskórka (transport transepidermalny) oraz przez przydatki skórne, tj. gruczoły potowe, łojowe oraz mieszki włosowe (transport transfolikularny). Transport transepidermalny do skóry właściwej może odbywać drogą intercelularną (transport międzykomórkowy, typowy dla substancji lipofilowych, rozpuszczalnych w spoiwie międzykomórkowym) oraz drogą transcelularną (poprzez komórki naskórka – korneocyty, typowy dla substancji hydrofilowych, nierozpuszczalnych w cemencie komórkowym) [38,51,52]. Z kolei transport transfolikularny to proces polegający na wnikaniu związków aktywnych do skóry właściwej wzdłuż torebek włosowych. Ten typ transportu zachodzi w przypadku substancji lipofilowych, które są bardzo dobrze rozpuszczalne w wydzielinach gruczołów łojowych umiejscowionych w pobliżu mieszków włosowych [38,54,55]. Poniżej na Rys. 5 zobrazowano wszystkie rodzaje transportu przez warstwę naskórka do skóry właściwej.



Rys. 5 Schemat dróg przenikania substancji aktywnej do skóry (zaadaptowano z [38])

Czynniki wpływające w istotny sposób na wydajność i efektywność przenikania substancji przez skórę można zaliczyć do następujących grup:

a) właściwości substancji dyfundującej:

- rozpuszczalność w lipidach i w wodzie,
- współczynnik podziału olej/woda,
- wielkość i kształt cząsteczki – szybciej dyfundują cząsteczki mniejsze (o masie cząsteczkowej mniejszej niż 3 kDa),
- polarność, ładunek i stopień dysocjacji – cząsteczki obojętne, niezdysonowane i niepolarne przenikają szybciej,
- lotność związku – gazy przenikają łatwo przez skórę,

b) właściwości bazy/matrycy:

- właściwości penetracyjne,
- obecność substancji pomocniczych (promotorów przenikania),
- obecność związków powierzchniowo-czynnych,
- tworzenie okluzji,
- pH,

c) czynniki biologiczne:

- stan zdrowia skóry i jej grubość – przez skórę uszkodzoną substancja szybciej dyfunduje,
- wiek, metabolizm,
- przepływ krwi,
- czynniki fizyczne:
 - temperatura (w tym ogrzanie skóry, masaż – wpływają korzystnie na przenikanie),
 - pora dnia,
 - klimat [51,56].

Największą przenikalnością przez warstwy naskórka cieszą się związki o charakterze niejonowym (niepolarne), małej lub średniej masie cząsteczkowej (< 500 Da) i cechujące się lipofilowością – penetracja substancji aktywnych przez skórę rośnie wraz ze wzrostem lipofilowości (log P w zakresie 1–3). Małe cząsteczki związków hydrofilowych mogą przenikać do warstw wodnych *stratum corneum* naskórka i zwiększać masę związanej wody (nie wyklucza się w tym wypadku transcelularnej drogi przenikania). Związki, które posiadają ładunki, mające budowę jonową mają ogromną trudność w penetracji warstwy naskórka, który w tej sytuacji stanowi skuteczną barierę w związku z czym dyfuzja takiego typu związków może następować za pośrednictwem przydatków skórnych [38,51].

Lipofilowość, która charakteryzuje zachowanie substancji chemicznej w obrębie struktur biologicznych (np. wiązanie z białkami osocza krwi, przenikanie przez błony biologiczne, barierę krew–mózg oraz różne struktury skóry) w warunkach *in vivo*, jest określana jako współczynnik podziału a także rozpuszczalność badanego związku w tłuszczach i w wodzie (te czynniki mają kluczowe znaczenie dla zdolności penetracji związku przez warstwę naskórka). Przewidywanie przebiegu farmakokinetyki i farmakodynamiki działania określonych, egzogennych substancji aktywnych i leków a także ich toksyczności jest określana na podstawie wartości lipofilowości danego związku. Określenie wartości lipofilowości substancji jest związane z wyznaczeniem współczynnika podziału pomiędzy dwie niemieszające się ciecze – n-oktanol i wodę, które dobrze modelują właściwości struktur komórkowych [51,56]. Ten współczynnik podziału wyraża się stosunkiem stężeń substancji w obu fazach:

$$P_{ow} = \frac{C_{oktanol}}{C_{woda}} \quad (2)$$

gdzie:

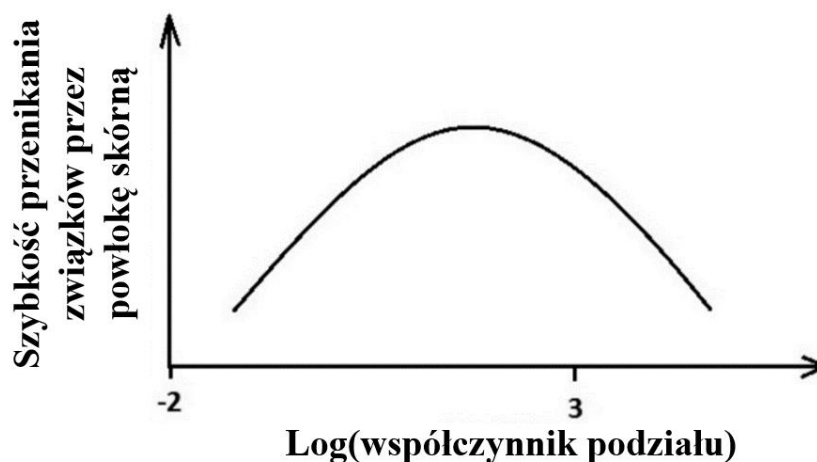
P_{ow} – współczynnik podziału oktanol/woda

$C_{oktanol}$ – stężenie związku w fazie oktanolowej, mol/litr

C_{woda} – stężenia związku w fazie wodnej, mol/litr

Lipofilowość związku jest przedstawiana w postaci logarytmu dziesiętnego ze współczynnika podziału $\log P_{ow}$. Związki, które mają wysoką wartość $\log P_{ow}$ (czyli o dużej lipofilowości) penetrują bez większych utrudnień do warstwy rogowej naskórka, natomiast ich wnikanie do warstwy Malpighiego naskórka jest już niemożliwe ze względu na jej hydrofilowy charakter. Odwrotna sytuacja jest w przypadku substancji

hydrofilowych (o niskiej wartości $\log P_{ow}$). Z łatwością dyfundują one przez żywe warstwy naskórka i skórę właściwą, ale ich transport przez hydrofobową część *stratum corneum* jest zahamowany. Potencjalnie najbardziej optymalną zdolnością do przenikania przez barierę naskórka będą charakteryzować się związki o średniej wartości lipofilowości, rozpuszczające się znacząco zarówno w środowisku wodnym jak i w tłuszczach, z maksimum dla wartości $\log P_{ow}$ 1,0–3,0 (Rys. 6) [51].



Rys. 6 Zależność przenikania związków przez powłokę skórną od ich lipofilowości (zaadaptowano z [51])

W celu poprawienia przenikalności danego związku można modyfikować jego strukturę. Lipofilowość w znaczącym stopniu warunkuje penetrację związków aktywnych przez skórę, zatem, aby poprawić ich przenikalność, można modyfikować ich strukturę, np. poprzez wprowadzenie grup alkilowych i arylowych do wyjściowego związku lub poprzez dodanie podstawników zdolnych do dysocjacji albo zawierających elektrycznie atomy (jak azot czy tlen), które z kolei obniżają wartość lipofilowości. Wprowadzanie zmian w lipofilowości, głównie w przypadku związków hydrofilowych doprowadza, że dane substancje mogą w łatwy sposób przeniknąć barierę warstwy rogowej naskórka i następnie przekształcić się do pierwotnej postaci związku, np. przez zhydrolizowanie lipofilowego prekursora. [51,56].

Powyżej przedstawiono metody zwiększania lipofilowości związku określoną mianem lipofilizacji. Najprostszymi jej metodami mogą być estryfikacja, alkoksylacja, amidowanie, tworzenie par jonowych a także zamykanie wyjściowego związku w lipofilowych nośnikach – liposomy czy niosomy [51].

Promotory wchłaniania (inaczej sorpcji, przenikania) stanowią substancje chemiczne przenikające do warstwy rogowej i zwiększające jej przepuszczalność. Schemat działania

promotorów wchłaniania opiera się na zaburzeniu układu lipidów międzykomórkowych poprzez usuwanie płaszcza hydrolipidowego lub częściowe rozpuszczanie lipidów spoiwa międzykomórkowego naskórka. Kluczową cechą charakterystyczną dla bezpiecznego promotora sorpcji jest jego odwracalność w działaniu, czyli aby po aplikacji preparatu z substancją aktywną została przywrócona bariera warstwy rogowej. Przywrócenie pełnej funkcji bariery przepuszczalności *stratum corneum* następuje w konsekwencji naturalnej eliminacji promotora wchłaniania z tej warstwy. Promotor sorpcji dyfunduje przez naskórek do głębszych warstw, gdzie dostaje się do krążenia ogólnego. Mechanizm działania promotorów przenikania zależy w głównej mierze od ich polarności. Związki te lokując się w *s. corneum*, w zależności od ich właściwości fizykochemicznych mogą zmieniać hydratację grup polarnych lipidów, zaburzać uporządkowany układ lipidów międzykomórkowych warstwy rogowej lub rozpuszczać albo upłynniać lipidy międzykomórkowe. Do najczęściej stosowanych promotorów wchłaniania można zaliczyć niskocząsteczkowe alkohole jedno- i wielowodorotlenowe (etanol, gliceryna, glikol propylenowy), dimetylosulfotlenki (DMSO), związki powierzchniowo czynne – surfaktanty (Tween, laurylosiarczan sodu), α - i β -hydroksykwasy (kwas salicylowy, kwas cytrynowy), a także alkany, kwasy tłuszczowe (kwas olejowy), estry, aminy, amidy (mocznik, pirolidon i jego pochodne), terpeny, cyklodekstryny. Należy pamiętać o tym, że takie promotory przenikania stanowią składnik bazy/matrycy produktu leczniczego, dlatego mogą wpływać na właściwości fizykochemiczne (pH, lepkość, stabilność) kosmetyku lub leku, w którym się znajdują [38,51,57-62].

4. Polimery naturalne i syntetyczne jako nośniki substancji aktywnej

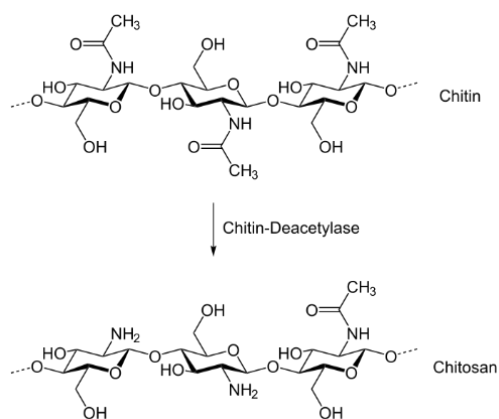
Sprawdzonymi materiałami do tworzenia nośników substancji aktywnej (leków, chemioterapeutyków, ekstraktów z roślin, związków o działaniu antymikrobowym i innych), w rozmaitych formach np. mikro- i nanokapsuły, hydrożele, itd. są: polimery naturalne, np. alginian, chityna i jej pochodne (w tym różne formy użytkowe chitozanu i dibutyrylochityna) maltodekstryny, guma arabska, hydrofobowo modyfikowana skrobia, kwas hialuronowy oraz białka, np. serwatkowe, albumina, kazeina, kolagen czy żelatyna. Ponadto do wytwarzania matryc polimerowych dla substancji aktywnej wykorzystuje się polimery syntetyczne tj. poliestry, polibezwodniki, polifosforany, polifosfoestry, poliaminokwasy (polimery alaniny, lizyny czy kwasu asparaginowego) czy też pochodne celulozy, np. etyloceluloza. Nieodpowiednio dobrany materiał otoczki

może spowodować duże straty zamykanej substancji aktywnej lub niedostatecznie chronić ją przed utlenianiem. Substancje, które są stosowane jako materiały otoczkujące powinny charakteryzować się rozpuszczalnością w użytych rozpuszczalnikach, właściwościami emulgującymi a także wysoką barierowością dla substancji aktywnych zamkniętych w środku jak również czynników otaczającego środowiska takich jak np. tlen. Ponadto takie związki powinny posiadać zdolność formowania filmu a także powinny tworzyć roztwory o niskiej lepkości przy wysokim stężeniu substancji [63].

4.1. Chitozan jako pochodna chityny

Chitozan jest polisacharydem rzadko spotykanym w naturze. W tej formie występuje jako składnik ścian komórkowych grzybów strzępkowych (klasa *Zygomycetes*) [64,65]. Na skalę przemysłową uzyskuje się go w wyniku procesu de-N-acetylacji chityny. Chityna jest biopolimerem szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie, pod względem budowy chemicznej jest poliwęglowodanem, który jest uzyskiwany głównie z pancerzyków stawonogów: skorupiaków, owadów oraz pajęczaków. Chityna jest również izolowana ze ścian komórkowych grzybów, wodorostów czy bakterii. W wyżej wymienionych organizmach żywych występuje ona w połączeniu z białkami i innymi polimerami (poliwęglowodanami, oraz wielocząsteczkowymi pigmentami organicznymi – zwanych melaninami) za pośrednictwem wiązań wodorowych tworząc charakterystyczne kompleksy. Roczna, światowa skala produkcji tego polimeru wynosi około 10 gigaton [66]. Chityna jest wielocząsteczkowym, liniowym polimerem, zbudowanym z podjednostek N-acetyloglukozaminy [2-(acetyloamino)-2-deoksy-D-glukozy], połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi. Wyizolowanie chityny z pancerzyków skorupiaków wymaga wykonania kilku operacji m.in. rozdrobnienia wyjściowego surowca, usunięcia z niego białka, węglanu wapnia oraz jego odbarwienia. Chityna pozbawiona dodatków posiada uporządkowaną strukturę krystaliczną, której makrocząsteczki są powiązane wiązaniami wodorowymi. Wiąże się to z tym, że jest ona polimerem o bardzo ograniczonej rozpuszczalności, co praktycznie uniemożliwia jej przetwórstwo. Jednak ze względu na unikatowe właściwości biologiczne i ogromną bazę odnawialnego surowca, jest ona wdzięcznym materiałem badawczym dla naukowców poszukujących skutecznych metod chemicznej modyfikacji chityny w celu umożliwienia jej łatwego przetwarzania jednocześnie z zachowaniem jej specyficznych właściwości użytkowych [66].

Chitozan jest kationowym kopolimerem, który jest zbudowany z połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym reszt glukozaminy i N-acetylo-glukozaminy. W zależności od sposobu i warunków prowadzenia procesu deacetylacji (Rys. 7) otrzymuje się kopolimery o różnym stopniu deacetylacji, który mieści się w granicach 60-80% oraz różnych masach molowych [66]. Z uwagi na korzystne i unikatowe właściwości biologiczne takie jak: biodegradowalność, nietoksyczne produkty rozkładu, bioaktywność, biogodność, nieimmunogenność, właściwości hemostatyczne, wysoka aktywność przeciwdrobnoustrojowa zdolność przyspieszania procesu gojenia ran znalazł zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu m.in. kosmetologii, ochronie środowiska, rolnictwie, weterynarii, ale przede wszystkim w przemyśle farmaceutycznym i medycynie [64,67-69].



Rys. 7 Proces deacetylacji chityny do chitozanu [70]

Obecność silnie zasadowych I-rzędowych grup aminowych, które powstały w wyniku reakcji hydrolizy grup amidowych chityny (Rys. 7) powoduje zwiększoną reaktywność i lepszą rozpuszczalność produktu w środowisku kwaśnym. Ze względu na właściwości bioaktywne tego polimeru i dobrą rozpuszczalność w rozcieńczonych wodnych roztworach kwasów organicznych chitozany o odmiennych stopniach deacetylacji a także różnych ciężarach cząsteczkowych są produkowane w znacznej ilości i w postaci różnych form użytkowych, które charakteryzują się szerokim spektrum zastosowań [64,69,71-73]. Chitozan wykazuje szereg bardzo pożądanых cech, m.in. hamuje rozwój komórek nowotworowych, powoduje obniżenie ciśnienia oraz stężenia lipidów we krwi, obniża poziom glukozy we krwi u osób z otyłością poprawia ruchy perystaltyczne jelit i wspomaga proces odchudzania, podnosi aktywność układu odpornościowego organizmu poprzez regulację pH krwi, poprawia krwioobieg w tkankach oraz absorbuje i usuwa z organizmu sole metali ciężkich (ołów, rtęć i inne).

Znane są również liczne postaci opatrunków na bazie różnych form użytkowych chitozanu (sole, mikrokryształiczny chitozan czy fibrydy chitozanowo–alginianowe). Opatrunki z dodatkiem tego polimeru działają hemostatycznie, w wyniku bezpośredniego kontaktu aktywują układ krzepnięcia krwi a także przyspieszają zabliznianie trudno gojących się ran poprzez stymulację produkcji kolagenu [64]. Ponadto chitozan wykazuje właściwości mukoadhezyjne, dzięki czemu jest możliwe wydłużenie czasu kontaktu związków leczniczych z błoną śluzową i jest to obiecujący materiał do syntezy mikrosfer doustnych, do oka czy dopoliczkowych [74]. Oprócz tego, dzięki zdolnościom otwierania połączeń desmosomalnych między komórkami, polimer poprawia transport substancji aktywnych przez półprzepuszczalne błony biologiczne [75]. Tworzenie mikrosfer chitozanowych jest możliwe dzięki zdolności chitozanu do formowania żelu w $\text{pH} > 6,5$. Odpowiedni dobór stopnia deacetylacji chitozanu oraz masy cząsteczkowej może wpływać na rozmiar mikrosfer oraz czas uwalniania substancji aktywnej. Ocenia się, iż światowa produkcja chitozanu osiągnęła poziom 13,7 tys. ton w roku 2010, a w 2015 – 21,4 tys. ton [76].

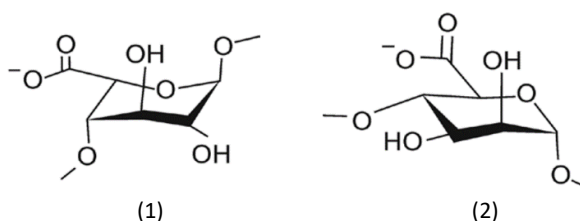
Innym sposobem modyfikacji chemicznej chityny jest proces estryfikacji jej grup hydroksylowych łańcuchami kwasów tłuszczowych [77,78]. W ten sposób powstała m.in. dibutyrylochityna (DBC) – maślan chityny – najśłynniejszy diester chityny o charakterze hydrofobowym, powstały przez wprowadzenie do łańcucha głównego dwóch objętościowo dużych grup butyrylowych, pochodzących od kwasu masłowego, rozpuszczalny w rozpuszczalnikach organicznych, takich jak aceton, etanol, metanol, DMF, DMSO, nierozpuszczalny w środowisku wodnym w przeciwieństwie do chitozanu [69,79,80]. Proces estryfikacji chityny za pomocą bezwodnika masłowego w obecności katalizatora kwasowego prowadzi do otrzymania DBC o pożądanym masach cząsteczkowych, co bezpośrednio warunkuje jego dalsze możliwości przetwórcze [79,81]. DBC posiada również właściwości błono- i włóknotwórcze [74]. Badania biologiczne potwierdziły, że DBC jest biozgodna, nie wykazuje właściwości drażniących ani efektu cytotoksycznego oraz spełnia wymagania normy dotyczącej biologicznej oceny wyrobów medycznych przy jednoczesnym przyspieszaniu procesu gojenia się ran [66,82-87].

4.2. Alginian

Polisacharydy znalazły szereg zastosowań w różnych gałęziach przemysłu m.in. w przemyśle tekstylnym, spożywczym, papierniczym, budowlanym, farmaceutycznym,

medycznym i innych. Jednak największy rozwój innowacyjnych rozwiązań w ciągu ostatniej dekady osiągnięto w dziedzinie medycyny [88]. Największe zainteresowanie polisacharydami wykazano w dziedzinie produktów higienicznych, medycyny regeneracyjnej i systemów nano-dostarczania [88,89]. Polisacharydy stosuje się przede wszystkim do funkcjonalizacji szeregu różnych urządzeń medycznych, np. cewników, szczelin naczyniowych (w protezach naczyń krwionośnych), przewodników i czujników [88].

Jednym z cenionych polisacharydów, który znalazł szereg zastosowań w branży medycznej i farmaceutycznej jest kwas alginowy izolowany ze ścian komórkowych brunatnic z rodziny *Phaeophyceae* oraz z otoczek śluzowych niektórych gatunków bakterii: *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Pseudomonas fluorescens*. Alginian składa się z podjednostek kwasu β -D-mannuronowego oraz z kwasu α -L-guluronowego (Rys. 8) [90].



Rys. 8 Epimery budujące liniowy i anionowy łańcuch kopolimeru (kwasu alginowego) [90]

Stosunek kwasu mannuronowego do guluronowego w kwasie alginowym wynosi 1:1,5 [90]. Biozgodność, biodegradowalność oraz nietoksyczność a także niski koszt uzyskiwania tych polisacharydów z brązowych alg morskich, sprawiły, że alginiany znalazły zastosowanie w medycynie przede wszystkim jako materiały opatrunkowe, składniki leków oraz rusztowania do transplantacji komórek w inżynierii tkankowej. Kwas alginowy może przyjmować formę hydrożelu w obecności dwuwartościowych jonów, np. kationów wapnia, gdzie każdy z nich otacza się czterema resztami kwasu, a powstała mikrostruktura żelu nosi miano „egg-box”, gdzie jest utrudniony proces wymiany Ca^{2+} na Na^+ [89,91]. Żele, które powstają z włókien otrzymanych z alginianu o przewadze bloków kwasu guluronowego nazywa się żelami twardymi. Natomiast jeśli w alginianie jest przewaga bloków kwasu mannurowego, to przejście w strukturę żelu jest bardziej ułatwione. Powstają wtedy żele miękkie o zwiększonej chłonności wody i znacznie podwyższonej zdolności wymiany jonów. Parametrem, który określa

sztynność i rozciągnięcie łańcucha polimeru, jest wykładnik w równaniu Marka-Houwinka–Sakurady [92]:

$$[\eta] = k \cdot M^{\alpha} \quad (3)$$

gdzie:

M - masa cząsteczkowa polimeru,

η - lepkość istotna,

k, α - zmienne parametry uzależnione od rodzaju i liniowej budowy łańcucha polimeru [92].

Alginy należy do najczęściej stosowanych anionowych polisacharydów w leczeniu trudno gojących się ran, np. ran odleżynowych oraz ran stopy cukrzycowej. Używa się różnych form opatrunków tj.: pianki, płatki, gazy i włókna wykonanych z tego kopolimeru lub w połączeniu z innym biopolimerem w celu przyspieszenia procesów gojenia i bliznowacenia ran. Wśród form włóknistych są znane mikro- i nanowłókna, które odgrywają kluczową rolę w zastosowaniach klinicznych [92].

4.3. Etyloceluloza

Etyloceluloza (EC) jest częściowo O-etylowanym polimerem eteru celulozy o hydrofobowym charakterze, dość szeroko stosowany od ponad pół wieku w przemyśle biomedycznym i farmaceutycznym [93,94]. Etyloceluloza należy do grupy liniowych polisacharydów i jest pochodną naturalnego polimeru – celulozy, dlatego swój polimerowy szkielet opiera na powtarzalnej strukturze pierścienia β -bezwodnikowo-glukozowego posiadającego trzy reaktywne grupy funkcyjne: grupy –OH. [93,95]. Ta pochodna powstaje w wyniku reakcji podstawienia grup hydroksylowych celulozy grupami etoksyłowymi [94]. Właściwości fizyczne uzyskanych form etylocelulozy a także ich wydajność są zależne od stopnia podstawienia lub eteryfikacji (zawartość grup etoksyłowych) oraz masy cząsteczkowej szkieletu celulozowego [91,92].

Rozpuszczalność EC w środowisku wodnym uzyskuje się przy stopniu podstawienia (DS) w zakresie 1,0–1,5 natomiast rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych jest osiągana dla wartości DS w zakresie 2,2–2,6 (i głównie takie produkty są dostępne komercyjnie) [95]. Formy EC, które zawierają więcej niż 46,5% grup etoksy są rozpuszczalne w chloroformie, 95% etanolu, octanie etylu, metanolu i toluenie, natomiast te, które mają mniej tych grup mniej niż 46,5% są dobrze rozpuszczalne w chloroformie, octanie metylu, tetrahydrofuranie oraz węglowodorach aromatycznych z dodatkiem etanolu [96].

Z uwagi na korzystne właściwości biologiczne tj. biokompatybilność, EC została zatwierdzona przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków jako substancję chemiczną ogólnie uznana za bezpieczną wykazującą potencjał modulowania a także polepszania fizjologicznych właściwości różnych związków bioaktywnych. EC ma zastosowanie jako forma stała do spowolnionego uwalniania innych substancji aktywnych – dawkowania leków, również jako środek wiążący, substancja błonotwórcza, biopolimer tworzący powłoki, a także w implantach i w kapsułkowaniu (nano-, mikro-, makro-) i innych [93]. Atrakcyjne właściwości fizyczne EC pozwalają na wykorzystanie jej w szerokim spektrum zastosowań. Do tych właściwości zalicza się wytrzymałość mechaniczną, termoplastyczność oraz elastyczność, która zostaje zachowana przy braku obecności plastyfikatora jak również w niskich temperaturach (nawet do -40°C). Ze względu na doskonałe właściwości błonotwórcze oraz to, że EC jest przezroczysta, doskonale się sprawdza jako środek powlekający w różnych produktach [93,95]. Ponadto stabilność termiczna, właściwości termoplastyczne oraz zdolność do mięknienia w temperaturze $135\text{--}160^{\circ}\text{C}$, daje EC wszechstronne możliwości w procesach wytłaczania na gorąco, co wspomaga właściwości spowolnionego uwalniania substancji leczniczej a także lepszą biodostępność zwłaszcza substancji aktywnych o słabej rozpuszczalności [93]. Kinetyka uwalniania substancji aktywnych przez matrycę etylocelulozową zachodzi głównie w wyniku procesu biernej dyfuzji. Badania wykazały, że jest to proces spowolniony, szczególnie w przypadku takich form jak tabletki, kapsułki itp. Wyjątek stanowią matryce leków charakteryzujące się większą powierzchnią tj. peletki i granulki, w których kinetyka uwalniania zamkniętych leków jest znacznie szybsza [93,97-99].

5. Ekstrakt z *Ginkgo biloba*

Miłorząb japoński (zwany inaczej dwuklapowym, dwudzielnym, chińskim) łac. *Ginkgo biloba* jest reliktem i gatunkiem endemicznym, który jako jedyny przetrwał całą erę kenozoiczną [100]. Zgodnie z danymi zawartymi w literaturze najstarsze osobniki z tego gatunku liczą ponad 4 tysiące lat i rosną w Chinach a ich wysokość jest równa około 40 m. Z Chin miłorząb trafił prawdopodobnie do Japonii i Korei (tu z kolei okazy liczą 1100-1250 lat i mierzą około 30 m). Na kontynent europejski *Ginkgo biloba* został sprowadzony z Japonii w wyniku wypraw ekspansyjnych na przełomie XVII i XVIII wieku [100,101]. Systematycznie *Ginkgo biloba* jako pojedynczy osobnik należy do rodzaju *Ginkgo* należącego do rodziny *Ginkgoaceae* i klasy *Ginkgoales* [101,102]. W obecnych czasach są prowadzone olbrzymie plantacje w Stanach Zjednoczonych oraz

Francji ze względu na jego terapeutyczne działanie oraz obecność w jego liściach (zarówno zielonych jak i żółtych) substancji bioaktywnych i leczniczych [100]. Ekstrakt z liści miłorzębu japońskiego jest stosowany w medycynie oraz farmacji i składa się z różnych frakcji m.in. flawonoidów, laktonów terpenowych, terpenoidów, polifenoli, kwasów organicznych, węglowodanów, NNKT, soli nieorganicznych, aminokwasów i innych [100,103,104]. W Tabeli 2 zaprezentowano podstawowy skład chemiczny ekstraktu z suszu liści miłorzębu (EGb 761).

Tabela 2 Skład chemiczny ekstraktu z suszu liści *Ginkgo biloba* – EGb 761 [105]

Nazwa związku chemicznego	Zawartość
Glikozydy flawonoli	21,6–26,4 %
Trilaktony terpenów	5,4–6,6 %
Ginkgolidy A + B + C	2,8–3,4 %
Bilobalid	2,6–3,2 %
Proantocyjanidyny	< 9,5 %
Kwasy ginkgolowe	< 5 ppm
Woda	< 3,0 %
Popiół	< 1,5 %

Poza wymienionymi w tabeli związkami w suszu z liści *Ginkgo biloba* występują również triterpeny tj. sitosterol i jego glikozyd, kampesterol i 22-dihydrobrassikasterol [106,107]. W wyniku przeprowadzonych wielokierunkowych badań biologicznych zostało wykazane, że za aktywność terapeutyczną jest odpowiedzialna frakcja flawonoglikozydów oraz pochodnych terpenowych [100,104,108]. Wykazano także, że skuteczny efekt terapeutyczny jest możliwy dzięki zachowaniu odpowiedniej proporcji poszczególnych zespołów związków czynnych [107]. Wyciąg z *Ginkgo biloba* ma zastosowanie u osób z nadmierną nerwowością a także w przypadkach z problemami pamięciowymi, stanami otępienia oraz zaburzeniami koncentracji (zwłaszcza u starszych osób). Ekstrakty z liści mają również działanie antyoksydacyjne - usuwają szkodliwe wolne rodniki, przeciwrakowe, antymutagenne, przeciwastmatyczne jak również przyspieszające proces gojenia się ran [105,108]. Wykazano, że ekstrakt z liści miłorzębu skutecznie poprawia mikrokrążenie krwi w mózgu oraz w kończynach ciała zwiększając dopływ tlenu oraz składników odżywczych, zapobiega tworzeniu się skrzepów,

wzmocnienia ściany naczyń włosowatych i chroni komórki nerwowe przed uszkodzeniem przy ograniczonej ilości tlenu w otoczeniu [103].

6. Nanocząstki

6.1. Nanocząstki nieorganiczne

Nanocząstki (NPs) mają wymiary w zakresie 1-1000 nm i dzięki temu posiadają unikatowe właściwości. NPs można podzielić na nanocząstki organiczne (lipidowe i polimerowe) oraz nieorganiczne [109,110]. Nieorganiczne NPs mają duże znaczenie, ponieważ charakteryzują się wysoką odpornością na niesprzyjające warunki przetwarzania [111]. NPs tlenków metali, np. tlenku tytanu, tlenku cynku, tlenku srebra czy tlenku magnezu, wykazują duże zainteresowanie w obrębie grupy materiałów nieorganicznych ze względu na ich stabilność fizyczną i optyczną a także przestrajalne właściwości optyczne [109,110]. Sztywne cząstki zawierające metale takie jak Au, Ag oraz tlenki metali, są powszechnie stosowane w różnych produktach do stosowania miejscowego, zwłaszcza do promowania przenikania leków przez skórę [110-113]. NPs złota charakteryzują się bezpieczeństwem biologicznym i są szeroko stosowane w różnych dziedzinach biomedycyny [114]. NPs złota są obiektem licznych badań ze względu na ich biokompatybilność, stabilność oraz możliwość wytwarzania w różnym zakresie rozmiarów [113]. Chen i wsp. badali AuNPs skoniugowane z czynnikiem wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), który działał stymulująco na proces gojenia się ran [115]. NPs srebra również są rozpatrywane w badaniach ze względu na właściwości przeciwzapalne i inhibitory wzrostu niektórych bakterii, np. *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter koseri*, *Salmonella typhii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio parahaemolyticus* i drożdżaków – *Candida albicans*. Ze względu na swoje właściwości są stosowane jako warstwy aktywne w cewnikach, wenflonach i innych sprzętach medycznych, a także przy w leczeniu ran oparzeniowych zapobiegając powstawaniu biofilmów bakteryjnych, co przy obniżonej odporności pacjentów hospitalizowanych w konsekwencji mogłoby doprowadzić do uogólnionego zakażenia organizmu, czyli sepsy [116]. Lio i wsp. w swoich badaniach wykorzystywał mezoporowate nanocząstki krzemionki (MSNP), które stanowiły nośnik siRNA. Następnie aplikowano ww. nanocząstki na skórę i badano ich przenikanie do górnej warstwy skóry i penetrację do tkanki nowotworowej. Wykazano, że badane siRNA wnikało w głąb skóry zmniejszając ekspresję TGFβR-1 (genu odpowiedzialnego ze ekspresję komórek nowotworowych) i wykazując pożądane działanie przeciw-

nowotworowe [117]. Inne rodzaje metalicznych NPs również badane pod kątem TDSS obejmują metaliczne tlenki żelaza, tytanu, cynku itp. [116].

6.2. Nanocząstki lipidowe

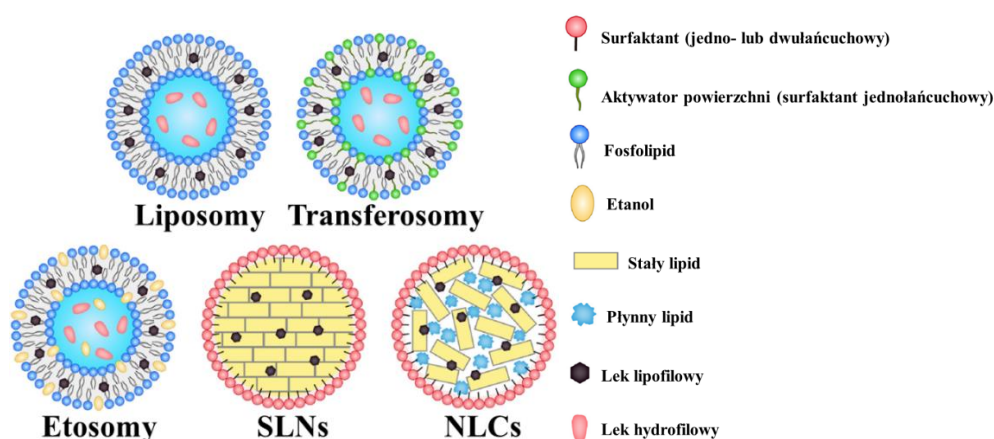
Lipidowe nanocząstki można podzielić na grupy, które przedstawiono i scharakteryzowano w Tabeli 3.

Tabela 3 Grupy nanocząstek lipidowych – charakterystyka, zalety i wady

Nanocząstki	Charakterystyka	Zalety	Wady
Liposomy [110,113,118,119]	<ul style="list-style-type: none"> - Dwuwarstwowa lipidowa sfera; - Złożona z cholanu sodu, cholesterolu, lecytyny i peptydów; 	<ul style="list-style-type: none"> - Nośnik substancji aktywnych zarówno o charakterze hydrofilowym jak i hydrofobowym; - Biodegradowalne i nietoksyczne; 	<ul style="list-style-type: none"> - Stosunkowo duże rozmiary; - Nieelastyczne;
Transferosomy [110,113,120,121]	<ul style="list-style-type: none"> - Rdzeń wodny otoczony dwuwarstwą lipidową; - Używany do dostarczania przezskórnego; - W skład otoczki wchodzi: fosfolipidy, Tween 80, deoksychofan sodu; 	<ul style="list-style-type: none"> - Wysoce elastyczne; - Odkształcalne; 	<ul style="list-style-type: none"> - Trudność w zamykaniu substancji o charakterze hydrofobowym oraz w transporcie cząstek w warunkach okluzyjnych;
Etosomy [110,113,122-124]	<ul style="list-style-type: none"> - Ten rodzaj nośników może docierać do głębszych warstw skóry i następnie do krążenia ogólnoustrojowego; - W skład otoczki wchodzi: fosfatydylocholina, fosfolipidy sojowe, dezoksychofan sodu, cholesterol, etanol i woda; 	<ul style="list-style-type: none"> - Może przenosić zarówno leki hydrofilowe jak i lipofilowe; - Może dostarczać substancje aktywne w warunkach okluzyjnych i nieokluzyjnych; 	<ul style="list-style-type: none"> - Skutki długoterminowe nie zostały jeszcze ocenione;
Niosomy [113,121,125]	<ul style="list-style-type: none"> - Jedno- lub wielowarstwowe, złożone z cholesterolu oraz niejonowych środków 	<ul style="list-style-type: none"> - Ekonomiczne w produkcji; - Doskonała stabilność; - Mogą sprawić, że SC będzie 	-

	powierzchniowo czynnych;	mniej zbita i łatwiejsza do penetracji;	
Stale nanocząstki lipidowe (SLNs) [110,113,126-129]	- Złożone ze stałych lipidów, palmitynianu cetylu, polisorbatu 80; - do zastosowań miejscowych;	- Do transportu leków lipofilowych; - Zwiększenie akumulacji leków w skórze przy jednoczesnym zmniejszeniu przenikania; - wysoka elastyczność;	- Słaba zdolność zamykania większej ilości leku w SLNs; - Utrata leku podczas przechowywania;
Nanostrukturalne nośniki lipidowe (NLCs) [110,113,120,130-132]	- Składają się z mieszaniny stałych i płynnych lipidów; - Używane do zastosowań miejscowych; - Złożone z dynasanu-114, kaproil 90, lecytyny sojowej, monostearynianu glicerolu, DDAB, Compritol® 888 ATO i Precirol® ATO 5 poloksameru 188;	- Zdolność zamykania większej ilości leku w porównaniu do SLNs; - Zmniejszone wydzielanie leku;	- Dane dotyczące długoterminowej stabilności fizycznej nie są dostępne;

Strukturę poszczególnych lipidowych nanocząstek przedstawiono na Rys. 9.



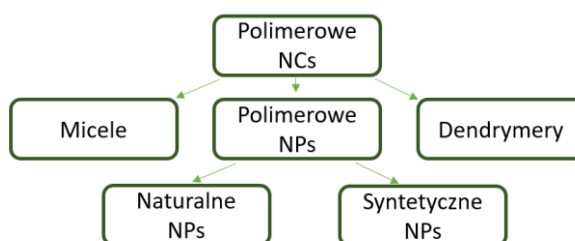
Rys. 9 Struktura różnych nanocząstek lipidowych [110]

W lipidowych nanocząstkach najczęściej zamyka się substancje lecznicze działające przeciwko czynnikom etiologicznym powodującym takie choroby jak łuszczyca (np. etosomy zawierające kurkuminę [133]), trądzik czy grzybice, np. łupież pstry [109]. Częstki lipidowe są również wykorzystywane do zwiększenia efektu terapeutycznego

(poprzez spowolnione uwalnianie) leków stosowanych przeciwko pasożytom, np. chalkony w leczeniu leiszmaniozy skórnej [134] a także w terapiach przeciwnowotworowych skóry (uwalnianie kwercetyny [135], zieleni indocyjaniny [136], wemurafenibu [118], paklitakselu [122] stosowanych w leczeniu czerniaka) oraz w miejscowym działaniu przeciwbólowym (SLPs i NLCs zawierające lidokainę i prylokainę [137]). Wykazano, że opracowane przez Cevc i wsp. [138] transferosomy mogą pozwolić przedostać się insulinie do krwiobiegu poprzez aplikację skórną, z widocznym efektem hipoglikemicznym porównywalnym do wstrzyknięcia podskórnego. W innych badaniach za pośrednictwem transferosomów dostarczano miejscowo i nieinwazyjnie toksoid tężcowy [139] oraz oczyszczony antygen powierzchniowy wirusa WZW typu B [140] w celu zastymulowania organizmu do wytworzenia swoistej odpowiedzi immunologicznej. Z kolei etosomy opracowane przez Sguizzato i wsp. zawierające koenzym Q10 znalazły szerokie zastosowanie w kosmetologii. Mogą być one dodawane do produktów kosmetycznych stosowanych do pielęgnacji skóry w celu uzyskania działania przeciwstarzeniowego [141].

6.3. Nanonośniki polimerowe

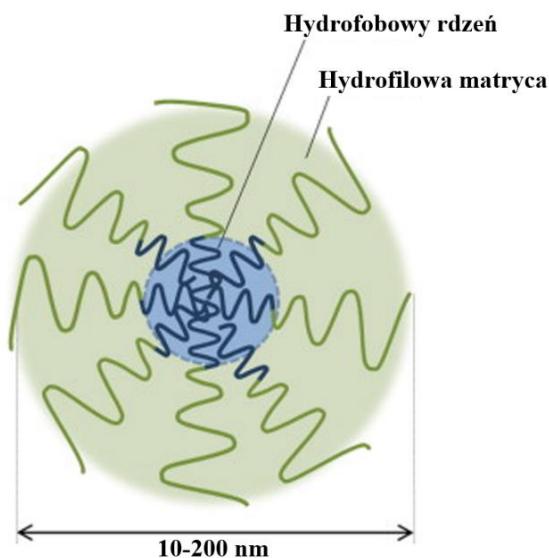
W ostatnim czasie badacze skupili się przede wszystkim na opracowaniu terapeutycznie aktywnych nanonośników polimerowych (NCs) w celu poprawienia zdolności przenikania substancji aktywnych różnymi drogami, m.in.: drogą przezskórną, ale także pokarmową (aktywna endocytoza), oddechową i iniekcyjną [142]. Nanonośniki polimerowe mają możliwość łatwiejszej modyfikacji właściwości chemicznych i fizycznych, zmniejszając w ten sposób utratę zamkniętego w środku leku jednocześnie zwiększając penetrację leku przez S.C. i zapewniając kontrolowane uwalnianie [113]. Biorąc pod uwagę ich stabilność i łatwość modyfikacji powierzchni są szeroko stosowane w różnych sektorach przemysłu, zwłaszcza medycznym, farmaceutycznym i weterynaryjnym. Według kryterium podziału, którym jest budowa, nanonośniki polimerowe można podzielić na trzy grupy (Rys. 10).



Rys. 10 Podział nanonośników polimerowych w oparciu o ich strukturę [110]

6.3.1. Micele

Micele polimerowe są sferycznymi, ale niestałymi cząsteczkami o wielkości w zakresie 10–200 nm. Są one wytwarzane w wyniku samoorganizacji w amfifilowe cząsteczki polimeru w roztworze wodnym. Ich rdzeń i matryca składają się odpowiednio z części hydrofobowej i hydrofilowej (Rys. 11), gdzie hydrofilowa powłoka stabilizuje nanostrukturę i pozwala kontrolować uwalnianie substancji aktywnej w wodnym roztworze [143].



Rys. 11 Budowa miceli polimerowej [143]

W ten sposób łańcuchy hydrofilowe osłaniają łańcuchy hydrofobowe przed oddziaływaniem ze środowiskiem wodnym, zmniejszając międzyfazową energię swobodną układu polimer-woda. Główną siłą napędową tworzenia miceli polimerowych jest minimalizacja swobodnej energii międzyfazowej [143,144]. Podczas wytwarzania miceli należy zwrócić uwagę na krytyczne stężenie micelarne (CMC). CMC to minimalne stężenie polimeru wymagane do utworzenia miceli. Przy dość niskich stężeniach polimerów liczba łańcuchów jest zbyt mała do procesu samoorganizacji i dodatkowo łańcuchy są rozmieszczone w całym roztworze i działają jak środki powierzchniowo czynne (surfaktanty), adsorbując na granicy faz powietrze-woda lub woda-rozpuszczalnik organiczny. Przy zwiększaniu stężenia polimeru, większa ilość łańcuchów jest adsorbowana na granicy faz i ostatecznie osiąga się stężenie, przy którym zarówno roztwór w masie, jak i granica faz są nasycone łańcuchami polimerowymi. Przy wyższym stężeniu polimeru micele są stabilne, pod warunkiem, że nie zostaną rozcieńczone poniżej CMC [143]. Micele polimerowe mogą regulować wydzielanie zamkniętych w nich środków terapeutycznych w organizmie, poprawiać ich okres

półtrwania w układzie krążenia a także zwiększać ich bezpieczeństwo i skuteczność działania [145,146].

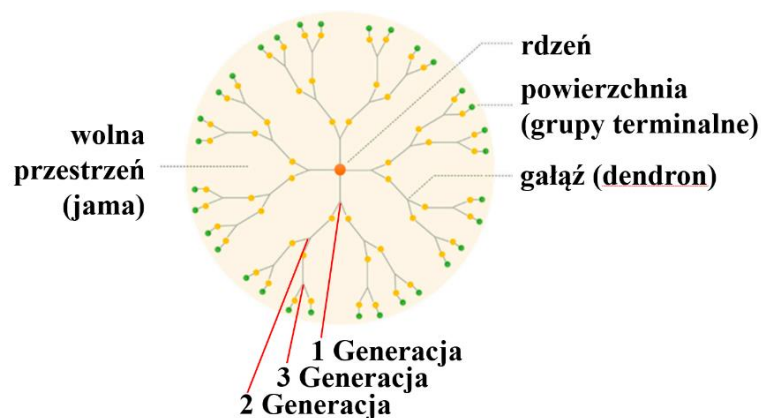
Lapteva i wsp [147] badali właściwości użytkowe cyklosporyny A zamkniętej w micelach MPEG-dihexPLA, które mogą być wykorzystane w celowanym dostarczaniu tej substancji aktywnej bez przechodzenia przez skórę właściwą w celu zwiększenia jej biodostępności miejscowej i zmniejszenia możliwości wystąpienia skutków ubocznych badanego układu. Zastosowano również inny podobny nanonośnik, MPEG-hexPLA, który z kolei był stosowany w celu zwiększenia akumulacji leku w skórze. Inni badacze (Yuan i wsp.) zamykali hydrokortyzon w micelach MPEG-PCL, a następnie wprowadzali je do hydrożelu, aby uzyskać kompozyt, który może być nakładany miejscowo [148].

W eksperymentach z użyciem komory dyfuzyjnej Franza badany kompozyt wykazywał bardzo dobrą penetrację skóry, odpowiednio 9 i 50 razy większą w odniesieniu do komercyjnie dostępnego kremu. Ponadto uzyskany kompozyt, który zawierał małą dawkę środków aktywnych wykazywał korzystne działanie terapeutyczne i minimalne działania niepożądane w warunkach *in vivo*. Zaprojektowano wiele nośników micelarnych, reagujących na pH w terapii antynowotworowej powodujących zwiększenie stężenia substancji leczniczej w tkankach zmienionych nowotworowo i wzmacniając skuteczność działania przeciwnowotworowego [149,150].

6.3.2. Dendrymery

Dendrymery to klasa specjalnych i monodispersyjnych polimerów syntetycznych o silnie rozgałęzionej strukturze z dobrze zdefiniowanymi właściwościami, jak rozmiar, masa cząsteczkowa, ładunek powierzchniowy itp. [151,152]. Historia dendrymerów liczy 45 lat, gdzie w 1978 roku zostały po raz pierwszy zsyntetyzowane przez niemieckiego Fritza Vögtla [153,154].

Pod względem strukturalnym dendrymery charakteryzują się budową trójwymiarową i kształtem są zbliżone do kuli. W budowie dendrymerów wyróżnia się wielofunkcyjny rdzeń, od niego promieniście odchodzą dendrony, czyli „gałęzie” (ramiona) dendrymerów. Na końcu ramion są usytuowane wolne grupy funkcyjne, które mogą podlegać różnym zmianom przez podstawniki modyfikujące ich właściwości fizyczne i chemiczne [154]. Ogólny schemat budowy dendrymeru przedstawiono na Rys. 12.



Rys. 12 Struktura dendrymeru [152]

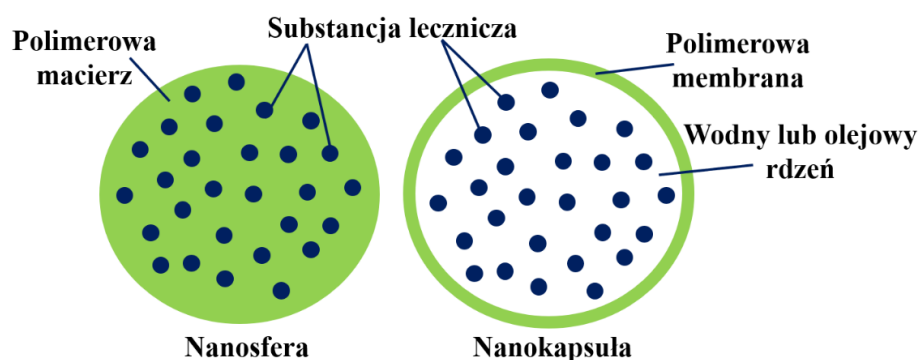
Istnieje wiele rodzajów dendrymerów zawierających różne rdzenie i mery m.in.: poliamidoaminowe (PAMAM), polipropylenoiminowe (PPI), polilizynowe (PLL), poliestrowe, polieterowe, karbokrzemowe i inne [152,154,155]. Innym kryterium podziału dendrymerów jest podział na dwa rodzaje generacji dendrymerów: połówkowe, które są zakończone grupami $-\text{COOH}$ lub $-\text{COONa}$, oraz całkowite posiadające grupy $-\text{NH}_2$ lub $-\text{OH}$ [154]. Im wyższy numer generacji dendrymerów (kolejnego podziału dendronów) tym większy stopień upakowania w obszarze przy powierzchni cząsteczek, a to w konsekwencji powoduje zahamowanie ich dalszego wzrostu. Jest to zjawisko nazwane „efektem Starburst”, który pozwala na to, że dendrymery można syntetyzować tylko do generacji 10 [154]. W konsekwencji wzrostu generacji cząsteczek dendrymerów rośnie ich średnica, np. średnica dendrymerów PAMAM generacji 2 (G2) wynosi ok. 2,0 nm, G3–3,1 nm, G4–4,0 nm, G5–5,3 nm, G6–6,7 nm, G7–8,0 nm [156]. Obecność w strukturze dendrymerów specyficznych jam, które są wykorzystywane jako swoiste kieszenie, daje możliwość upakowania w nich różnego rodzaju substancji [154]. Ponadto mogą być one również wiązane za pośrednictwem terminalnych grup funkcyjnych na powierzchni rozbudowanych cząsteczek [157]. Można w/n nich kapsułkować związki aktywne zarówno o charakterze hydrofobowym, jak i hydrofilowym. Wykazują specyficzność i swoistość w terapiach celowanych, dlatego są powszechnie używane w zwalczaniu nowotworów, takich jak np. czerniak czy rak płaskonabłonkowy [151]. Chauhan i wsp. wykazali, że dendrymery PAMAM 4,5 G ze związaną indometacyną powodują uzyskanie znacznie wyższego stężenia leku we krwi szczurów Wistar w odniesieniu do badania z użyciem zawiesiny leku [158]. Dendrymery w zastosowaniu jako systemy transdermalne były wykorzystywane do zamykania takich substancji leczniczych jak 5-fluorouracyl, niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ), w tym ketoprofen, deksametazon, peptydy itp. [159-162]. Lohan i wsp. w swoich badaniach

wykazali, że system dendrytyczny typu rdzeń-wielootoczka, składający się z rdzenia z poliglicerolu, C18 i glikolu polietylenowego jako otoczki, może transportować „ładunek” do mieszka włosowego na głębokość nawet 340 μm [163]. Całą strukturę a zwłaszcza powierzchnię dendrymerów można modyfikować w celu poprawienia ich właściwości fizycznych, chemicznych i użytkowych takich jak: bezpieczeństwo biologiczne, stabilność i zdolność transportu leków [152,164]. Yang i wsp. przygotowali z kolei cząsteczki dendrymerów (DM) „załadowane” endoksyfenem z różnymi terminalnymi grupami funkcyjnymi ($-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$ i $-\text{Ac}$), w których DM-COOH posiadały najwyższą skuteczność enkapsulacji i najlepszą zdolność przenikania przez skórę [165]. Eksperyment wykazał, że cząsteczki dendrymerów mogą dostarczać substancje lecznicze o charakterze hydrofobowym w głąb skóry, bez konieczności przechodzenia przez naskórek, unikając w ten sposób potencjalnego działania drażniącego skóry przez polimery z otoczki [165].

6.3.3. Nanocząstki polimerowe

Nanocząstki polimerowe (PNPs) są przygotowywane z różnych polimerów, które powinny być biokompatybilne z ludzkimi komórkami i tkankami, nietoksyczne, nieantygenowe [166] i biodegradowalne [167]. Biodegradacja odgrywa kluczową rolę w profilu farmakokinetycznym PNPs poprzez przedłużone uwalnianie, wielkość subkomórkową oraz biokompatybilność produktów biorozkładu z tkankami człowieka [168].

Na Rys. 13 przedstawiono strukturę 2 typów nanocząstek polimerowych.



Rys. 13 Dwa główne typy nanocząstek polimerowych: nanosfera (układ zbiornikowy) i nanokapsuła (układ matrycowy) zawierające lek [169]

Innym kryterium podziału polimerowych NPs jest skład matrycy polimerowej w związku z tym wyróżniamy dwie grupy nanocząstek:

- a) NPs z biopolimerów (polisacharydy: chitozan, alginian, kwas hialuronowy, dekstran guma guar, celuloza oraz polipeptydy tj. kolagen, albumina, elastyna, żelatyna, gliadyna, legumina, kwas poli- γ -glutaminowy, itp.) [110,113,167,170-185];
- b) NPs z polimerów syntetycznych (PLA, PCL, PLGA, PGA, PEG, PAA, MPEG-PMBC, dioksanon, cyklodekstryna, polibezwodniki na bazie kwasu sebacynowego i adypinowego, a także poliamidy, poliwęglany, poliortoestry i polimery na bazie fosforanów itp. oraz ich mieszanki) [110,113,170-178,186-192].

6.3.3.1. Nanocząstki z polimerów syntetycznych

Najczęściej stosowanymi metodami otrzymywania syntetycznych nanocząstek są nanoprecypitacja, polimeryzacja dyspersyjna, polimeryzacja *in situ*, nanoemulsyfikacja, wypieranie rozpuszczalnika a także odparowanie/ekstrakcja rozpuszczalnika [123]. Syntetyczne NPs zazwyczaj kumulują się w mieszkach włosowych i stosuje się je w dostarczaniu małowcząsteczkowych leków lipofilowych [193]. Substancje lecznicze są adsorbowane na powierzchni albo kapsułkowane lub dyspergowane w matrycy polimerowej NPs [113]. Polimery syntetyczne można podzielić na dwie grupy: polimery biodegradowalne i niedegradowalne. Do polimerów biodegradowalnych jak również najbardziej rozpowszechnionych należą PLGA, PGA, PCL i PLA. Wszystkie zostały uznane przez FDA (Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków) do określonych zastosowań medycznych, ponieważ są łatwo usuwane z organizmu w postaci wody i dwutlenku węgla [194,195]. Nanocząsteczki z matrycą z PLGA należą do najczęściej stosowanych syntetycznych NPs polimerowych ze względu na ich biokompatybilność, zdolność do enkapsulacji leków hydrofilowych, jak również lipofilowych oraz szerokie spektrum zastosowań w preparatach zatwierdzonych przez FDA oraz w biomateriałach i urządzeniach stosowanych w branży medycznej [171]. Produktami degradacji PLGA są kwas mlekowy i kwas glikolowy, które są usuwane z organizmów żywych podczas reakcji biochemicznych zachodzących w trakcie cyklu Krebsa [193]. Sun i wsp. porównali w swoich efektywność uwalniania kurkuminy zamkniętej w NPs (z PLGA) w odniesieniu do hydrożelu PLGA z tą samą substancją leczniczą. Zaobserwowano, że w pierwszym przypadku uwalnianie kurkuminy było lepsze w badaniach *in vivo* prowadzonych na mysim modelu łuszczycy powodowanym przez imikwimod [196]. Inne badania wykazały, że sztywne NPs mniejsze niż 10 nm mają zdolność do pasywnego przenikania przez skórę za pomocą macierzy lipidowej w SC i przez gromadzenie się

w mieszkach włosowych [197]. Patzelt i wsp. wykazali z kolei, że dla nanocząstek z PLGA o rozmiarach w zakresie od 122 nm do 1000 nm w badaniach prowadzonych na modelu skóry ucha świni *in vitro*, najgłębiej przez mieszki włosowe zostały przetransportowane NPs o średnicy 643 nm [198]. Innymi biodegradowalnymi syntetycznymi nanocząstkami stosowanymi pod kątem TDDS, są NPs o matrycy składającej się z tyrozyny (znane pod nazwą handlową TyroSpheres), TyroSpheres składają się z kopolimeru trójblokowego typu ABA, gdzie A oznacza hydrofilowy poli(glikol etylenowy), a B – hydrofobowe oligomery estrów desaminytyrozylo-tyrozyny kwasu suberynowego [199,200]. Ponadto wiążą się z lekami o charakterze lipofilowym, takimi jak chemioterapeutyki, np. paklitaksel, natomiast nie wytwarzają kompleksów ze związkami hydrofilowymi [200]. Nie zaobserwowano efektu cytotoksycznego jak również zmniejszenia żywotności w badaniach *in vitro* prowadzonych na komórkach raka szyjki macicy, na które stosowano nanosfery o stężeniach w zakresie od 0,1 mg/ml do 4 mg/ml [200]. Ponadto nie zaobserwowano pogorszenia morfologicznego tkanek w ludzkiej skórze po 24 godzinach w kontakcie z tymi nanosferami [201]. W innych badaniach udowodniono, że TyroSpheres z cholekalcyferolem zapewniały skuteczną ochronę tego leku przed hydrolizą i fotodegradacją, a tym samym zapewniały wysoką jego stabilność [202]. Poli(ϵ -kaprolakton) to inny syntetyczny polimer, który znalazł szerokie zastosowanie w nanocząstkach ze względu na unikatowe właściwości tj. biokompatybilność, biodegradowalność i właściwości mechaniczne. Ponadto, ze względu na semikrystaliczną strukturę PCL, jego degradacja zachodzi wolniej w odniesieniu do poliestrów amorficznych, co pozwala na przedłużone i spowolnione uwalnianie zamkniętego leku [193]. Alvarez-Roman i wsp. opracowali metodykę wytwarzania NPs z PCL z zamkniętym w nich metoksycynamonianem oktylu do transdermalnego dostarczania preparatu przeciwsłonecznego. Wyniki badań wykazały lepszą ochronę przeciwsłoneczną i częściową ochronę przed rumieniem [203]. Badano również NPs formułowane z niedegradowalnych polimerów badano również pod kątem dostarczania substancji czynnych przez skórę. Turos i wsp. opracowali system emulsyjny typu O/W, w którym wykorzystano niedegradowalne polimery poliakrylanowe. Omawiany nanopreparat zawierał sprzężone z N-tiolowanym, β -laktamowym antybiotykiem NPs, otrzymane metodą polimeryzacji emulsji. Badania przesiewowe *in vitro* wykazały aktywność przeciwbakteryjną tego preparatu wobec szczepów MRSA (*Staphylococcus aureus*), a także potwierdziły, że użyta dawka nie była toksyczna względem ludzkich fibroblastów skóry [204]. Ta sama grupa badaczy przeprowadziła

także badania w warunkach *in vivo* emulsji z NPs z PAA skoniugowanych z penicyliną na modelu skóry (badania ścierania) i zaobserwowała przyspieszony proces gojenia się ran o ok. 3-5 dni [205].

6.3.3.2. Nanocząstki z polimerów naturalnych

Polimery syntetyczne, które zostały omówione w poprzednim podrozdziale mogą powodować obniżenie pH w bliskim otoczeniu podczas zachodzącego procesu degradacji polimeru, co w konsekwencji może negatywnie wpłynąć na funkcje komórek, tworząc wysoce kwaśne mikrośrodowisko, ograniczając w ten sposób ich zastosowanie *in vivo* [206]. W celu przezwyciężenia tego problemu większą uwagę zwrócono na wykorzystanie biopolimerów. Naturalnym polimerem, który zyskał zainteresowanie jako nośnik leków, jest albumina. Posiada właściwości dobrego wiązania i zapewnia przedłużone uwalnianie substancji leczniczej. Das i wsp. wykazali w swoich badaniach, że albuminowe NPs zawierające aspirynę charakteryzują się potencjałem terapeutycznym w leczeniu retinopatii cukrzycowej [207]. Metodą desolvatacji wytworzono NPs z żelatynową matrycą zawierające modelowy lek – chlorowodorek pilokarpiny. Badania stopnia uwalniania *in vitro* wykazały, że kinetyka uwalniania chlorowodoru pilokarpiny z żelatynowych NPs była bliska kinetyki zerowego rzędu [208].

6.3.3.2.1. Nanocząstki chitozanowe

Spośród różnych naturalnych nanocząstek polimerowych, nanocząstki na bazie chitozanu (ChNP) są najczęściej stosowane do miejscowego stosowania na skórę [113,193,209,210]. Chitozan, N-deacetylowana pochodna chityny, jest naturalnym biodegradowalnym polimerem kationowym o właściwościach przeciwutleniających, przeciwzapalnych i przeciwdrobnoustrojowych. Te unikatowe właściwości sprawiają, że ten biopolimer jest odpowiednim nośnikiem środków terapeutycznych do leczenia schorzeń dermatologicznych [193]. Ponadto, przy pH fizjologicznym, pierwszorzędowe grupy $-NH_2$ chitozanu są protonowane, a zatem chitozan wykazuje ładunek dodatni i może być wykorzystany do tworzenia NPs w wyniku sieciowania polianionami (np. trifosforanem pentasodu – TPP) do skutecznego kapsułkowania leków naładowanych ujemnie [193]. ChNP zostały scharakteryzowane po raz pierwszy przez Ohya i wsp. w 1994 w kontekście emulgowania i dostarczania do układu krążenia 5-fluorouracylu (leku stosowanego w chemioterapii) [211].

Do zastosowań skórnych były wykorzystywane ChNP z retinolem (pochodną witaminy A). Wykazano, że zamknięcie retinolu w nanocząstkach chitozanowych zmniejszyło działanie drażniące i toksyczność retinolu, dlatego ChNP z retinolem mogą być potencjalnie stosowane w terapii antytrądzikowej oraz w uzyskaniu efektu przeciwmarszczkowego [212]. Inni badacze wykazali, że zamykanie acyklowiru (leku o działaniu przeciwwirusowym) w ChNP sieciowanych TPP (ChNP-TPP) powodowało zwiększenie stabilności tego leku, zmniejszenie jego fotodegradacji a także poprawienie penetracji leku przez skórę prowadzoną na modelu skóry świńskiej [213]. Udowodniono, że ChNP-TPP mogą dostarczać oligonukleotydy i plazmidowy DNA, które mogą być stosowane w miejscowej terapii genowej. Özbaş-Turan i wsp. donieśli, że ChNP zawierające antysensowne oligonukleotydy w zakresie dawek od 15 do 90 μg powodują najbardziej efektywne zahamowanie ekspresji genu $\beta\text{-gal}$ 6 dni po transfekcji u szczurów [214]. W ChNP przy użyciu zmodyfikowanej techniki żelowania jonowego można w udany i powtarzalny sposób wprowadzać leki o charakterze hydrofobowym, np. takrolimus stosowany jako lek immunosupresyjny przy przeszczepach i chorobach o podłożu autoimmunologicznym, tj. łuszczyca (łac. *psoriasis*) i inne. Ponadto stosowanie chitozanowych nanocząstek eliminuje używanie wszelkich niebezpiecznych rozpuszczalników organicznych. Fereig i wsp. udowodnili w swoich badaniach, że ChNP z zamkniętym w nich takrolimusem podawane miejscowo mają wyższą skuteczność leczenia łuszczyca plackowatej niż dostępna komercyjnie maść tarolimus® stosowana powszechnie w leczeniu tego schorzenia [215]. W innym przypadku badano system przezskórnego dostarczania leku składający się z nanocząstek chitozanowych będących nośnikiem hydrokortyzonu. Preparat ten miał przeznaczenie do stosowania w atopowym zapaleniu skóry, które charakteryzuje się przewlekłym stanem zapalnym, intensywnym swędzeniem oraz łuszczącą się suchą skórą. Uwalnianie hydrokortyzonu z ChNP-TPP było znacznie wydłużone w czasie, w związku z czym ten rodzaj nanocząstek został uznany za obiecującego kandydata do przezskórnego dostarczania leku przeciwzapalnego o zwiększonej skuteczności i zmniejszonej toksyczności [216]. Al-Kassas i wsp. wytworzyli transdermalny system dostarczania propranololu, który opierał się na nanocząsteczkach chitozanu zdyspergowanych w żelu. Postać żelowa wykazywała właściwości tiksotropowe z właściwościami wydłużonego uwalniania leku, co potwierdziły badania przenikania przez skórę ucha świni. Ponadto obrazy SEM pokazały, że ChNP z propranololem są wychwytywane przez skórę, co może stanowić rezerwuar leku do dostarczania go przez dłuższy czas w celu stosowania tego

środku leczniczego do kontrolowania ciśnienia krwi [217]. Kurkumina, czyli naturalny żółty związek fenolowy obecny szczególnie w ostrzyżu długim (łac. *Curcuma longa L.*) charakteryzuje się właściwościami farmakologicznymi tj. przeciwzapalnymi, przeciwbakteryjnymi, przeciwutleniającymi, przeciwnowotworowymi i przeciw-cukrzycowymi. Pomimo szerokiego wachlarzu korzystnego działania kurkuminy, nie ma dostępnych preparatów na bazie tego związku, ze względu na to, że jest ona niestabilnym związkiem zwłaszcza w środowisku zasadowym oraz słabo rozpuszcza się w wodzie. ChNP z kurkumina zostały z powodzeniem zsyntetyzowane przez Nair'a i wsp. i następnie ocenione pod kątem uwalniania substancji aktywnej. Zaobserwowano uwalnianie kurkuminy przy pH 5,0 (kinetyka zerowego rzędu), co potwierdziło stosowność tego preparatu do dostarczania przezskórnego. Badania cytotoksyczności wobec linii komórkowej HaCaT (ludzkie keratynocyty) wykazały brak efektu cytotoksycznego i zwiększoną żywotność komórek w obecności ChNP z kurkumina w porównaniu z czystym roztworem kurkuminy a także lepsze przenikanie przez komercyjną błonę Strat-M w badaniach *in vitro* w odniesieniu do kontroli [218]. Inne badanie *in vitro* z udziałem linii komórkowej RAW264.7 (mysie makrofagi) traktowanej LPS wykazało znaczący spadek ekspresji IL-6 i TNF- α (cytokiny obecne w stanie zapalnym) po aplikacji ChNP zawierających kurkumina [219]. Ta i wsp. prowadzili z kolei badania, które potwierdziły brak działania toksycznego ChNP-TPP wobec ludzkich fibroblastów skóry [220]. Ci sami badacze udowodnili, że ChNP w internalizacji do tych komórek i mają zdolność przenikania i dostarczania substancji aktywnych do warstwy skóry właściwej. Wyniki te sugerują, że nanocząsteczki chitozanowe mogą być stosowane jako nieszkodliwe nośniki składników aktywnych w kosmetykach i dostarczaniu leków do skóry [220].

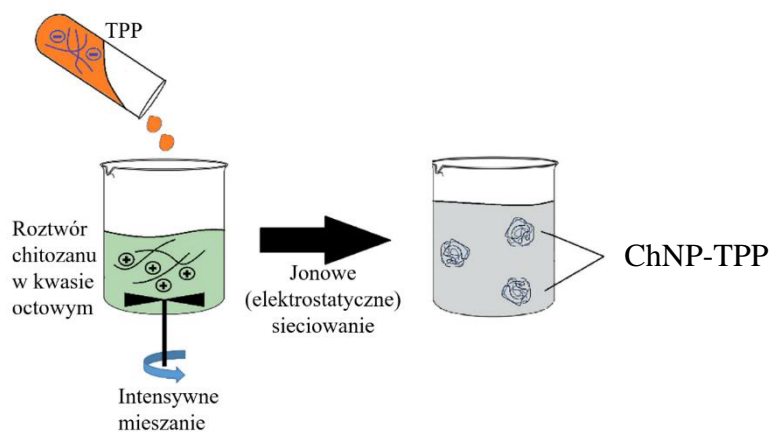
Wielu badaczy skupiło się na właściwościach przeciwbakteryjnych ChNP. Wykazano, że ChNP nie zawierające żadnych substancji aktywnych, stosowane w leczeniu ran, posiadają właściwości przeciwbakteryjne [221-224]. Wang i wsp. udowodnili istotną różnicę w aktywności przeciwbakteryjnej pomiędzy hydrożelem z alginianu wapnia z ChNP a hydrożelem z alginianu wapnia z dodatkiem chitozanu [221]. Hydrożel alginianowy z ChNP miał ponad dwukrotnie większą aktywność przeciwbakteryjną przeciwko G- *Escherichia coli* i około trzykrotnie większą aktywność przeciwko G+ *Staphylococcus aureus* w porównaniu z hydrożelem alginianowym z niemodyfikowanym chitozaniem [221]. Sami i wsp. podobnie wykazali, wyższą aktywność przeciwbakteryjną ChNP przeciwko *S. aureus* niż *E. coli* [222].

7. Metody otrzymywania ChNP

ChNP zostały po raz pierwszy opisane w 1994 roku przez Ohya i wsp. [109, 211] i od tego czasu do syntezy ChNP zastosowano kilka metod. Obecnie dostępnych jest pięć metod: żelowanie jonotropowe, metoda mikroemulsyfikacji, dyfuzja rozpuszczalników emulsyfikacyjnych, kompleks polielektrolitowy i odwrócona metoda micelarna [223-226]. Z tego najczęściej stosowanymi metodami są żelowanie jonotropowe i kompleks polielektrolitowy [109]. Ww. metody są prostymi w wykonaniu metodami i nie stosuje się w nich dużej siły ścinającej ani rozpuszczalników organicznych [226].

7.1. Żelowanie jonowe

Najczęściej opisywaną i jedną z najkorzystniejszych metod otrzymywania nanocząstek chitozanowych jest żelowanie jonowe, które po raz pierwszy zostało opisane w 1997 przez Calvo i wsp. [227]. Metoda ta opiera się na sieciowaniu jonowym, które zachodzi w obecności przeciwnie naładowanych grup. Polikationowy chitozan jest rozpuszczany w wodnym roztworze kwasu (np. roztworze kwasu octowego), do którego następnie przy intensywnym mieszaniu jest dodawany ujemnie naładowany jonowy środek sieciujący, zazwyczaj trifosforan pentasodu (TPP). W celu indukowania tworzenia nanocząstek w wyniku oddziaływań elektrostatycznych [227,228]. Rys. 14 przedstawia oddziaływanie elektrostatyczne między chitozaniem i TPP, które ostatecznie prowadzi do powstania ChNP.



Rys. 14 Schemat otrzymywania ChNP metoda żelowania jonowego [229]

Zaletą metody żelowania jonowego jest to, że nie używa się w niej szkodliwych środków sieciujących ani rozpuszczalników organicznych. Oprócz tego proces można prowadzić w temperaturze pokojowej, a finalna wielkość nanocząstek można być regulowana przez zmianę stosunku chitozan/TPP, co jest kluczowe i bezpośrednio

wpływa na skuteczność enkapsulacji i późniejsze dostarczanie leku do miejsca docelowego [230,231].

7.2. Metoda uzyskiwania kompleksów polielektrolitowych

Metoda kompleksów polielektrolitowych (PEC) jest również nieskomplikowaną metodą, w której oddziaływania (o charakterze elektrostatycznym, hydrofobowym lub związanym z wiązaniami wodorowymi i/lub siłami van der Waalsa) między polikationem (chitozan), a cząsteczką polianionową tworzą kompleksy polielektrolitu jednocześnie neutralizując ładunek pomiędzy obiema cząsteczkami i prowadząc do spadku hydrofilowości [225,232,233]. Do kompleksów polielektrolitowych należą nanocząstki uzyskane w wyniku samoorganizacji polikationowego chitozanu z np. alginianem, siarczanem chondroityny, hialuronianem, siarczanem dekstranu i karboksymetylocelulozą [234-236]. Innymi polimerami posiadającymi zdolność do tworzenia PEC z chitozanem jest żelatyna i polietylenoimina [225]. NPs uzyskane w wyniku samoorganizacji są przeznaczone do enkapsulacji leków hydrofilowych i lipofilowych, co pozwala na zachowanie stabilności substancji aktywnej w biokompatybilnej matrycy [229]. Wielkości kompleksów mogą mieścić się z zakresie od 50 nm do 700 nm [225].

7.3. Metody mikroemulsyfikacji

ChNP uzyskane techniką mikroemulsyfikacji zostały po raz pierwszy opracowane i opisane przez Maitra i wsp. w 1999 roku [225]. W przeciwieństwie do metod żelowania jonowego i PEC, metoda mikroemulsji wymaga użycia rozpuszczalnika organicznego np. n-heksanu lub toluenu [224]. Emulsja składająca się z wodnego kwasowego roztworu chitozanu i fazy olejowej jest wytwarzana przy użyciu surfaktanta jako stabilizatora, rozpuszczalnika organicznego i aldehydu glutarowego jako sieciowacza. Fazy są poddawane intensywnemu mieszaniu, a po usieciowaniu powstają „kropelki” stanowiące podstawę nanocząstek. Rozpuszczalnik organiczny jest następnie usuwany przez odparowanie pod niskim ciśnieniem. Dodatek chlorku wapnia i odwirowanie pozwala usunąć nadmiar środka powierzchniowo czynnego poprzez strącanie. Końcową zawiesinę ChNP poddaje się dializie przed procesem suszenia sublimacyjnego [237-239]. Ta technika pozwala na otrzymanie ChNP o wielkości poniżej 100 nm, a rozmiary cząstek można jeszcze dodatkowo kontrolować poprzez zmianę ilości dodawanego aldehydu glutarowego, zmieniającego stopień usieciowania. Niemniej jednak pewne wady tej metody tj. zastosowanie rozpuszczalnika organicznego, toksyczność aldehydu

glutarowego oraz długotrwały proces przygotowania i złożoność etapu mycia przemawiają na niekorzyść tej metody [225].

7.4. Metoda wytrącania

Metoda ta wykorzystuje rozpuszczalność chitozanu (w postaci soli) przy różnych wartościach pH i należy do grupy metod raczej prostych do wykonania. Na wstępie chitozan rozpuszcza się w kwaśnym roztworze o niskim pH, takim jak kwas octowy czy kwas mlekowy. W kolejnym kroku roztwór chitozanu powoli kroplami jest dodawany do alkalicznego roztworu o pH 8,5–9,0 przy ciągłym szybkim mieszaniu, co powoduje jego wytrącenie i powstawanie nanocząstek [240]. NPs można odseparować poprzez odwirowanie i usunięcie nadsącza i następnie dalszym analizowaniu w jako zawiesinę w środowisku wodnym [224]. Wykazano, że ta metoda wytwarzania nanocząstek ma zarówno zastosowanie dla roztworów chitozanu oraz kopolimerów chitozanowych z nanocząstkami magnetycznymi powlekanymi chitozanem [241,242].

8. Charakterystyka fizykochemiczna NPs

Nanonośniki (w tym m.in. NPs) należą do jednych z najlepiej przebadanych transdermalnych systemów dostarczania różnych substancji aktywnych w tym również leków [142,243,244]. Polimerowe NPs są najlepiej przebadanymi nośnikami stosowanymi w dostarczaniu leków, ponieważ charakteryzują się lepszą biodostępnością a także wydajnością enkapsulacji. Oprócz ww. cech skutecznie dostarczają dawkę terapeutyczną, zmniejszając do minimum występowanie różnych skutków ubocznych [243,245]. Materiały polimerowe służące jako matryce dla substancji aktywnych muszą wykazywać określone cechy m.in. powinny być nietoksyczne, biokompatybilne oraz biodegradowalne [141].

Nanocząstki jako systemy dostarczania substancji aktywnych można scharakteryzować pod kątem właściwości fizykochemicznych takich jak m.in. średnia wielkość cząstek, wskaźnik polidispersyjności, potencjał zeta, morfologia, struktura molekularna [247,248].

8.1. Morfologia – badanie z użyciem techniki mikroskopii elektronowej (SEM/TEM)

Kształt, wielkość oraz strukturę powierzchni NPs określa się stosując technikę obrazowania przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) lub transmisyjnej mikroskopii elektronowej [248-250].

8.2. Wielkość cząstek i potencjał Zeta (potencjał ζ)

W celu określenia wielkości uzyskanych nanocząstek (w zakresie od 40 nm do 2 mm) przeprowadza się analizę dyfrakcji laserowej przy użyciu Zeta Sizer. Preparaty do przeprowadzenia tej analizy rozcieńcza się w ultraczystej wodzie. Natomiast potencjał ζ (charakterystykę elektryczną cząstek) jest określany metodą elektroforetycznego rozpraszania światła przy użyciu tej samej aparatury [247,249-251].

8.3. Wydajność enkapsulacji (EE%) – wyznaczenie zawartości związanej substancji aktywnej

Po syntezie frakcja zawierająca nanocząstki jest odseparowywana poprzez odwirowanie i oddzielenie supernatantu. Przy użyciu techniki spektrofotometrii UV-VIS mierzy się zawartość ekstraktu w roztworze wyjściowym oraz w supernatancie poprzez określenie wartości absorbancji dla charakterystycznego piku (w zakresie długości 257-270 nm, pik charakterystyczny dla rutyny [252]) i przeliczeniu na stężenia na podstawie wyznaczonej krzywej kalibracyjnej. Wydajność procesu zamykania substancji aktywnej w nanocząstkach określono wzorem:

$$EE\% = \frac{[C]_i - [C]_f}{[C]_i} \times 100\% \quad (4)$$

gdzie $[C]_i$ jest wyjściowym a $[C]_f$ końcowym stężeniem w nadsączu substancji aktywnej w roztworze wodnym. Każdą próbkę testowano w trzech powtórzeniach [250,251].

Türkoğlu i wsp. oparli się o analizę spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) aby określić wydajność procesu enkapsulacji wraz ze zmianami w widmie podczerwieni. Pomiar wykonano w zakresie długości fal 4000-400 cm^{-1} [253].

Wydajność procesu enkapsulacji oblicza się również na podstawie stosunku masy praktycznej do masy teoretycznej [253].

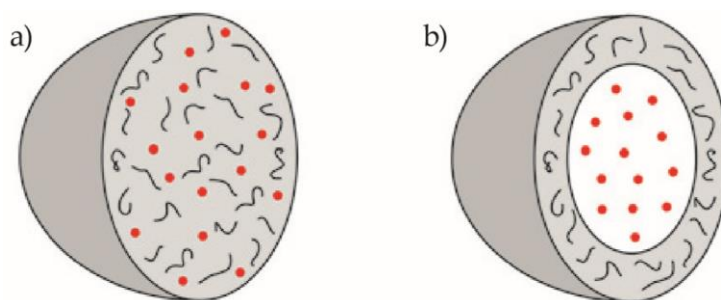
8.4. Badanie uwalniania *in vitro*

Profile uwalniania substancji aktywnej z nanokapsulek można wyznaczyć za pomocą metody z użyciem rękawa dializacyjnego, np. z regenerowanej celulozy. Uwalnianie leku można badać do medium badawczego, którym może być np. woda, 10% roztwór alkoholu etylowego, sól fizjologiczna i inne [252,254]. Stężenie wolnego leku wyznaczono metodą

worka dializacyjnego. W tym badaniu przetestowano 10 różnych mediów uwalniających. Wodny roztwór 10% etanolu (v/v) wykazał się najlepszymi parametrami zarówno pod względem stężenia nasycenia leku, jak i utrzymania stanu zlewu. W membranie celulozowej umieszcza się określoną ilość (np. 1 ml próbki w postaci zawiesiny i następnie szczelnie zamknięty worek dializacyjny umieszcza się w kolbie z 100 ml medium badawczego. Układ utrzymuje się w warunkach stałego i powolnego mieszania w łaźni wodnej w temperaturze $32\pm 0,5^{\circ}\text{C}$). W ustalonych odstępach czasu pobierano 1 ml medium, do którego uwalniała się substancja aktywna i w jego miejsce dodawano i świeże medium. Pobrane próbki były analizowane pod kątem zawartości uwolnionej substancji aktywnej za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) [254].

9. Technologia mikrokapsułkowania

Mikrokapsułkowanie jest obecnie jedną z dynamicznie rozwijających się technologii polegających na immobilizacji tj. powlekanii lub zamykaniu niewielkiej ilości substancji aktywnej (rdzenia, jądra, układu substancji) przez inny materiał lub układ materiałów o innych właściwościach fizykochemicznych. Proces ten zachodzi poprzez powlekanie cienką warstwą półprzepuszczalnego filmu polimerowego prowadząc do powstawania pojedynczych kapsułek – produktu kompozytowego lub przez ulokowanie substancji aktywnej w matrycy polimeru w wyniku okluzji i/lub adsorpcji. Pierwsze doniesienia o procesie mikrokapsułkowania i jego praktycznym aspekcie pojawiły się w latach trzydziestych XX wieku [255]. Pod względem budowy mikrocząstki są podzielone na 4 główne grupy: mikrokapsułki o kształcie regularnym lub nieregularnym, mikrokapsułki wielowarstwowe (z co najmniej dwoma warstwami opłaszczającymi) oraz mikrosfery. Mikrosfery stanowią małe, monolityczne, jednofazowe i porowate cząstki polimerowe w kształcie kulek, które wykazują równomierne w całej swojej objętości zżelowanie stanowiące membranę dla substancji aktywnej (substancja aktywna jest rozpuszczona bądź zawieszona w matrycy polimeru). Porównanie struktury mikrokapsuły i mikrosfery przedstawiono na Rys. 15.



Rys. 15 a) Mikrosfera polimerowa, b) mikrokapsułka polimerowa (zaadaptowano z [259])

Poprawienie parametrów mechanicznych mikrosfer może nastąpić w wyniku formowania dodatkowej membrany zewnętrznej z polimerów zdolnych do tworzenia trwałych wiązań kowalencyjnych i/lub jonowych. Mikrokapsułki natomiast stanowią dwufazowe układy zawierające hydrożelowy, płynny lub gazowy rdzeń oraz zewnętrzną, porowatą i półprzepuszczalną membranę. Najmniej skomplikowaną formę stanowią mikrokapsułki, które przypominają swoją strukturą jajo kurcze, gdzie substancja czynna otoczona jest jednakowej grubości, jednowarstwową ścianą lub błoną. Natomiast odnośnie kapsulek wielowarstwowych to mają one koncentrycznie położony rdzeń pokryty kilkoma warstwami tego samego bądź różnych polimerów. Jest to najczęściej celowy zabieg, który jest związany z kontrolowanym uwalnianiem substancji aktywnej rdzenia. Jeśli rozmiary kapsulek nie przekraczają 5000 μm , to są one sklasyfikowane jako mikrokapsułki, a proces ich otrzymywania jest nazwany mikrokapsułkowaniem [258-261]. Proces mikroenkapsulacji pozwala na zwiększenie selektywności, daje możliwość koimmobilizacji kilku substancji jednocześnie a także kontrolowanego sposobu łączenia się z substratem [262]. Izolacja substancji aktywnych od środowiska zewnętrznego zwiększa ich odporność na działanie szkodliwych czynników, zapewnia im własne stabilne mikrośrodowisko i pozwala zachować formę niezmienną, uniknąć flokulacji, samoagregacji oraz dezaktywacji zwłaszcza w przypadku substancji lotnych i nietrwałych. Podczas procesu wytwarzania mikrokapsułów i magazynowania na substancje aktywne może działać szereg niekorzystnych czynników m.in. temperatura, pH, obecność aktywatorów/inhibitorów zmieniających pożądane cechy produktu. Immobilizacja poprzez otaczanie substancji aktywnych półprzepuszczalną polimerową matrycą okrywającą jest jedną z technik stabilizacji i wydłużania trwałości biomateriałów i jednocześnie cechuje się prostotą, bezpieczeństwem oraz małymi nakładami finansowymi [262,273]. Mikrokapsułki mają szerokie zastosowanie w przemyśle perfumeryjnym, kosmetycznym, spożywczym, fotograficznym, papierniczym, farmaceutycznym, tekstylnym oraz w budownictwie, medycynie i rolnictwie.

9.1. Techniki mikrokapsułkowania

Jest znanych wiele metod otrzymywania mikrokapsuł oraz mikrosfer. Wybór jednej z technologii ich uzyskiwania nie jest prostym zadaniem, ponieważ techniki mikroenkapsulacji są dobrymi przykładami multidyscyplinarnego wykorzystania wiedzy teoretycznej i praktycznej z zakresu nauk takich jak: chemia materiałów (polimerów naturalnych lub syntetycznych), chemia leków, biochemia związków aktywnych (spożywczych i/lub biologicznych), a także inżynieria procesów oraz specjalistyczne metody analizy jakości wykorzystanych surowców i otrzymanych produktów w tym procesie. Wybór metody zależy również od m.in. wielkości mikrocząstek, ich przeznaczenia a także od właściwości fizyko-chemicznych substancji otaczanej oraz matrycy polimeru. Technologie, które spełniają swoje zadanie tj. umożliwiają uzyskanie mikrocząstek o ściśle określonych właściwościach muszą spełniać następujące kryteria:

- zdolność zamykania rdzenia substancji aktywnej o wysokim stężeniu w matrycy mikrokapsułki,
- stabilność uzyskanego produktu po syntezie w trakcie całego dedykowanego okresu przechowywania,
- możliwość regulacji rozmiaru mikrokapsulek oraz zdolności dyspersji w środowisku wodnym lub innym,
- możliwość kontrolowanego uwalniania substancji aktywnej przez określony czas,
- zdolność do biodegradacji,
- podatność na różnego rodzaju modyfikacje chemiczne [256,261].

Do najczęściej stosowanych metod otrzymywania mikrokapsuł i mikrosfer należą metody emulsyjne, metody z wykorzystaniem ekstruzji, suszenie rozpyłowe, powlekanie w warstwie fluidalnej, powlekanie w bębnie drażerskim, topliwa dyspersja, polimeryzacja międzyfazowa oraz koacerwacja w środowisku wodnym lub bezwodnym [258].

9.1.1. Metody emulsyjne

Metody emulsyjne należą do najczęściej używanych metod do uzyskania mikrocząstek na skalę laboratoryjną. Emulsjami są nazywane ciekłe układy zdyspergowane, w których jedna lub więcej faz ciekłych jest zdyspergowana w fazie ciągłej, podczas gdy te fazy są względem siebie nierozpuszczalne. Mają bardzo rozwiniętą powierzchnię międzyfazową, są termodynamicznie nietrwałe i łatwo ulegające destabilizacji i rozwarstwieniu. Emulsja stanowi rodzaj układu dyspersyjnego,

gdzie cząstki fazy stanowiącej mniejszość układu (wewnętrznej lub fazy zdyspergowanej lub rozproszonej) są rozproszone w fazie zewnętrznej - dyspergującej lub rozpraszającej, która stanowi większość układu w wyniku mieszania obu faz [262]. Należą do układów, które dążą do stanu o jak najniższej entropii. Aby zachować stan rozproszenia konieczne jest dodanie związków stabilizujących tzw. surfaktantów lub inaczej związków powierzchniowo czynnych, które gromadząc się na granicy faz wpływają na obniżenie energii swobodnej i napięcia międzyfazowego ułatwiając tym samym powstanie emulsji. Otrzymany układ zdyspergowany w dużej mierze zależy od metody emulsyfikacji oraz wyboru środka powierzchniowo czynnego a także parametrów fizykochemicznych i stosunku objętościowego faz wchodzących w skład emulsji. Można wyróżnić następujące emulsje w zależności od układu faz ją tworzących:

- emulsja olej w wodzie (w skrócie O/W) - cząstki fazy olejowej w tym układzie stanowią mniejszą część i są rozproszone w zewnętrznej fazie wodnej,
- emulsja woda w oleju (w skrócie W/O) – w tym układzie woda jest fazą stanowiącą mniejszość i jej cząstki są zdyspergowane w zewnętrznej fazie olejowej,
- emulsja wielofazowa (emulsja podwójna) – stanowi układ dyspersyjny, gdzie faza rozpraszająca emulsji jest dodatkowo rozproszona w kroplach fazy rozproszonej emulsji. Jako przykład emulsji wielofazowej można podać emulsję O/W/O - cząstki fazy olejowej są rozproszone w fazie wodnej tworzące krople, które są ponadto rozproszone w zewnętrznej fazie olejowej. Kolejnym przykładem emulsji wielofazowej jest emulsja W/O/W (faza wodna rozproszona w oleju, zdyspergowanego dodatkowo w wodzie).

Bardzo dużą zaletą układów wielofazowych jest możliwość kapsułkowania i ochrony nietrwałych substancji aktywnych w rdzeniu cząstek fazy rozproszonej emulsji [262]. W przypadku stosowania emulgatorów charakteryzujących się wysoką rozpuszczalnością w wodnej fazie w trakcie emulsyfikacji otrzymany zostanie układ, gdzie fazą ciągłą jest faza wodna. Natomiast, jeśli środek powierzchniowo czynny wykazuje większą rozpuszczalność w fazie organicznej, to ta faza będzie stanowiła zewnętrzną fazę ciągłą. Dobór odpowiedniego emulgatora jest konieczny w celu wytworzenia konkretnego typu emulsji. Aby odpowiednio dobrać właściwy środek powierzchniowo czynny należy posłużyć się wprowadzoną przez Griffina stałą równowagi hydrofilowo-lipofilowej (z ang. HLB - *Hydrophilic-Lipofilic Balance*) określającą polarność związku. Wartość stałej HLB jest zawarta w przedziale od 0 do 20 (im wyższa wartość stałej równowagi HLB, tym większy jest udział części hydrofilowej). Związki polarne, które charakteryzują się wysoką wartością HLB mają zastosowanie do wytwarzania emulsji

typu faza organiczna w wodzie. Natomiast w przypadku substancji o niskiej wartości HLB są uzyskiwane emulsje typu woda w fazie organicznej [263,264]. Wśród metod emulsyjnych można wyróżnić metody polegające na odparowaniu rozpuszczalnika, jego rozcieńczeniu, ekstrakcji czy polimeryzacji powstałej emulsji. Aby otrzymać układ emulsyjny można również wykorzystać proces homogenizacji oraz ultradźwięki. W przypadku homogenizacji wysokociśnieniowej istnieją dwie formy tej metody: na gorąco i na zimno. Wariant zimny umożliwia kapsułkowanie termolabilnych substancji aktywnych a także zapobiega powstawaniu problemów związanych np. z krystalizacją lipidów. Ponadto w wariacie zimnym otrzymuje się cząstki o większym wymiarowym rozrzucie w porównaniu do wariantu gorącego [258]. Po wytworzeniu różnych wariantów emulsji, każda z nich powinna zostać przebadana pod kątem parametrów fizykochemicznych tj. określenie pH, lepkości oraz stabilności preparatu emulsyjnego (znane są metody: wirówkowa, z wykorzystaniem komór klimatycznych oraz z wykorzystaniem techniki wielokrotnego rozpraszania światła) [258].

9.1.2. Suszenie rozpyłowe

Jedną z najstarszych metod mikrokapsułkowania, najlepiej poznaną i zarazem najczęściej stosowaną jest suszenie rozpyłowe. Rozwój tej techniki rozpoczął się na początku lat siedemdziesiątych XIX wieku, jednak na szeroką skalę proces suszenia rozpyłowego rozwinął się w drugiej dekadzie XX wieku [265]. Suszenie rozpyłowe inaczej nazywając suszenie rozpryskowe jest jedną z najważniejszych technik w przetwórstwie prowadzących do otrzymania z wyjściowego płynnego surowca produktu końcowego, który ma formę proszku. Prawie cała produkcja kawy rozpuszczalnej, mleka w proszku czy proszków do prania oraz stosowanych w przemyśle ceramicznym jest wytwarzana przez zastosowanie tej techniki. Ponadto w wyniku suszenia rozpyłowego jest otrzymywana cała gama produktów od dodatków do żywności – aromatów i olejków, napojów instant po mikroorganizmy, drożdże i produkty biosyntezy tj. enzymy [265-267]. Tak szerokie zastosowanie tej metody wynika z wielu jej zalet, z których najważniejsze to: zużycie małych ilości energii, prosta konstrukcja aparatury a także niedługi czas przebywania docelowego produktu w wysokiej temperaturze. Technika suszenia rozpyłowego polega na emulgowaniu substancji aktywnej w roztworze substancji powlekającej i rozpyleniu powstałej dyspersji w gorącej komorze suszarki rozpyłowej [265,267]. Najczęściej dyspersja zostaje przygotowana przez mieszanie substancji aktywnej rdzenia z roztworem polimeru i jeśli jest to konieczne dodaje się środka powierzchniowo czynnego, który ułatwia proces

dyspergowania [255]. Następnie powstała ciecz w wyniku doprowadzenia do dysz dozujących jest rozdrabniania do kropelek o średnicy 10-300 μm tworzących mgłę, która wewnątrz zamkniętej przestrzeni suszarki rozpyłowej kontaktuje się z czynnikiem suszącym [265]. Obecnie stosuje się suszenie rozpyłowe, w którym na strumień rozpylonego medium oddziałuje się następującymi czynnikami nasilającymi odparowanie rozpuszczalnika z roztworu – najczęściej są to gorące gazy, mikrofałe lub promienniki podczerwieni. Kluczowym parametrem w tej technice decydującym o jakości mikrokapsulek jest temperatura. Mimo jej stosunkowo wysokiej wartości podczas procesu suszenia rozpyłowego można kapsułkować substancje aromatyczne, złożone z dość lotnych alkoholi, aldehydów, ketonów, estrów i eterów. Jest to możliwe, ponieważ matryca z polarnych polimerów, np. polisacharydów jest w małym stopniu przepuszczalna wobec niepolarnych składników olejków aromatycznych, które wykazują niską zdolność dyfuzji przez hydrofilową otoczkę. W następstwie gwałtownego odparowania wody lub innego rozpuszczalnika wokół cząstek rdzenia tworzą się otoczki z materiału powlekającego. W trakcie suszenia najszybciej odparowuje woda z zewnętrznej powierzchni rozpylonych kropelek a stopień retencji aktywnych substancji w bardzo dużym stopniu jest zależny od wilgotności mikrokapsulek i stosowanego przy mikrokapsułkowaniu powietrza a także od masy molowej i stężenia polimeru, stopnia zdyspergowania materiału rdzenia i wielkości rozpylonych mikrokropelek [255,267]. W rezultacie suszenia rozpyłowego są otrzymywane mikrokapsułki niejednolite o rozmiarze ok. 100 μm , zawierające nawet do 50% olejku aromatycznego, mające bardzo porowatą strukturę matrycy i wykazujące dość dobrą rozpuszczalność w wodzie. Kontrolowane i stopniowe uwalnianie zamkniętej w kapsułce substancji aktywnej można uzyskać przez dodatkowe uszlachetnianie, np. mikrokapsułki, w których matrycą jest guma arabska zyskują zmniejszenie jej porowatości i w konsekwencji zmniejszenie strat rdzenia kapsułki podczas powleczenia stopionym tłuszczem w procesie chłodzenia rozpyłowego [255].

9.1.3. Powlekanie w warstwie fluidalnej

Kolejną techniką otrzymywania mikrocząstek na skalę przemysłową jest powlekanie w warstwie fluidalnej. Odpowiednia cyrkulacja rdzeni substancji aktywnej za pomocą ciepłego powietrza wokół dyszy rozpylającej polimerową mieszaninę powlekającą zapewnia prawidłowy przebieg tego procesu. Jednym z układów jest ustawienie dyszy natryskowej w tzw. układzie Würstera, gdzie dysza rozpyła polimer współprądowo do

cyrkulacji rdzeni. Innym układem jest ten, w którym dysza jest usytuowana w szczycie komory w kierunku przeciwnym do cyrkulacji rdzeni z substancją aktywną. Istnieje także możliwość z ustawieniem dyszy stycznie do ściany komory i uzyskanie tzw. natryskiwania bocznego. Skuteczność i wydajność procesu powlekania przy ułożeniu dyszy na dnie komory lub stycznie do jej ściany jest bardzo wysoka i sięga nawet 95%. Szybkość przepływającego ciepłego powietrza w tej metodzie jest regulowana przez średnicę otworów tarczy, która rozprowadza powietrze. W celu szybkiego wyschnięcia warstwy powlekającej ilość наносzonej mieszaniny polimerowej jest również regulowana. Szybkość suszenia powłoki polimerowej ustala i reguluje się temperaturą i wilgotnością zasysanego powietrza. W procesie powlekania rdzeni z substancją aktywną metodą w warstwie fluidalnej powinny być kontrolowane i monitorowane wymienione parametry krytyczne: szybkość podawania polimerowej mieszaniny powlekającej, ciśnienie powietrza w dyszy, temperatura, szybkość przepływu, wilgotność podawanego powietrza oraz temperatura powietrza wylotowego [271].

9.1.4. Powlekanie w bębnie drażerskim

Powlekanie w bębnie drażerskim jest jedną z kluczowych metod nanoszenia otoczki głównie polisacharydowej na rdzenie z substancją aktywną, stosowaną przede wszystkim w przemyśle farmaceutycznym od dłuższego czasu. Ta technika jest ciągle udoskonalana, szczególnie w celu zautomatyzowania procesu [268,269]. Komora bębna obraca się poruszając złożę powstałych tabletek w górę, a potem w wyniku obrotu spadają one w dół, przez co mieszanina powlekająca ma bardzo dobry kontakt z rdzeniami i potem następuje szybkie, ale również nierównomierne suszenie. Są stosowane różne rozmiarowo bębny drażerskie m.in. stosowane w laboratorium (bardzo małe o pojemności 1–2 kg) a także duże bębny stosowane na skalę przemysłową – o pojemności od 50 do 750 kg substancji aktywnej zamkniętej w rdzeniach. W tej technologii powlekania można wyróżnić następujące etapy: natryskiwanie lub polewanie zawiesiny polisacharydowej na rdzenie a następnie suszenie i odparowanie rozpuszczalnika [268]. W przemyśle farmaceutycznym do produkcji układów rdzeni powleczonych otoczkami polimerowymi są stosowane dwie podstawowe techniki: powlekanie w obrotowym bębnie perforowanym oraz powlekanie w warstwie fluidalnej. Jeżeli średnica rdzeni wypełnionych substancją aktywną przeznaczonych do powlekania jest mniejsza niż 0,5 cm to proces ten prowadzi się w warstwie fluidalnej [268,269].

9.1.5. Proces koacerwacji

Proces koacerwacji jest typowym zjawiskiem, które można zaobserwować w roztworach koloidalnych. Cząstki rozproszone oddzielają się z roztworu a następnie aglomerują w oddzielną ciekłą fazę nazwaną koacerwatem. Inicjacja procesu koacerwacji może nastąpić na kilka różnych sposobów, np. w wyniku zmiany temperatury, pH lub dodatku wodnego roztworu soli o wysokim stężeniu. Koacerwacja jest złożona najczęściej z trzech etapów. Pierwszy etap obejmuje utworzenie trzech niemieszających się faz: fazy rdzenia substancji aktywnej, fazy materiału powłokowego oraz fazy, gdzie znajdują się obie wymienione substancje – służy jako rozpuszczalnik dla roztworu polimeru. Drugim krokiem jest osadzanie fazy roztworu opłaszczającego kapsułkę na materiale substancji aktywnej tworzącej rdzeń. Kolejny i zarazem ostatni etap obejmuje stabilizację, czyli utwardzenie materiału powłokowego. Utwardzenie powłoki może się odbywać na kilka sposobów m.in. na drodze termicznej, poprzez sieciowanie lub desolwatację [261,268]. Przy procesie koacerwacji złożonej są używane dwa lub więcej polimerów. Ten proces jest związany ze zdolnością wzajemnego oddziaływania w wodzie polimerów kationowych i anionowych do utworzenia ciekłej fazy bogatej w polimery, nazwanej koacerwatem złożonym. Różne polimery, rozpuszczalne w wodzie, zarówno te naturalne jak i syntetyczne reagują z żelatyną i tworzą złożone koacerwaty gotowe do przeprowadzenia procesu kapsułkowania występujące w równowadze z transparentną cieczą na powierzchni roztworu [268,270]. Mimo różnorodnych nośników stosowanych w tej metodzie istnieją ograniczenia związane z rozpuszczalnością użytych składników (w określonym zakresie pH), zwłaszcza w przypadku złożonych układów. Przykładowo, najlepiej zbadanym złożonym układem koacerwacyjnym jest układ żelatyna – guma arabska. Proces koacerwacji takiego układu jest możliwy wtedy, gdy wartości pH są poniżej punktu izoelektrycznego żelatyny. Przy tych wartościach pH, żelatyna ma ładunek dodatni a guma arabska pozostaje wciąż ujemnie naładowana [258,265]. Wodną zawiesinę żelatyny o stężeniu 10% ogrzewa się do temperatury ok. 50°C nieustannie mieszając. W kolejnym kroku dodaje się roztworu siarczanu (VI) sodu lub etanolu (o stężeniu 20%), po to, aby jego udział mieścił się w granicy 50–60% całkowitej końcowej objętości, w celu inicjacji koacerwacji. Układ ten jest chłodzony w temperaturze do 40°C, po czym konieczne należy dodać odczynnik sieciującego (np. aldehyd glutarowy) i odpowiednio dostosować pH. Następnie uzyskane mikrokapsułki się przemywa i suszy [261,268,270].

9.1.6. Formowanie mikrosferowych form hydrożelowych w wyniku kontrolowanego procesu tworzenia kompleksów polielektrolitowych (KPE)

Jedną z dobrze znanych i szczególnie obiecujących metod enkapsulacji jest formowanie mikrosferowych form hydrożelowych w wyniku kontrolowanego procesu tworzenia kompleksów polielektrolitowych (KPE). Te kompleksy powstają albo w całej objętości roztworu polielektrolitu przez oddziaływania anionowych grup z kationami metali wielowartościowych, albo w wyniku reakcji na granicy stykających się wodnych roztworów polielektrolitów, w których są zawarte dodatnio i ujemnie naładowane grupy funkcyjne. Dobrze znanym przykładem kompleksów KPE są hydrożelowe mikrocząstki uzyskiwane w wyniku procesu sieciowania soli sodowej kwasu alginowego jonami Ca^{2+} . Mikrosfery otrzymane tą metodą wykazują niedużą stabilność mechaniczną szczególnie w trakcie długiego czasu ich przechowywania w roztworach buforowych. Można zaobserwować dezintegrację takich kapsuł przez zachodzące stopniowo procesy wymiany dwuwartościowych kationów wapniowych (z kompleksu KPE) na jednowartościowe kationy sodowe i potasowe zawarte w buforze. W celu poprawienia właściwości mechanicznych oraz znacznego zmniejszenia mikrokapsuł opracowano szereg procedur, w wyniku których otrzymuje się struktury wykorzystujące np. modyfikacje powierzchniowe hydrożelowych otoczek kationowymi biopolimerami lub z zastosowaniem systemów wieloskładnikowych [258]. Mikrocząstki, w których matryca zbudowana jest z naturalnych polimerów np. chitozan, alginian czy albumina można uzyskać w wyniku sieciowania (czyli żelowania lub polimeryzacji). Można wyróżnić sieciowanie zewnętrzne, w którym czynnik sieciujący dodaje się w etapie końcowym eksperymentu albo żelowanie wewnętrzne, gdzie wykorzystuje się nierozpuszczalne kryształki CaCO_3 uwalniające jony Ca^{2+} (stanowią czynnik sieciujący) przy zmianie pH z 7 do 6,5 [271]. W odniesieniu do pierwszego omawianego sposobu żelowanie wewnętrzne chroni lepiej zamkniętą substancję aktywną, minimalizuje ilość czynnika sieciującego niezbędnego do uformowania twardych mikrosfer oraz zapobiega agregacji utworzonych mikrocząstek. Minusem jest fakt, że w metodzie tej w chwili wytwarzania mikrokapsuł zamykana substancja czynna może nadmiernie „uciekać” [271,272]. Przykładowymi czynnikami sieciującymi są: związki chemiczne, np. aldehyd glutarowy, genipina (naturalna, biogodna substancja), temperatura a także związki, które mają charakter jonowy np. trifosforan, tetrafosforan, siarczan (VI) sodu, chlorek wapnia, laurylosiarczan czy molibdenian [273-276]. Ta technika polega na wkropleniu roztworu

polimeru (m.in. roztworu alginianu) z dodatkiem substancji aktywnej, która jest zawieszona lub rozpuszczona, do naczynia zawierającego środek sieciujący (np. jony wapnia). W tym procesie podobnie jak podczas metody ekstruzyjnej środowisko wodne niesie ze sobą pewne niedogodności. Może prowadzić to do powstania m.in. nieregularnych mikrosfer o dość dużych rozmiarach, a także do dużych strat substancji leczniczej o charakterze hydrofilowym [276]. Bardziej rozpowszechnioną w użyciu techniką jest metoda emulsyjno-sieciująca, gdzie zewnętrzna faza olejowa zapobiega nadmiernej dyfuzji substancji aktywnej a wielkość mikrocząstek można kontrolować szybkością obrotów mieszadła [263,271-273].

9.1.7. Polimeryzacja międzyfazowa i polimeryzacja *in situ*

Inną dobrze znaną metodą tworzenia kapsułek zaliczaną do metod chemicznych jest polimeryzacja międzyfazowa. W tym procesie dwa reaktanty spotykając się na powierzchni międzyfazowej reagują ze sobą bardzo gwałtownie. W metodzie polimeryzacji międzyfazowej podstawą jest klasyczna reakcja Schotten–Baumanna tj. reakcja pomiędzy chlorkiem kwasowym (lub innym rozpuszczalnym w użytym rozpuszczalniku reagentem, np. izocyjanian), a związkami, które mają aktywny wodór tj. aminy, alkohole, poliestry, polimoczniki, poliuretany [270]. W odpowiednich warunkach na powierzchni międzyfazowej zachodzi w bardzo szybkim tempie polimeryzacja, w wyniku czego tworzy się cienka, elastyczna powłoka polimeru, która tworzy otoczkę kapsułki. Najczęściej w taki sposób immobilizuje się labilne materiały biologiczne, m. in. enzymy, białka [277,278]. Techniką zbliżoną do polimeryzacji międzyfazowej jest polimeryzacja *in situ*. Powstawanie powłoki kapsułki następuje w wyniku polimeryzacji monomeru dodawanego do reaktora, a ten proces zachodzi w fazie ciągłej. Podczas polimeryzacji *in situ* do substancji aktywnej rdzenia kapsułek nie dodaje się żadnych środków aktywujących. Na wstępie tworzy się prepolimer o niedużej masie molowej, która w wyniku upływu czasu zwiększa swoje rozmiary poprzez odkładanie się na powierzchni rozproszonego materiału rdzeniowego i tworzenie stałej otoczki w kapsułce. Polimeryzację *in situ* stosuje się do kapsułkowania np. cieczy, które nie mieszają się z wodą i są zamykane w otoczkach utworzonych w wyniku np. reakcji mocznika (pH kwaśne) z formaldehydem w środowisku wodnym [270,279].

9.1.8. Metoda ekstruzji

W metodzie ekstruzji mikrocząstki są wytwarzane w wyniku przeciskania (przez, np. igłę o określonej średnicy wylotu) roztworu polimeru z zawieszoną w nim substancją aktywną, bezpośrednio do cieczy sieciującej. Ekstruzja ze względu na dość łagodne warunki przeprowadzania procesu np. niestosowanie lotnych rozpuszczalników, niska temperatura procesu), daje możliwości kapsułkowania labilnych związków takich jak np. związki biologiczne – kwasy nukleinowe oraz białka [276,280,281]. Słabą stroną tej techniki są stosunkowo duże rozmiary uzyskiwanych mikrocząstek (>500 μm), związane z ograniczeniem średnicy wylotu zastosowanej igły. Im mniejszy wylot igły tym większa siła jest potrzebna do przeciskania przez nią roztworu i większe ryzyko związane z zaczopowaniem igły przez polimer oraz rozkładem substancji aktywnej. Aby uzyskać stosunkowo małe mikrocząstki wytworzone tą metodą, należy pobudzić akustycznie końcówkę wylotu, gdzie w zależności od częstotliwości wibracji i szybkości przepływu cieczy, krople ulegają rozbiciu na mniejsze mikrokropelki [276].

Klasyczny proces ekstruzji jest prowadzony w warunkach wysokiego ciśnienia i podwyższonej temperatury [282]. Ekstruzja w kontekście tworzenia mikrocząstek jest związana z uzyskiwaniem emulsji, która w kolejnym etapie jest wytłaczana przez dyszę pod ciśnieniem poniżej 700 kPa oraz w temperaturze do 115°C. Ta technika mikrokapsułkowania jest głównie stosowana do zamykania substancji smakowych, aromatów, witaminy C oraz barwników. W procesie tym następuje rozproszenie materiału substancji aktywnej (rdzenia) w stopionej masie długołańcuchowych cząsteczek np. polisacharydów. W kolejnym etapie związek aktywny za pomocą szeregu matryc trafia do cieczy odwadniającej, gdzie następuje jego twardnienie i zamknięcie materiału rdzenia [252,279,280]. Główną zaletą tej metody jest ochrona substancji smakowych przed utlenianiem. Badania nad okresem trwałości ekstrudowanego oleju ze skórki pomarańczowej pokazały, że jego właściwości fizykochemiczne nie ulegają żadnym zmianom przez około 4 lata. Jest to o wiele dłuższy okres trwałości w porównaniu z trwałością substancji smakowych zamykanych w matrycach polimerowych za pomocą innych metod [282]. Ekstruzja posiada również niestety szereg wad. Jedną z nich jest dość wysoka temperatura stosowana podczas procesu. Inną wadą jest stosunkowo niska zawartość substancji smakowej w pojedynczych mikrokapsułkach (stanowi ona ok. 8-12%, w porównaniu z 20% zawartością substancji smakowych w mikrokapsułkach wytworzonych za techniką suszenia natryskowego). Co więcej, nakłady finansowe związane z przeprowadzeniem procesu ekstruzji szacowane są na

prawie dwukrotnie wyższe w odniesieniu do kosztów związanych z suszeniem rozpyłowym [255].

9.1.9. Topliwa dyspersja

Topliwa dyspersja jest techniką polegającą na wytwarzaniu otoczek ze stopionego polimeru rozproszonego w cieczy, w której nie rozpuszcza się ani rdzeń w postaci substancji aktywnej, ani stopiony polimer. Związki, które mogą stanowić matrycę (woski, tłuszcze, parafinę stałą i inne), rozprasza się w cieczy (oleje silikonowe, fluorowane etery cykliczne) i ogrzewa się badany układ przy ciągłym mieszaniu do temperatury o 5°C wyższej od temperatury topnienia polimeru. W kolejnym kroku zostaje wprowadzona substancja lecznicza (w postaci płynnej lub stałej, o wielkości cząstek poniżej 50 µm) i po uzyskaniu stabilnej emulsji przy stałej szybkości wszystkie składniki zostają poddane schłodzeniu. Stopione tworzywo polimeru w postaci otoczki zestala się na rdzeniach formując mikrocząstki. Otrzymane mikrosfery, których wielkość można kontrolować szybkością obrotów mieszadła, oddziela się z mieszaniny poprzez filtrację, przemywa odpowiednio dobranym rozpuszczalnikiem i suszy. Ta nieskomplikowana metoda ma zastosowanie zwłaszcza w przypadku polimerów wrażliwych na działanie wody (np. polibezwodników). Problemem jest wpływ temperatury na zamykaną substancję leczniczą, można go jednak wyeliminować przez dobór polimeru o odpowiednio niskiej temperaturze topnienia [258,276,283-285].

10. Techniki modelowe dot. badania przenikania przez materiał imitujący skórę

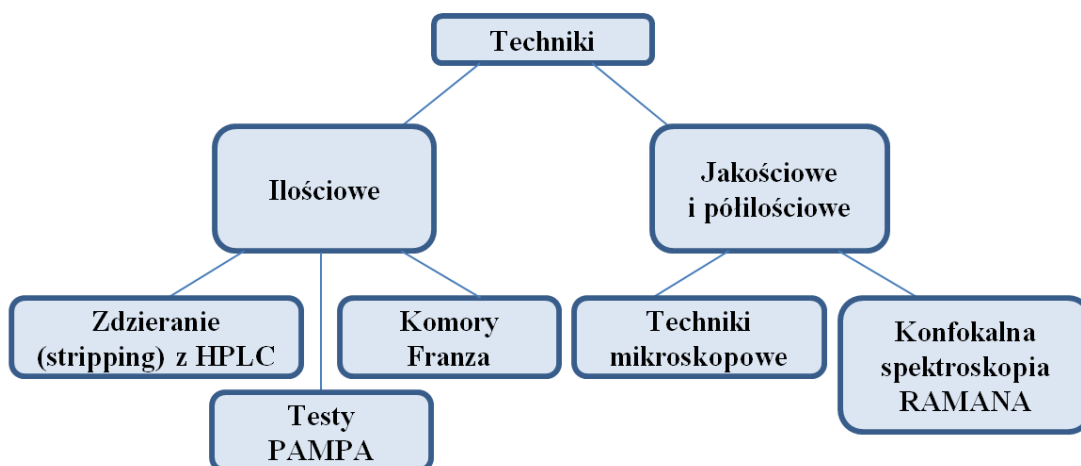
W ostatnich dekadach znacznie wzrosła ilość preparatów, które są stosowane bezpośrednio na skórę, w tym m.in. preparatów dozowanych w postaci systemów transdermalnych. Według szacunków rynkowych przeprowadzonych w 2016 roku, do roku 2024 roku wartość rynku związana z preparatami transdermalnymi znacząco wzrośnie [286]. Wg raportu Marketsandmarkets „Transdermal Drug Delivery System Market” – Global Forecast to 2022” światowy rynek transdermalnych systemów transportujących substancje lecznicze (TDDS) w roku 2017 był wart około 35,72 mld USD. Natomiast na rok 2024 ten rynek TDDS został szacunkowo wyceniony na kwotę 81,46 mld USD. Oznacza to, że średni wzrost wartości rynku szacowany jest na bardzo rekordowym poziomie aż 12,5% rocznie [287]. Stosowanie preparatów w systemach transdermalnych niesie liczne korzyści np. leczenie w formie nieinwazyjnej, ochrona

przewodu pokarmowego czy wątroby poprzez unikanie metabolizmu pierwszego przejścia przez ten organ. Modelowanie procesu wnikania w warstwy skóry i przenikania substancji aktywnych przez skórę do krwioobiegu jest dość złożonym mechanizmem [286]. Zostało poznanych kilka metod, które pozwalają na badanie uwalniania leków z różnych nośników m.in. polimerowych i wnikania w skórę. Preparaty stosowane miejscowo na skórę dostarczają substancję aktywną do różnych warstw skóry co pozwala działać zapobiegawczo i/lub leczniczo wobec różnych schorzeń. Proces inicjacji, czas trwania oraz siła efektu terapeutycznego są zależne od skuteczności następujących po sobie procesów tj. uwolnienia substancji aktywnej z nośnika, wnikania i następnie przenikania substancji do warstwy rogowej naskórka lub głębszych warstw skóry oraz nasilenia efektu terapeutycznego w punkcie docelowym. Wszystkie ww. procesy określają profil bezpieczeństwa i skuteczności stosowanego preparatu [288]. Wybór substancji aktywnej dostarczanej na skórę powinien opierać się na kilku czynnikach m.in. właściwościach fizykochemicznych, interakcjach leków z błoną i aspektach farmakokinetycznych [286]. Właściwości fizykochemiczne leku, które pozwalają na jego wchłanianie po podawaniu na skórę to: dość niska masa cząsteczkowa (<600 Da); niska temperatura topnienia (<200°C), co powiązane jest z odpowiednią rozpuszczalnością; wysoki, ale w miarę stabilny współczynnik podziału, gdyż za wysokie współczynniki podziału mogą zwiększać retencję leku, i w ten sposób działając hamująco na klirens substancji aktywnej ze skóry oraz rozpuszczalność substancji aktywnej w wodzie i olejach aby uzyskać odpowiedni gradient stężenia i nasilić proces dyfuzji przy przenikaniu przez warstwy skóry [289-292].

Znane są dwie główne grupy technik modelowania przenikania przez skórę *in vitro*. Są to:

- techniki ilościowe z wykorzystaniem komór dyfuzyjnych oraz testów PAMPA (z ang. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*).
- techniki jakościowe lub półilościowe to różne metody mikroskopowe i spektroskopowe oraz ich kombinacje [286].

Na poniższym rysunku (Rys. 16) przedstawiono podział metod modelowania przez skórę:



Rys. 16. Główne ilościowe i jakościowe metody kontroli penetracji skóry [286]

Testy ilościowe przeprowadzane w formie *in vitro* mają na celu określenie dokładnej ilości substancji aktywnej, która przedyfundowała przez błonę w określonym czasie w odniesieniu do wyznaczonego obszaru dyfuzji. W testach ilościowych sprawdza się zawartość komory z płynem akceptorowym, do którego docelowo przenika SA [293-295].

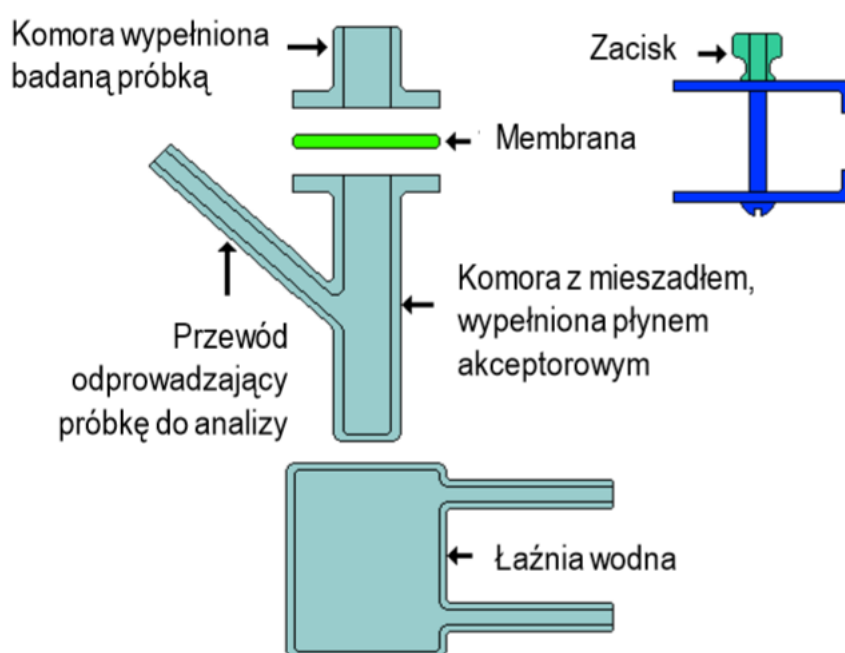
W przypadku technik jakościowych celem metody jest tylko określenie obecności SA [286].

10.1. Metody ilościowe

10.1.1. Komory Franza

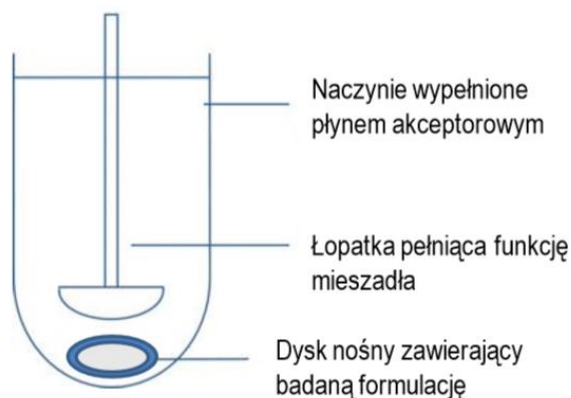
Testy przenikania SA badane za pomocą komory dyfuzyjnej stały się modelem „złotego standardu” już w latach 70-tych XX wieku dzięki pionierskiej pracy badawczej dr Thomasa J. Franza, który opracował aparat nazwany potem od jego nazwiska. Określa ona ważne korelacje pomiędzy skórą, SA a użytą formułą [286,296,297]. Wybór aparatury w celu oceny profilu uwalniania substancji czynnych w warunkach *in vitro* zależy przede wszystkim od formy w jakiej jest aplikowana ta substancja aktywna. Dla postaci aplikacyjnych półstałych (np. maści, kremy, żele) aparatem wykorzystywanym do badań uwalniania substancji aktywnej jest dyfuzyjna komora statyczna tzw. komora Franza. [298]. Do badań uwalniania związków aktywnych w warunkach *in vitro* są także wykorzystywane aparaty przepływowe bądź łopatkowe. Ważne jest, aby wszystkie elementy aparatury badawczej wykorzystywanej do badań, mające bezpośredni kontakt z badanymi próbkami oraz płynem akceptorowym, były bierne pod kątem chemicznym [299].

Komora dyfuzyjna Franza jest aparatem, który jest zbudowany z łaźni wodnej (ma ona za zadanie utrzymać stałą temperaturę układu w trakcie trwania analizy) oraz z komory z mieszadłem magnetycznym, zawierającej płyn akceptorowy [286,298] (Rys. 17). Podczas przebiegu badania płyn akceptorowy jest analizowany w ustalonych punktach czasowych [300]. Badaną próbkę trzeba umieścić w górnej części membrany, przez którą będzie zachodzić proces dyfuzji substancji aktywnej do płynu akceptorowego. Membrany stosowane w dializie wykorzystywane do badań w komorze Franza mogą zostać zastąpione przez spreparowane wycinki ludzkiej skóry. Pozwala to na uzyskanie warunków bardziej zbliżonych do warunków *in vivo* [298].



Rys. 17 Schemat komory dyfuzyjnej Franza (zaadaptowano z [298])

Aparat łopatkowy z dyskiem nośnym stanowi kolejne urządzenie do pomiaru przenikania substancji aktywnych *in vitro*. Jest zbudowany z naczynia szklanego, łopatki oraz dysku nośnego wykonanego ze stali nierdzewnej (Rys. 18). Do wnętrza dysku nośnego wprowadza się badaną próbkę i umieszcza się go na dnie naczynia wypełnionego płynem akceptorowym. W wyniku obrotów łopatki (ok. 50 obr./min), która jest umieszczona 2,5 cm nad powierzchnią dysku, następuje mieszanie płynu akceptorowego. Aparat łopatkowy z dyskiem nośnym jest rekomendowany do badań uwalniania substancji aktywnej z preparatów nierozpuszczalnych lub słabo rozpuszczalnych w wybranym płynie akceptorowym, dlatego zastosowanie membran dializacyjnych nie jest konieczne [301,302].



Rys. 18 Schemat aparatu łopatkowego z dyskiem nośnym (zaadoptowano z [303])

Pionowa komora dyfuzyjna VDC to komora, która powstała w wyniku modyfikacji komory Franza. Pionowa komora dyfuzyjna składa się ze zbiornika z płynem akceptorowym, zbiornika z umieszczoną próbką oraz szklanego mieszadła. Badany preparat należy umieścić pod membraną dializacyjną (w przeciwieństwie do komory Franza) [298, 304,305].

Płyn akceptorowy w komorze Franza nazwany także również medium, stanowi ciecz, do której dyfunduje transmembranowo SA z badanej próbki określonej postaci leku. Przy doborze odpowiedniego medium należy kierować się jego podobieństwem do warunków fizjologicznych skóry, tj. temperatury czy pH. Wartość pH zdrowej skóry mieści się w zakresie 4,5–6,5 [298,306]. Temperatura płynu efektorowego używanego do badań w warunkach *in vitro* zazwyczaj mieści się w przedziale 32,0-37,0°C. Nie zaleca się prowadzenia tego rodzaju badań w podwyższonej temperaturze, gdyż może to źle wpływać na stabilność samej substancji aktywnej, jak również na konsystencję formułacji ją zawierającej. Jak wiadomo podwyższona temperatura jest przyczyną spadku lepkości stosowanych preparatów, a to może się wiązać ze wzrostem uwalnianej ilości substancji i otrzymaniu zafałszowanych wyników analizy [301,306]. Innym bardzo ważnym aspektem, jaki należy brać pod uwagę podczas wyboru rodzaju płynu akceptorowego jest rozpuszczalność użytej substancji czynnej. Dla substancji dobrze rozpuszczalnych w wodzie są stosowane się roztwory wodne, natomiast dla substancji trudno rozpuszczających się w wodnych roztworach stosuje się roztwory wodno-alkoholowe [301]

Zgodnie z dokumentem wydanym EMA (Europejska Agencja Leków) testy dyfuzyjne są podzielone na 2 grupy:

- testy uwalniania *in vitro* (IVRT – ang. *in vitro release tests*);

- Test przenikania przez skórę *in vitro* (IVPT – ang. *in vitro skin permeation tests*) [307].

W testach IVRT stosuje się błonę syntetyczną (błonę modelową na bazie lipidów lub nielipidową). W poniższej tabeli (Tabela 4) przedstawiono przykładowe membrany stosowane w technikach IVRT.

Tabela 4 Klasyfikacja oraz przykłady membran wykorzystywanych w IVRT [301,308]

Membrany stosowane w IVRT			
Polimery naturalne	Syntetyczne elastomery	Syntetyczne polimery	Materiały pochodzenia odzwierzęcego
Modyfikowana celuloza (octan celulozy, azotan celulozy), żelatyna, chitozan, naturalne woski i gumy	Poliizobutylen, polidimetylosiloksany, nityl, akrylonityl, polibutadien	Polietylen, alkohol poliwinylowy, poliwinylpirolidon, poliakrylany, polimetylometakrylany	Preparowana skóra świni, myszy, szczura oraz królika

Badanie IVRT pokazuje szybkość uwalniania, a wykrywane ilości SA mieszczą się w zakresie od μg do mg [286,307]. W przypadku metod IVPT stosuje się ludzką skórę. Prowadząc badania biorównoważności z użyciem ludzkiej skóry należy dokładnie określić sposób jej przygotowania, czas przechowywania, grubość a także określić obszar ludzkiego ciała, z którego została pobrana. W trakcie testów IVPT temperatura na powierzchni skóry jest utrzymywana na stałym poziomie $32\pm 1^\circ\text{C}$, a medium akceptorowe nie powinno naruszać integralności skóry [309]. Badania IVPT pozwalają na wykrycie ilości, które mieszczą się w zakresie od pg do ng . Zaleca się stosowanie technik IVRT we wczesnych etapach badań, natomiast techniki IVPT można stosować w obiecujących preparatach [286, 307].

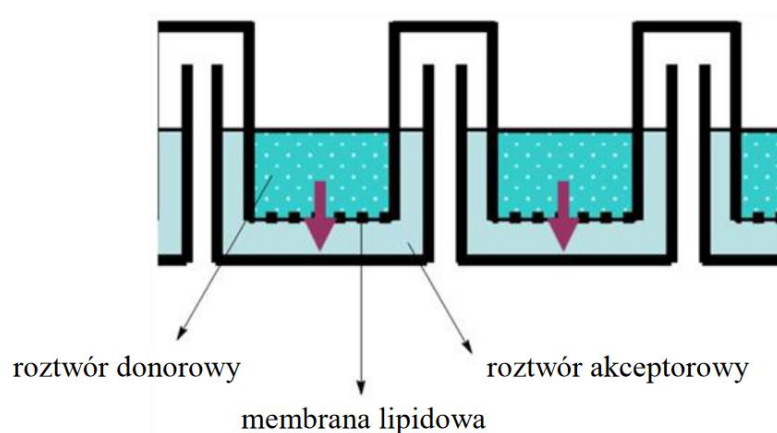
10.1.2. Testy PAMPA

Po odkryciu komory Franza w odniesieniu do jej struktury został opracowany test PAMPA (ang. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*, co dosłownie oznacza „równoległy test przepuszczalności sztucznej błony”) [310,311]. PAMPA służy zatem do szybkiego określania przepuszczalności molekuł przez błonę pasywną [312] i jest uznany za dość obiecującą metodę ze względu na niski koszt i wysoką przenikalność [286]. Aparatura do tego testu składa się z dwóch podstawowych elementów, które są połączone

i umieszczone na wstrząsarce, a po określonym czasie zawarte w nich roztwory są poddawane analizie [313] Są to:

- płytki podstawowa – posiadająca 72 zagłębienia uzupełnione roztworem akceptorowym,
- płytki zamykająca – pasująca do płytki podstawowej, wyposażona w 72 dołki, na których dnie została umieszczona membrana lipidowa, o budowie podobnej do cementu międzykomórkowego (zawiera w swoim składzie ceramidy, wolne kwasy tłuszczowe, sterole, np. cholesterol) [314,315].

Poniżej na Rys. 19 przedstawiono schemat budowy urządzenia używanego do przeprowadzania testów PAMPA.



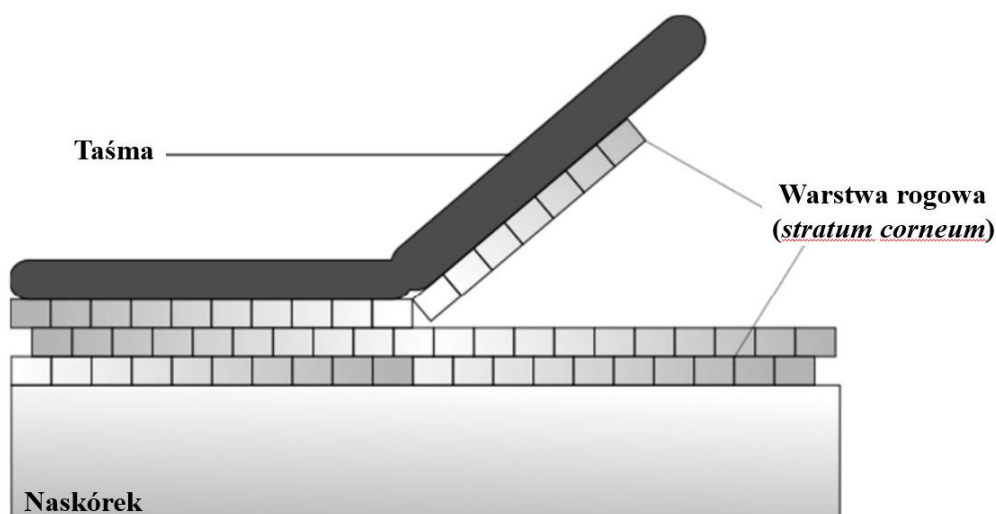
Rys. 19 Schemat urządzenia do oceny transportu przekórnego metodą PAMPA [316]

Technika PAMPA jak dotychczas jest stosowana w modelowaniu przenikania SA w układzie pokarmowym jak również w barierze krew – mózg (ang. *Blood-Brain Barrier*, BBB) [313], oraz w badaniu absorpcji przekórnego [317]. Skin-PAMPA została stworzona, aby imitować cechy warstwy rogowej naskórka [318]. Uzyskane metodą PAMPA wyniki były całkowicie zgodne z rezultatami uzyskanymi przy użyciu komór dyfuzyjnych Franz. Testy PAMPA są zalecane przede wszystkim do badań wstępnych (czyli tzw. przesiewowych). Zaletą omawianej techniki są: powtarzalność pomiarowa a także prostota wykonywania. Wady z kolei wiążą się z trudnościami w uzyskaniu dostatecznej ilości danych, koniecznych do określenia pełnej kinetyki przenikania [317].

10.1.3. Metoda strippingu

Warstwa rogowa naskórka (łac. *stratum corneum* – SC) skóry stanowi najbardziej zewnętrzną barierę ciała zapobiegającą i/lub ograniczającą wnikanie różnych substancji do wnętrza organizmu i wydalanie substancji wytworzonych endogenicznie. Stąd badania

w dziedzinie kosmetologii i dermatologii koncentrują się na badaniu mechanizmów fizjologicznych SC skóry [319]. Metoda strippingu (metoda zrywania wierzchnich warstw naskórka za pomocą taśmy przyklejonej do SC) została wynaleziona w latach 40-tych ubiegłego stulecia, a dokładniej opracowana w 1951 roku przez Pinkusa [320]. Badacz ten zaobserwował wzrost aktywności podziałów mitotycznych komórek naskórka po przeprowadzonym procesie zrywania taśmy, co jest związane z tym, że warstwa utraconych komórek została zastąpiona przez nowopowstałe komórki w procesie mitozy. Stripping należy do małoinwazyjnych metod i dzięki temu może być powszechnie stosowany zarówno w technikach prowadzonych *in vivo* oraz *in vitro*, zarówno u ludzi jak i zwierząt, np. na skórze świń, szczurów, świnek morskich i myszy [319,320], a także na odpowiednich modelach skóry [286,318,321-323]. Ta metoda w postaci ilościowej oceny SA w skórze ma kluczowe znaczenie dla badań dostarczania miejscowego i egzogenego [322]. Obecnie jedną z konwencjonalnych procedur badawczych stało się cięcie poziome, polegające na taśmie całkowicie usuwającej warstwę rogową naskórka [286,324]. Na poniższym rysunku (Rys. 20) pokazano zasadę działania metody strippingu.



Rys. 20 Schemat strippingu (zrywania przyklejonej taśmy z wierzchnią warstwą *stratum corneum*) [286]

Po miejscowym zastosowaniu badanego preparatu na skórę i w konsekwencji jego penetracji do warstwy rogowej przez określony czas inkubacji rozpoczyna się procedura mocowania i następnie usuwania taśmy. Przed badaniem wnikania różnych formułacji kosmetycznych oraz dermatologicznych (z wyjątkiem filtrów przeciwsłonecznych) skóra powinna zostać oczyszczona przed zastosowaniem metody strippingu [319]. Procedura metody rozpoczyna się od umieszczenia taśmy na powierzchni wytypowanego fragmentu

skóry, następnie za pomocą wálka dociska się delikatnie na taśmę zapewniając dobre przylgnięcie taśmy do wierzchniej warstwy - *stratum corneum*, w którą wniknęła formuacja i na koniec taśma jest usuwana z powierzchni skóry szybkim ruchem ku górze [319,323,325]. Stripping pozwala na usuwanie kolejnych mikroskopijnych warstw korneocytów wbudowanych w lipidowy cement naskórka (zwykle są to warstwy o grubości 0,5–1 μm) [326]. Wykonanie około 70 strippów pozwala na usunięcie wszystkich warstw *stratum corneum*. Na każdym kolejnym strippie liczba komórek – korneocytów zmniejsza się, co może być spowodowane bardziej zwartą strukturą SC w głębszych partiach naskórka, co jest również powodem zwiększonej wartości międzykomórkowej siły kohezji [323]. Ilość korneocytów ze SC ściągana przez pojedynczy stripp zależy od różnych czynników (wewnętrznych i zewnętrznych). Ma na to wpływ m.in. lokalizacja miejsca aplikacji formuacji i zrywania taśmy (anatomiczne różne miejsca mają inny skład i ilość lipidów, inną liczbę korneocytów i grubość SC), wiek osoby poddanej badaniu, pora roku. Na ważne parametry skóry, tj. pH czy TEWL wpływa również pora roku, rasa i rodzaj skóry wolontariusza. Do czynników zewnętrznych, które mają wpływ na proces strippingu zalicza się: rodzaj taśmy klejącej, czas kontaktu i nacisku taśmy na skórę, siłę usuwania taśmy ze skóry, a także stosowanie miejscowe innych substancji. W strippingu SC mogą być stosowane różne rodzaje taśm klejących m.in. produkty dostępne handlowo oraz taśmy własnej produkcji. Właściwości stosowanych miejscowo na skórę formuacji mają ogromny wpływ na ilość usuwanych komórek z SC przy użyciu paska taśmy. Po nałożeniu etanolu przyczepność warstwy SC do strippów jest większa, zaś nałożenie preparatu o konsystencji olejowej powoduje, że przyczepność do taśmy jest znacznie mniejsza, co w konsekwencji powoduje zużycie większej liczby pasków, aby ściągnąć porównywalną ilość korneocytów SC naskórka [319].

W kolejnym etapie składniki strippów powinny zostać wyekstrahowane w odpowiednio dobranym ekstrakcie w celu odzyskania SA ze strippa i ilościowego określenia stężenia zaadsorbowanej substancji czynnej. Najczęściej stosowanymi metodami ilościowego oznaczania zawartości SA po ekstrakcji są: spektrofotometria UV-VIS [319,327] chromatografia gazowa, chromatografia HPLC [320,325-328] (z detekcją UV, fluorescencyjną a nawet spektrofotometryczną), spektroskopia w UV i IR oraz metoda zliczania scyntylicyjnego [323]. Można również zbadać strippy metodą jakościową, np. za pomocą techniki FTIR-ATR (Spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni) [328-331].

Wytyczne opisujące zastosowanie taśm do zrywania górnych warstw skóry i penetracji *in vivo* substancji aktywnych są opisane w OECD TG 427 [332], podczas gdy procedura postępowania w metodzie strippingu w warunkach *in vitro* została opisana w OECD TG 428 [333].

10.2. Metody jakościowe i ilościowe

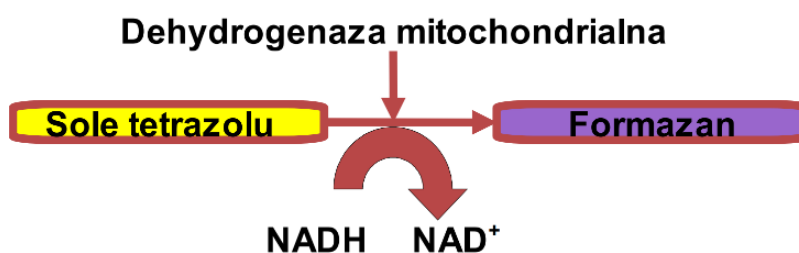
10.2.1. Techniki mikroskopowe

Obserwacje prowadzone za pomocą różnych technik mikroskopowych dostarczają wielu ważnych danych dotyczących rozmieszczenia leku w różnej wysokości warstw skóry a także wyjaśniają mechanizm wnikania w jej głąb [286]. Dodatkowo te techniki nie działają niszcząco i na badane próbki w warunkach *in vitro* [286,334,335]. Jedną z częściej stosowanych technik jest mikroskopia fluorescencyjna, pozwalająca na obserwację preparatów znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi, które wnikały do *stratum corneum* lub w głębsze warstwy naskórka [336,337]. Bardziej wyspecjalizowaną odmianą standardowej mikroskopii fluorescencyjnej jest mikroskopia konfokalna. Wśród technik mikroskopii konfokalnej wyróżnia się dwie główne: mikroskopia dwufotonowa (2-PFM) oraz laserowa mikroskopia konfokalna (CLSM) [286]. Bardzo dużą zaletą stosowania technik z użyciem mikroskopu konfokalnego jest możliwość uzyskania z dużą szybkością wysokiej jakości obrazów struktur komórkowych czy fragmentów tkanek, do których wniknął określony fluorochrom, zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro* [318,321,338,339]. W mikroskopii konfokalnej najczęściej używa się laserów argonowych emitujących światło o długości fali λ równej 457, 488 i 514 nm, oraz lasery argonowo–kryptonowe, które powodują wzbudzenie fluorochromów przy λ równej 488, 568 i 647 nm. Jednak częściej są stosowane tańsze lasery helowo–neonowe wzbudzające fluorochromy światłem o $\lambda = 543$ nm (światło zielone) i $\lambda = 633$ nm (światło czerwone) [339].

11. Metoda oceny cytotoksyczności wobec linii komórkowych (prawidłowych i nowotworowych) – test MTT *in vitro*

Ogólną zasadą testu MTT (bromek 3-[4,5-dimetylotiazol-2-ilo]-2,5-difenylo-tetrazoliowy) jest pomiar żywych komórek na podstawie aktywności enzymów mitochondrialnych (dehydrogenazy mitochondrialnej). Dla większości żywych komórek aktywność mitochondrialna jest stała tj. wzrost lub spadek liczby żywych komórek jest liniowo związany z aktywnością mitochondriów. MTT jest żółtą, dobrze rozpuszczalną

w wodzie solą tetrazolową, która przy udziale dehydrogenazy mitochondrialnej i kofaktora NADH ulega konwersji do purpurowego, nierozpuszczalnego w wodzie formazanu, z wydzieleniem utlenionych NAD^+ . Formazan nie przenika przez błonę komórkową i jest akumulowany w zdrowych, nieuszkodzonych komórkach w postaci kryształów. Poniżej przedstawiono schemat ideowy testu redukcji MTT (Rys. 21).



Rys. 21 Konwersja MTT do formazanu przy udziale enzymów mitochondrialnych

Każdy wzrost lub spadek żywotności komórek można wykryć mierząc stężenie formazanu odzwierciedlone w gęstości optycznej (OD) przy użyciu czytnika płytek UV-VIS przy długości fali $\lambda=540$ i 720 nm. W przypadku pomiarów wrażliwości na substancje lecznicze, wartości OD prób komórek inkubowanych z SA są porównywane z OD prób komórek nie wystawionymi na działanie SA.

Test MTT jest odpowiedni do pomiaru wrażliwości różnych linii komórkowych jak również komórek pierwotnych na badaną substancję aktywną. W przypadku dzielących się komórek spadek liczby komórek odzwierciedla zahamowanie wzrostu komórek, a wrażliwość na SA jest wtedy zwykle określana jako stężenie leku wymagane do osiągnięcia 50% zahamowania wzrostu – 50% żywotności komórek, w odniesieniu do wzrostu nietraktowanej kontroli (stężenie IC_{50}). W przypadku komórek pierwotnych (nie dzielących się) wrażliwość na lek mierzy się jako zwiększone zabijanie komórek traktowanych, w porównaniu z utratą komórek już obserwowaną w komórkach nietraktowanych (50% stężenie śmiertelne – LC_{50}) [340].

II CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Cel, zakres i hipoteza pracy badawczej

Przegląd literaturowy, który został dokonany w ramach pracy doktorskiej pokazuje trend wzrostu zainteresowania rozwiązaniami z wykorzystaniem nanocząstek polimerowych oraz tekstyliów medycznych. Dynamiczny rozwój różnych gałęzi medycyny i farmacji oraz powstawanie nowych wizji profilaktyki oraz terapii alternatywnych różnych schorzeń daje możliwości do wykorzystania tekstylnych wyrobów medycznych z nośnikami różnych substancji aktywnych. Ich terapeutyczne działanie może zachodzić poprzez bezpośredni kontakt ze zmianami chorobowymi na skórze oraz pośrednio, gdzie substancje lecznicze przedostają się do położonej w głębszych warstwach skóry sieci naczyń włosowatych i docierają do krwioobiegu.

W związku z powyższym celem niniejszej dysertacji jest opracowanie i scharakteryzowanie komponentów oraz produktu końcowego – funkcjonalnych tekstyliów, wykorzystujących transdermalne systemy dostarczania substancji aktywnych.

Hipoteza przedkładanej rozprawy doktorskiej brzmi, że „możliwe jest wytworzenie materiałów włókienniczych zawierających mikrokapsuły z nanocząstkami z substancją aktywną jako terapeutyczne tekstylia do dostarczania substancji leczniczej drogą transdermalną”.

Zakres badawczy w ramach pracy doktorskiej obejmował następujące zadania:

1. Wybór substancji aktywnych, które odgrywają istotną rolę jako środki lecznicze w wybranych dolegliwościach (np. stopa cukrzycowa), wytypowano ekstrakt z miłorzębu japońskiego (łac. *Ginkgo biloba*) – GBE).
2. Selekcja polimerów będących matrycą osadzania substancji bioaktywnych w nanocząstkach (wytypowano sól chitozanu) oraz w mikrokapsułkach (wytypowano najpierw alginian a następnie etylocelulozę).
3. Opracowanie metody otrzymywania i charakterystyka fizykochemiczna nanocząstek z zamkniętym GBE – Ch(GB)NP. (użyte metody: metoda żelowania jonowego, analiza wielkości i wskaźnika polidispersyjności (PDI) za pomocą aparatury Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK), analiza FTIR-ATR, badania mikrobiologiczne wobec szczepów bakteryjnych i grzybowych)
4. Określenie uwalniania ekstraktu z nanocząstek w różnych mediach badawczych (za pomocą techniki spektrofotometrycznej UV-VIS).

5. Wytworzenie i charakterystyka mikrokapsuł zawierających GBE lub nanocząstki (użyte metody: metoda zewnętrznego żelowania jonowego, metoda odparowania rozpuszczalnika z emulsji, mikroskopia SEM).
6. Określenie uwalniania ekstraktu z mikrokapsuł z GBE lub nanocząstkami w różnych mediach badawczych (za pomocą techniki spektrofotometrycznej UV-VIS).
7. Opracowanie sposobów nanoszenia mikrokapsuł z substancją aktywną na nośnik włókienniczy (użyte metody: technika immobilizacji mikrokapsuł przy użyciu kleju chitozanowego).
8. Badania biologiczne na liniach komórkowych prawidłowych i nowotworowych (test cytotoxyczności MTT)
9. Określenie przenikania nanocząstek z ekstraktem zawartych w mikrokapsułach przymocowanych do nośnika włókienniczego przez membranę o wielkości porów zbliżonej do porów w skórze (wg własnej procedury).

2. Materiały i metody

2.1. Materiały

Do badań zastosowano następujące materiały: chitozan (Primex, Chitoclear fg 95, średnia masa cząsteczkowa (MW) ~ 234,55 kDa, DD=86,8%, lepkość 99,17 cP mierzona dla 1% roztworu wodnego w 20°C, Siglufjordur, Islandia), kwas octowy (Avantor, 80%, cz.d.a., Gliwice, Polska), trifosforan pentasodu – TPP (Sigma-Aldrich-Merck, cz.d.a., ≥98,0%, Nr kat.: 72061, Taufkirchen, Niemcy), handlowy wyrób medyczny *Tinctura Ginkgo bilobae* – wodno-etanolowy ekstrakt z zielonych liści miłorzębu japońskiego (zateżony do stężenia 10% wag. roztworu, Phytopharm, Nowe Miasto nad Wartą, Polska), Polysorbate 80 – Tween 80 (Lach:ner, s.r.o, Neratovice, Czechy), chlorek sodu (Chempur, cz.d.a., Piekary Śląskie, Polska), alkohol poliwinylowy – PVA, (POCh, średnia MW ~ 20000 Da, Gliwice, Polska), alginian sodu Manucol DH (FMC Biopolymer UK, lepkość 56 cP mierzona dla 1% roztworu wodnego w temperaturze 20°C, Cork, Irlandia), chlorek wapnia (Chempur, cz.d.a., Piekary Śląskie, Polska), alkohol metylowy (Stanlab, 99,5%, cz.d.a., Lublin, Polska), etyloceluloza (Aldrich Chemistry, lepkość 4 cP mierzona w 5% roztworze toluen/etanol 80:20, etoksyl, zawartość 48%, St. Louis, Missouri, USA), chloroform (Chempur, cz., Piekary Śląskie, Polska), ustabilizowana linia komórkowa wywodząca się z komórek nabłonkowych raka szyjki macicy (HeLa) przechowywana w stanie głębokiego zamrożenia (-170°C), w ciekłym azocie (Europejska Kolekcja Hodowli Komórkowych – ECACC, Salisbury Wiltshire, Wielka Brytania),

ustabilizowana linia komórkowa wywodząca się z panelu gruczolakoraka jajnika PE pochodzącego od pacjentek w różnych stadiach raka jajnika, wyizolowanych z różnych miejsc złośliwych i na różnych etapach leczenia (PEA1), przechowywana w stanie głębokiego zamrożenia (-170°C), w ciekłym azocie (Europejska Kolekcja Hodowli Komórkowych – ECACC, Salisbury Wiltshire, Wielka Brytania), linia ludzkich adherentnych fibroblastów dziąsłowych (HGF-1) przechowywana w stanie głębokiego zamrożenia (-170°C), w ciekłym azocie (Amerykańska Kolekcja Szczepów Wzorcowych – ATCC, Manassas, Virginia, USA), podłoże hodowlane (RPMI 1640 [Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri USA], DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham [Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA]) z dodatkiem: 10% FCS – surowicy płodów cielęcych z inaktywowanej w 56°C przez 30 min (Cytogen, Łódź, Polska); penicyliny 100 U/ml (Polfa, Tarchomin, Polska), streptomycyny 100 µg/ml (Polfa, Tarchomin, Polska), L-glutaminy 200 U/ml (Polfa, Tarchomin, Polska) i 1% dodatkiem aminokwasów endogennych – NEAA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) dla linii komórkowej HeLa, błękit trypanu – 1% roztwór w 0,85 % NaCl (Avantor, Gliwice, Polska), trypsyna 0,25% roztwór w PBS (Biomed Sp. z.o.o. Wytwórnia Surowic i Szczepionek, Lublin, Polska), MTT Cell Proliferation Assay Kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA), *Escherichia coli* ATCC 11229 (Biomaxima S.A., Lublin, Polska), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Biomaxima S.A., Lublin, Polska), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 (Biomaxima S.A., Lublin, Polska), *Enterococcus faecalis* ATCC 33186 (Biomaxima S.A., Lublin, Polska), *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 (Biomaxima S.A., Lublin, Polska), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Biomaxima S.A., Lublin, Polska), *Candida albicans* ATCC 10259 (Biomaxima S.A., Lublin, Polska), *Saccharomyces cerevisiae* (Lallemand Polska, Sp. z.o.o., Płochocin, Polska), pożywka Müller Hilton II Broth – MHB (BTL Sp. z.o.o., Łódź, Polska), pożywka Sabourauda z dodatkiem 4% glukozy (BTL Sp. z.o.o., Łódź, Polska), pożywka agarowa PCA (BTL Sp. z.o.o., Łódź, Polska), agar bakteriologiczny (BTL Sp. z.o.o., Łódź, Polska), skarpety 100% bawełna czesana (Eltom Collection, Łowicz, Polska), rękaw dializacyjny Spectra/Por, molecularpouros membrane tubing, MWCO: 3,500 (Spectrum Laboratories, Inc., Piscataway, New Jersey, USA), woda destylowana (Łukasiewicz-ŁIT, Łódź, Polska).

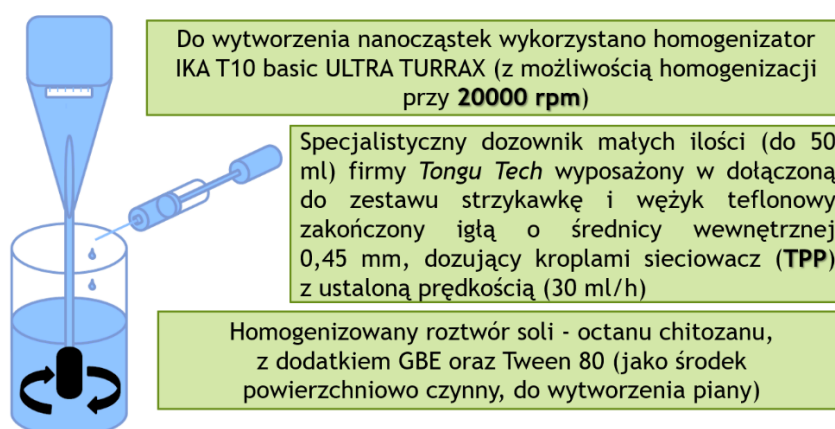
2.2. Metody

2.2.1. Otrzymywanie nanocząstek chitozanowych (ChNP) oraz nanocząstek chitozanowych z ekstraktem z liści *Ginkgo biloba* (Ch(GB)NP)

ChNP i Ch(GB)NP otrzymano w oparciu o metodę żelowania jonotropowego opracowaną i opisaną przez Calvo i wsp. [227] oraz Porras-Gómez i wsp. [341] z uwzględnieniem niewielkiej modyfikacji. W pierwszej kolejności chitozan rozpuszczono w 0,5% v/w roztworze kwasu octowego do uzyskania stężenia 0,5% chitozanu w 0,5% kwasie octowym (w/w). TPP rozpuszczono w wodzie destylowanej do uzyskania stężenia 0,5% w/w. Tween 80 rozpuszczono w wodzie destylowanej do uzyskania stężenia 1,5% w/w. Do 100 ml roztworu chitozanu w kwasie octowym dodano 10 ml GBE, a następnie dodano 40 ml 1,5% roztworu Tween 80 (jako środka powierzchniowo czynnego). Następnie do roztworu chitozanu i GBE wkroplono 2,5 ml roztworu TPP i homogenizowano przez 1h przy 20000 rpm. Końcową zawiesinę Ch(GB)NP wirowano przy 12000 rpm przez 20 min. Otrzymane nanocząstki przepłukano dwukrotnie wodą i odwirowano w tych samych warunkach.

ChNP wykonano według metody opisanej powyżej, z tą różnicą, że zamiast ekstraktu GBE do roztworu chitozanu dodano taką samą ilość wody destylowanej. Do badań biologicznych (cytotoksyczność na liniach komórkowych) próbkę przemyto dwukrotnie roztworem soli i odwirowano w tych samych warunkach.

Metodyka otrzymywania ChNP oraz Ch(GB)NP została przedstawiona na poniższym schemacie (Rys. 22)



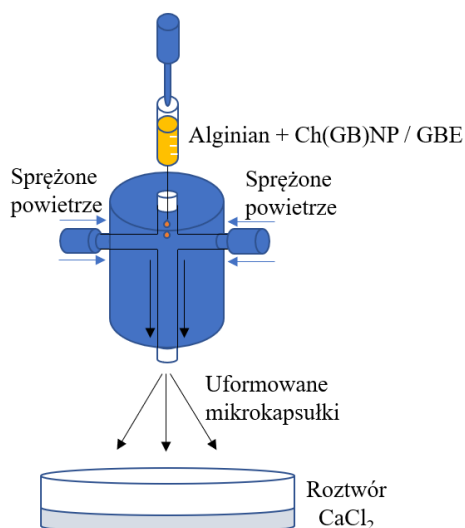
Rys. 22 Schemat ideowy otrzymywania ChNP i Ch(GB)NP

2.2.2. Otrzymywanie mikrokapsulek alginianowych [Al(Ch(GB)NP) oraz Al(GB)]

Al(Ch(GB)NP) otrzymano metodą zewnętrznego żelowania jonowego. Do 5% (w/w) wodnego roztworu alginianu sodu dodano przy ciągłym mieszaniu 1 g nanocząstek z ekstraktem *Ginkgo biloba* Ch(GB)NP w 2 ml metanolu (aby zapobiec agregacji nanocząstek). Mikrokapsułki alginianowe z nanocząstkami chitozanowymi Al(Ch(GB)NP) formowano w sprężonym powietrzu, a następnie żelowano w 5% roztworze chlorku wapnia w czasie 45 minut. Mikrokapsułki suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 50°C przez 5 godzin.

Sposób otrzymywania Al(GB) jest podobny, z tą różnicą, że do roztworu alginianu dodaje się 5 ml ekstraktu.

Schemat ideowy otrzymywania mikrokapsulek alginianowych przedstawiono na Rys. 23.



Rys. 23 Schemat ideowy otrzymywania Al(Ch(GB)NP i Al(GB)

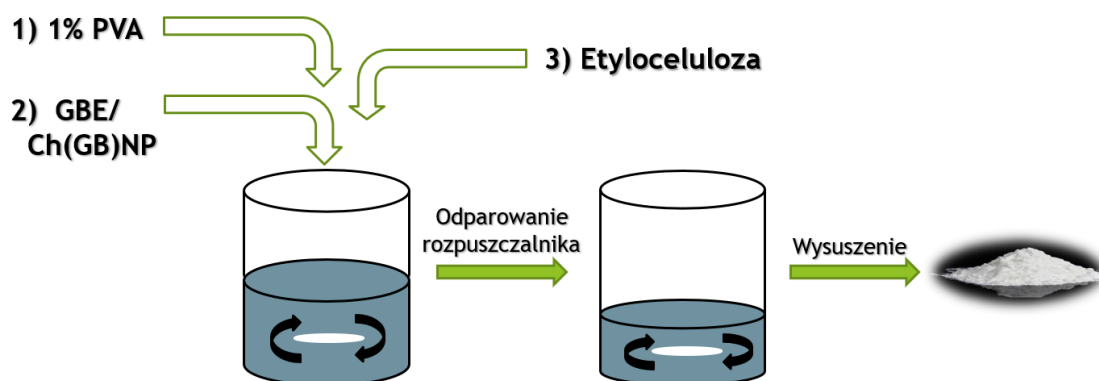
2.2.3. Otrzymywanie mikrokapsulek etylocelulozowych [Et(Ch(GB)NP) i Et(GB)]

Mikrokapsułki z powłoką z etylocelulozy otrzymano metodą dyfuzji rozpuszczalnika z emulsji. Emulsję O/W otrzymano przez homogenizację fazy organicznej (0,6 g etylocelulozy rozpuszczono w 10 ml chloroformu) w fazie wodnej (40 ml) zawierającej 5 ml nanocząstek chitozanowych z ekstraktem z *Ginkgo biloba* [w celu uzyskania mikrokapsulek etylocelulozowych zawierających nanocząstki chitozanowe – Et(Ch(GB)NP)] lub 5 ml ekstraktu z liści z *Ginkgo biloba* [w celu uzyskania mikrokapsulek etylocelulozowych zawierających ekstrakt – Et(GB)] oraz środek

powierzchniowo czynny – 1% roztwór poli(alkoholu winylowego)]. Mikrosfery zostały utworzone po całkowitym usunięciu rozpuszczalnika z kropelek przez odparowanie w trakcie mieszania (1400 rpm).

Wytworzone mikrokapsułki oddzielono z roztworu, wypłukano i suszono.

Schemat ideowy otrzymywania mikrokapsulek etylocelulozowych przedstawiono na Rys. 24.



Rys. 24 Schemat ideowy otrzymywania Et(Ch(GB)NP i Et(GB)

2.2.4. Charakterystyka nanocząstek chitozanowych oraz mikrokapsulek alginianowych i etylocelulozowych

2.2.4.1. Analiza wielkości Ch(GB)NP oraz współczynnika polidispersji (PDI)

Średnicę i wskaźnik polidispersyjności (PDI) otrzymanych nanocząstek zmierzono za pomocą aparatury Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). Pomiary wykonano w temperaturze 25°C w medium wodnym. W celu określenia wielkości cząstek i wartości PDI, 1 ml próbki Ch(GB)NP umieszczono w kuwecie ZEN0040 (Malvern, UK), a wyniki analizowano techniką dynamicznego rozpraszania światła (DLS). W celu przeanalizowania wpływu agregacji nanocząstek na wielkość i polidispersję przeprowadzono pomiary dla roztworów nanocząstek bez wstępnej sonikacji oraz po 5- i 10-minutowej wstępnej sonikacji. Każdą próbkę mierzono w 3 seriach po 11 razy, a wyniki analizowano za pomocą oprogramowania Malvern Instruments Ltd.

2.2.4.2. Morfologia nanocząstek i mikrokapsulek

Morfologię (strukturę i kształt powierzchni) nanocząstek oraz mikrokapsulek alginianowych i etylocelulozowych oceniano za pomocą mikrofotografii przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej – SEM, przy różnych powiększeniach. W trakcie

przygotowania preparatów do obserwacji za pomocą techniki SEM, nanocząstki wysuszone sublimacyjnie, mikrokapsułki alginianowe wysuszone w suszarce próżniowej w temp. 50°C a mikrocąstki etylocelulozowe wysuszone w temperaturze pokojowej. Następnie nanocząstki i mikrokapsułki napyłono złotem i poddano obserwacji na mikroskopie elektronowym, model FEI Quanta 200 z napyłarką próżniową Q150R S (USA) w celu określenia ich parametrów morfologicznych.

2.2.4.3. Wydajność enkapsulacji w Ch(GB)NP

Wydajność enkapsulacji GBE określono za pomocą spektrofotometru Perkin Elmer UV-VIS z oprogramowaniem Lambda 2 (pośrednia metoda spektrofotometryczna mierząca absorbancję w zakresie pomiarowym dla rutyny: 257-270 cm⁻¹). Supernatant zawierający niezwiązany GBE (po oddzieleniu od odwirowanych nanocząstek) badano spektrofotometrycznie. Na podstawie wartości absorbancji określono zawartość niewięzionego GBE (wcześniej wyznaczono krzywą kalibracyjną). Do określenia zawartości GBE związanego w nanocząstkach wykorzystano wzór:

$$EE\% = \frac{[C]_i - [C]_f}{[C]_i} \times 100\% \quad [342]$$

EE % – Wydajność enkapsulacji, %

[C]_i – Wyjściowe stężenie GBE, mg/ml

[C]_f – Stężenie niezwiązanego GBE w supernatancie po odseparowaniu nanocząstek, mg/ml.

2.2.4.4. Kinetyka uwalniania GBE z Ch(GB)NP oraz mikrokapsulek [Al(GB), Al(Ch(GB)NP), Et(GB) oraz Et(Ch(GB)NP]

Ten sam spektrofotometr UV-VIS z oprogramowaniem Lambda 2, wykorzystano do badania kinetyki uwalniania materiału rdzenia (GBE). Próbki zliofilizowanych Ch(GB)NP, wysuszonych mikrokapsulek alginianowych i etylocelulozowych przygotowano w postaci tabletek. Odważono po 0,05 g każdej próbki i następnie sprasowano w tabletkę o średnicy 12 mm i umieszczono w 5 ml medium badawczego (badania przeprowadzono w dwóch mediach badawczych – wodzie i soli fizjologicznej). Badania prowadzono w temperaturze 33°C. Absorbancję badano przy długości fali charakterystycznej dla rutyny tj. w zakresie pomiarowym 257-270 cm⁻¹ (wcześniej wyznaczono krzywą kalibracyjną). Pomiaru wykonywano w określonych odstępach

czasu (po 5 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 24h, 96h, 168h oraz 336h) pobierając po 2 ml roztworu. Roztwór uzupełniano za każdym razem do wyjściowej objętości.

2.2.4.5. Analiza FTIR-ATR

Pomiary spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) przeprowadzono z użyciem spektrofotometru FTIR (Nicolet iS50 Thermo Scientific, USA) w trybie osłabionego całkowitego odbicia (ATR). Analizę przeprowadzono w zakresie pomiarowym 4000-500 cm^{-1} z rozdzielczością 4,0 cm^{-1} . Liczba skanów dla akwizycji linii bazowej i spektralnej wynosiła 32, zastosowano detektor DTGS ATR wyposażony w diament. Przed wykonaniem analizy FTIR-ATR wykonano skan tła i kryształ diamentu oczyszczono alkoholem izopropylowym w celu zmniejszenia interferencji. Próbki (sproszkowany chitozan, liofilizowany GBE oraz zliofilizowane Ch(GB)NP) przygotowano do analizy FTIR-ATR w tych samych ilościach.

2.2.5. Określenie efektu cytotoksycznego GBE, ChNP oraz Ch(GB)NP wobec różnych linii komórkowych

2.2.5.1. Hodowle linii komórkowych

Linie komórek rakowych tj. komórek raka jajnika PEA1, komórek raka szyjki macicy HeLa i komórek prawidłowych tj. fibroblastów dziąsłowych HGF-1 hodowano i utrzymywano w odpowiedniej pożywce - RPMI-1640 i/lub DMEM/F-12 Ham wzbogaconej surowicą płodów cielęcych FCS (dodatek 10% do pożywki), L-glutaminą (200 U/ml) oraz antybiotykami – penicyliną (100 U/ml) i streptomycyną (100 $\mu\text{g/ml}$). Hodowle komórkowe były hodowane w inkubatorze z dwutlenkiem węgla (New Brunswick Galaxy® 170R CO_2 Incubator) w 37°C przy 90% wilgotności w atmosferze 5% CO_2 .

2.2.5.2. Test cytotoksyczności MTT (określenie żywotności komórek)

Komórki hodowano na płytkach 96-studzienkowych i inkubowano je z różnymi stężeniami nanocząstek chitozanu (ChNP), ekstraktem z *Ginkgo biloba* (GBE) i Ch(GB)NP. (w zakresie stężeń: 25–5000 $\mu\text{g/ml}$). Po dwukrotnym przepłukaniu komórek buforem PBS, do każdej studzienki dodano 100 μl pożywki zawierającej MTT (o stężeniu 0,5 mg/ml pożywki) i komórki inkubowano w temperaturze 37°C przez 4h. Pożywkę następnie usunięto, aby nie zakłócać utworzonych kryształów formazanu. Następnie do każdej studzienki dodano 100 μl DMSO w celu rozpuszczenia kryształów

formazanu i odczytano absorbancję rozpuszczonego niebieskiego formazanu przy długości fali 540 nm za pomocą czytnika mikroplątek Bio-Tek Synergy HT (Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, USA). Jako próbę ślepą użyto DMSO. Spadek gęstości optycznej, czyli pomiar żywotności komórek hodowanych z dodatkiem różnych ww. substancji odczytywano w odniesieniu do komórek inkubowanych w pożywce kontrolnej, które uznano za 100% żywotne.

2.2.6. Badania mikrobiologiczne (Wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego wzrost drobnoustrojów – bakterii i grzybów)

Do badań wykorzystano metodę MIC (Minimal Inhibitory Concentration) – metodę makrorozcieńczeń w oparciu o metodę opracowaną przez Kowalską-Krochmal i wsp. [343]. Technika rozcieńczenia w probówkach polega na wystawieniu drobnoustrojów w podłożu płynnym na działanie zmniejszających się stężeń środków zwalczających drobnoustroje, uzyskiwanych metodą seryjnych dwukrotnych rozcieńczeń. Mieszanina składająca się z drobnoustrojów, środka odżywczego i środka zwalczającego drobnoustroje jest inkubowana w temperaturze 35°C przez 16-20h. Najniższe stężenie zwalczające drobnoustroje tj. takie stężenie, przy którym nie pojawia się widoczny wzrost drobnoustrojów określa się jako minimalne stężenie hamujące (MIC).

Do badań mikrobiologicznych wykorzystano następujące szczepy bakterii: *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Enterococcus faecalis* ATCC 33186, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10259, *Saccharomyces cerevisiae* (firmy Lallemand Polska, Sp. z.o.o.).

Z 24-godzinnej hodowli redukcyjnej bakterii pobrano 3-5 kolonii, zaszczepiono 5 ml pożywki MHB (Müller Hilton II Broth). Zaszczepione pożywki inkubowano 24h w 35±1°C. Następnie rozcieńczono hodowlę do otrzymania zawiesiny bakterii o stężeniu 0,5 w skali McFarlanda. Inokulum otrzymano rozcieńczając zawiesinę 0,5 w skali McFarlanda w bulionie MHB w stosunku 1:100.

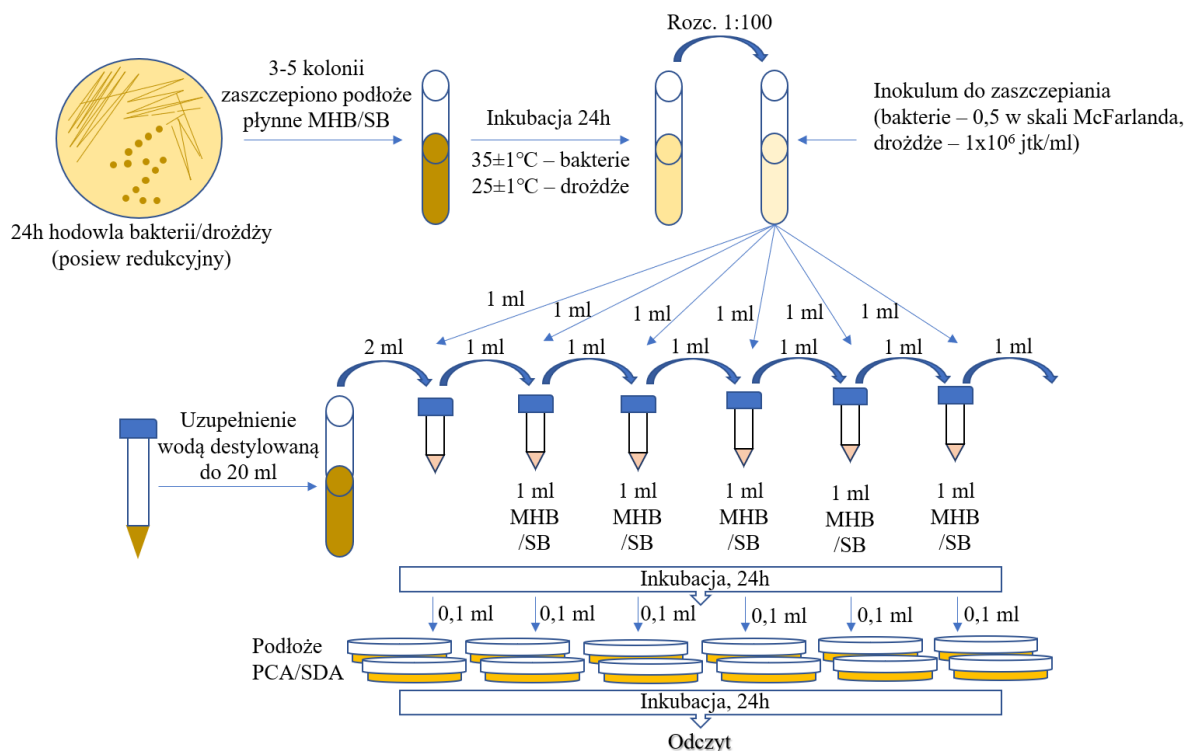
Inokulum zawiesiny drożdży przygotowano zawieszając w pożywce płynnej (Sabourauda z dodatkiem 4% glukozy) kolonie pobrane z hodowli na agarze do otrzymania stężenia 1×10^6 jtk/ml (inkubacja 24h w temperaturze 25±1°C)

Próbki w ilości 5 ml każda Ch(GB)NP (stężenie wyjściowe 24,2 mg/ml), ChNP (stężenie wyjściowe 17,2 mg/ml) oraz GBE (ekstrakt o stężeniu 10% w/v) uzupełniono wodą destylowaną do objętości 20 ml. Następnie wykonano szereg rozcieńczeń dwukrotnych.

Przygotowane szeregi rozcieńczeń roztworów rozlano do probówek po 1 ml i do każdej dodano po 1 ml inokulum drobnoustrojów. Jako kontrolę pozostawiono zaszczipioną drobnoustrojami pożywkę bulionową z 1 ml wody destylowanej. Inkubację prowadzono 24h w temperaturze $25\pm 1^\circ\text{C}$ dla *Saccharomyces cerevisiae* oraz w temp. $35\pm 1^\circ\text{C}$ dla pozostałych drobnoustrojów. Badania MIC przeprowadzono w następujących zakresach stężeń dla poszczególnych prób: GBE (750-24000 $\mu\text{g/ml}$), ChNP (150-4840 $\mu\text{g/ml}$) i Ch(GB)NP (100-3270 $\mu\text{g/ml}$).

O wzroście drobnoustrojów świadczy pojawienie się zmętnienia lub osadu w bulionie. Ponieważ roztwory badane w połączeniu z pożywką bulionową powodowały zmętnienie i osad uniemożliwiający odczyt wyniku, ocenę wzrostu dokonano przez wysiew hodowli płynnych na podłoże agarowe. Hodowle płynne w ilości 0,1 ml wylano na płytki Petriego i zalano pożywką agarową PCA dla bakterii i SDA dla drożdży. Po 24h inkubacji (w takich samych warunkach jak dla inkubacji pożywek płynnych) wzrost drobnoustrojów na płytkach oceniano przez porównanie ze wzrostem na kontroli. Jako MIC przyjęto najniższe stężenie substancji aktywnej, przy którym wzrost drobnoustrojów był wyraźnie niższy niż na kontroli.

Schemat ideowy wyznaczania MIC (minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii i drożdży) przedstawiono na Rys. 25.



Rys. 25 Schemat ideowy wyznaczania MIC (minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii i drożdży)

2.2.7. Przygotowanie funkcjonalnych tekstyliów

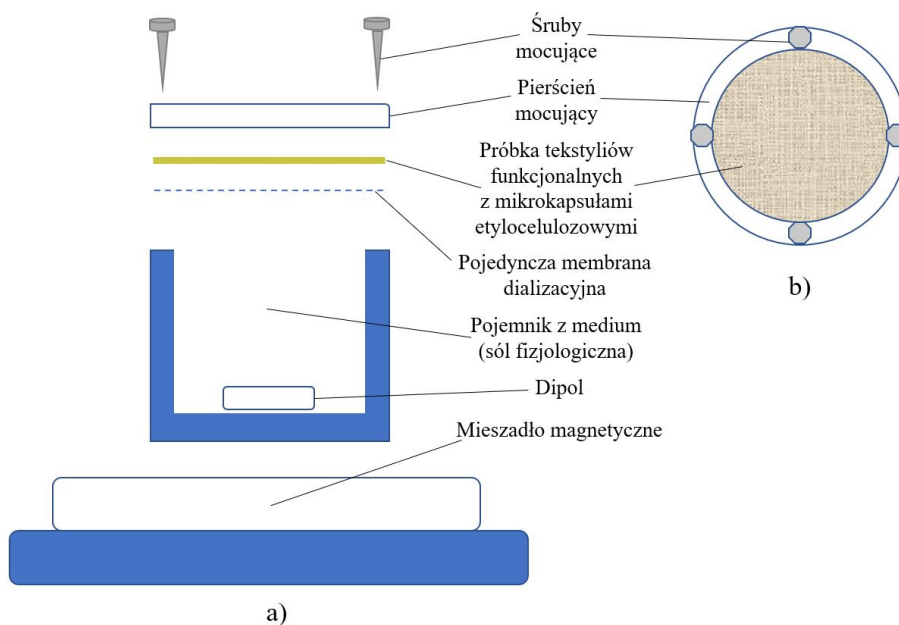
Do badań użyto handlowej dzianiny bawełnianej, którą poddano praniu w płatkach mydlanych w celu usunięcia wykończenia (wprowadzonego w trakcie kąpieli wykańczającej). Z wysuszonej dzianiny wycięto koła o średnicy 45 mm. Przygotowano klej chitozanowy [1% (w/w) wodny roztwór chitozanu w 1% kwasie octowym] oraz 1% (w/v) wodny roztwór TPP (związek sieciujący). Odważono naważki 0,025 g mikrokapsulek etylocelulozowych (z GBE oraz z Ch(GB)NP). Próbki bawełny umieszczono w kleju chitozanowym, następnie rozwałkowano wałkiem w celu pozbycia się nadmiaru kleju i przez sito o wielkości oczek 500 μm przesiano na próbkę bawełny naważkę mikrokapsulek. Całość spryskano TPP za pomocą aerografu w celu usieciowania i immobilizacji mikrokapsulek do dzianiny bawełnianej. Po 30 minutach od sieciowania próbki przepłukano trzy razy w wodzie destylowanej w celu pozbycia się nadmiaru TPP, nieusieciowanego kleju chitozanowego oraz nieprzymocowanych mikrokapsulek etylocelulozowych. Próbki pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej.

2.2.8. Badania przenikania nanocząstek przez pory w błonie dializacyjnej w medium soli fizjologicznej

Badania przenikania przeprowadzono stosując próbki nanocząstek, mikrokapsulek etylocelulozowych z GBE oraz z Ch(GB)NP (0,05g) oraz dzianinę bawełnianą z immobilizowanymi mikrokapsułkami etylocelulozowymi z nanocząstkami chitozanowymi. Poszczególne próby umieszczono w rękawie dializacyjnym o wielkości porów dla cząstek o masie cząsteczkowej ok. 3,5 kDa, oba końce rękawa z regenerowanej celulozy dokładnie zamknięto i zabezpieczono przed wydostaniem się próbek. Próbki w rękawach umieszczono w zlewce zawierającej 100 ml soli fizjologicznej. Zlewki z próbkami umieszczono na mieszadle magnetycznym, mieszano z prędkością 100 rpm w temperaturze 33°C przez 72h. Następnie rękaw z próbką usunięto, sól fizjologiczną zatężono do objętości 15 ml i poddano badaniom na aparacie Zetasizer Nano ZS celem sprawdzenia obecności nanocząstek, które przeniknęły przez pory w rękawie dializacyjnym do medium badawczego.

2.2.9. Badania przenikania i uwalniania nanocząstek oraz ekstraktu z *Ginkgo biloba* z przygotowanych tekstyliów funkcjonalnych

Do badań wykorzystano metodę z zastosowaniem specjalistycznych pojemników do mocowania tekstyliów i pojedynczej membrany dializacyjnej o wielkości porów dla cząstek o masie cząsteczkowej ok. 3,5 kDa (imitującej powłokę skórną). Przygotowano 50 ml soli fizjologicznej jako medium badawcze. W okrągłych pojemnikach o średnicy 50 mm umieszczono sól fizjologiczną oraz dipol, tak, aby uzyskać menisk wypukły. Następnie nałożono na wierzch membranę dializacyjną \varnothing 45 mm, na membranę naniesiono próbkę tekstyliów funkcjonalnych o takiej samej średnicy (mikrokapsuły od strony membrany dializacyjnej). Na koniec na górze zamocowano pierścień przytrzymujący próbkę i membranę w prawidłowej pozycji. Pojemnik z próbką i medium badawczym umieszczono na mieszadle magnetycznym, mieszano z prędkością 100 rpm w temperaturze 33°C przez 72h. Następnie membranę z próbką ostrożnie usunięto, sól fizjologiczną zatężono do objętości 15 ml i poddano badaniom na aparacie Zeta Sizer celem sprawdzenia obecności nanocząstek, które przeniknęły przez pory w membranie dializacyjnym do medium badawczego. Ponadto sprawdzono zawartość uwolnionego ekstraktu za pomocą techniki spektrofotometrycznej UV-VIS (dla pików charakterystycznego dla rutyny). Schemat ideowy przedstawiono na Rys. 26.



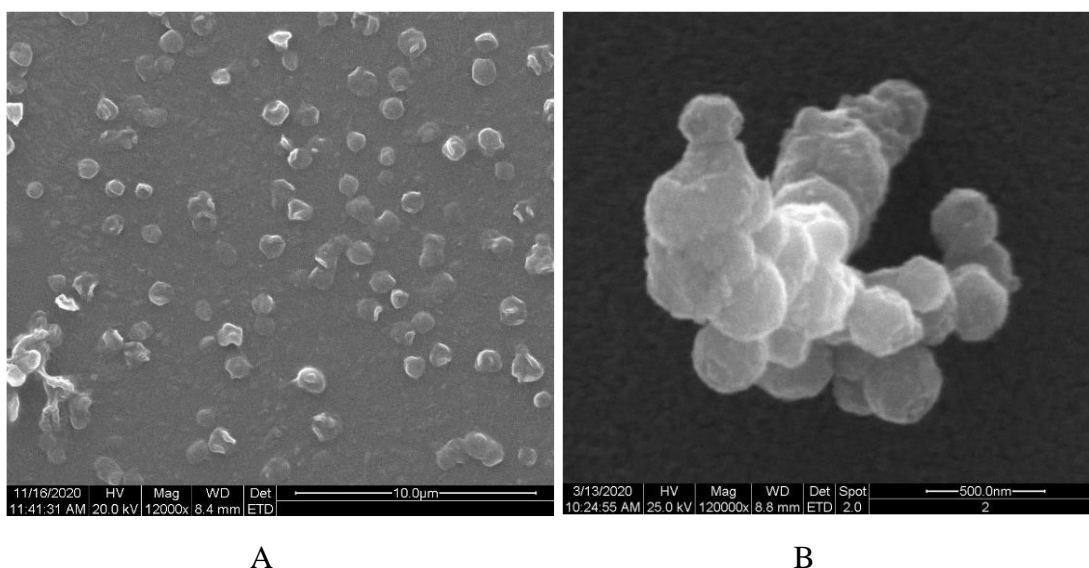
Rys. 26 Schemat ideowy badania przenikania nanocząstek oraz ekstraktu z *Ginkgo biloba* z przygotowanych tekstyliów funkcjonalnych z zastosowaniem specjalnych pojemników z solą fizjologiczną:

a) widok horyzontalny, b) widok z góry

3. Wyniki

3.1. Charakterystyka wielkości i kształtu uzyskanych Ch(GB)NP

Nanocząstki Ch(GB)NP będące nośnikiem GBE otrzymano metodą żelowania jonowego w wyniku reakcji pomiędzy dodatnio naładowanymi grupami $-NH_2$ chitozanu i ujemnie naładowanymi grupami środka sieciującego (TPP). Ekstrakt z miłorzębu japońskiego rozpuszczono w roztworze chitozanu, a następnie dodano TPP w celu umożliwienia enkapsulacji składnika aktywnego. Kształt i strukturę powierzchni Ch(GB)NP zobrazowano za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej – SEM (Rys. 27). Na obrazie SEM 27a część nanocząstek ma kształt dość sferyczny o regularnym brzegu, podczas gdy pozostałe są nieregularne i mają nierówne krawędzie. Rycina 27b przedstawia Ch(GB)NP jako agregat kilku kulistych i nieregularnych cząstek o nierównej powierzchni.



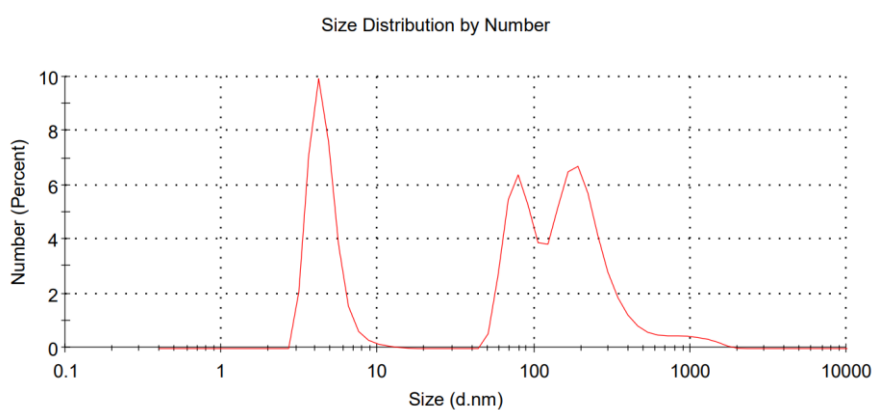
Rys. 27 Obrazy SEM Ch(GB)NP, A– przy powiększeniu 12000x i B – przy powiększeniu 120000x

Średnią średnicę i współczynnik polidispersyjności (PDI) badanych nanocząstek w medium wodnym oznaczono metodą dynamicznego rozproszenia światła (DLS), a wyniki przedstawiono w Tabeli 5.

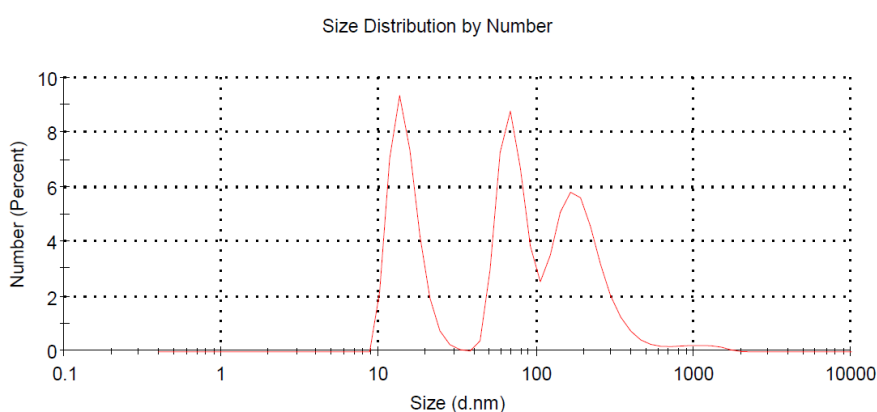
Tabela 5 Wielkość cząstek i wskaźnik polidispersyjności Ch(GB)NP (niepoddanych i poddanych sonikacji przez 5 i 10 minut)

Próbka	Czas sonikacji (min)	Rozmiar (nm)	PDI
Ch(GB)NP	-	454,2	0,549
Ch(GB)NP	5	374,9	0,512
Ch(GB)NP.	10	358,9	0,474

Średnia średnica Ch(GB)NP (bez wstępnej sonikacji) w badanej próbce wynosiła 454,2 nm. 5 minut sonikacji pozwala na zmniejszenie średniej średnicy nanocząstek do poziomu 374,9 nm, natomiast 10 minut sonikacji pozwala na uzyskanie nanocząstek o najmniejszej średniej średnicy – 358,9 nm. Współczynnik PDI maleje wraz z wydłużeniem czasu sonikacji, co świadczy o zmniejszeniu ilości frakcji nanocząstek. Najbardziej licznymi frakcjami w badanej próbce bez sonikacji były frakcje o średniej średnicy 4,6; 57,7; 86,3; 100,2; 221,7; 269,2; 316,9; 568,8; 712,4 i 835,3 nm. Na Rysunku 28a przedstawiono najliczniejsze frakcje w jednej serii pomiarów (frakcje o średniej średnicy 4,6, 86,3 i 269,2 nm). Rysunek 28b przedstawia z kolei najliczniejsze frakcje próbki po 10 minutach sonikacji podczas jednej serii pomiarowej (frakcje o średniej średnicy 14,87, 71,97 i 202,9 nm).



(a)

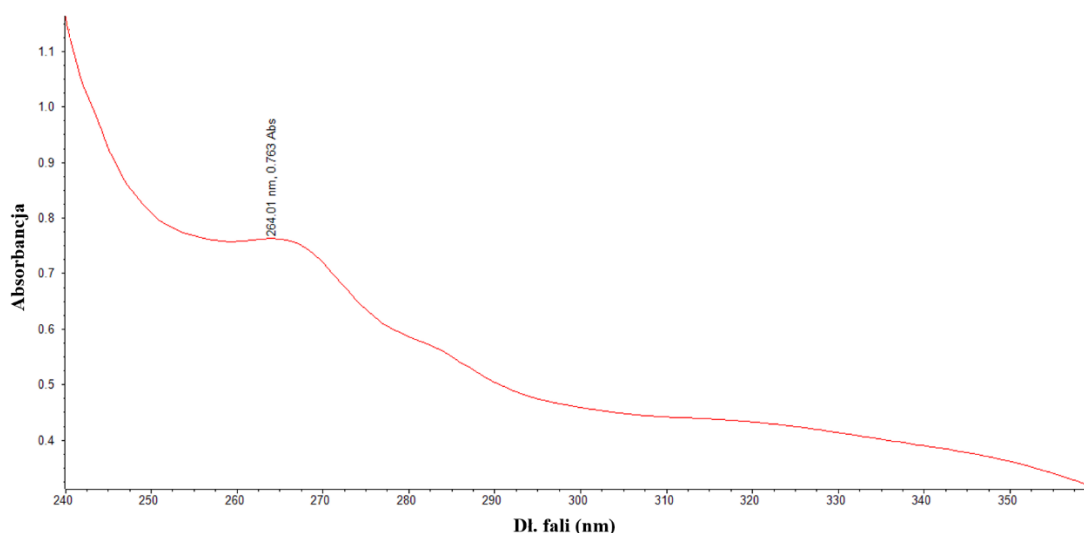


(b)

Rys. 28 Zależność intensywności od wielkości nanocząstek w badanej próbce Ch(GB)NP, (a) – bez wstępnej sonikacji), (b) – po 10-minutowej wstępnej sonikacji

3.2. Wydajność procesu enkapsulacji GBE w Ch(GB)NP

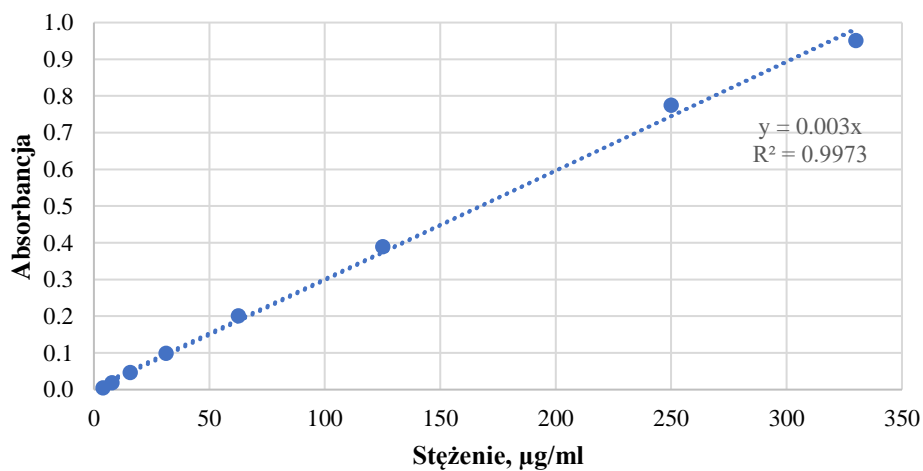
Do sprawdzenia wydajności procesu enkapsulacji a także określenia stopnia uwalniania GBE z nanocząstek zastosowano metodę spektrofometryczną UV-VIS. Krzywa kalibracyjna została wykonana dla wytypowanego ekstraktu z *Ginkgo biloba*. Wyniki absorbancji (zgodnie z prawem Lamberta-Beera) odczytano dla piku charakterystycznego dla rutyny w zakresie liczb falowych 257-270 nm⁻¹ (Rys. 29)



Rys. 29 Widmo UV-VIS z wyznaczonym charakterystycznym pikiem dla rutyny

Na Rys. 30 przedstawiono krzywą wzorcową dla ekstraktu z liści zielonych *Ginkgo biloba*.

Krzywa wzorcowa *Ginkgo biloba*

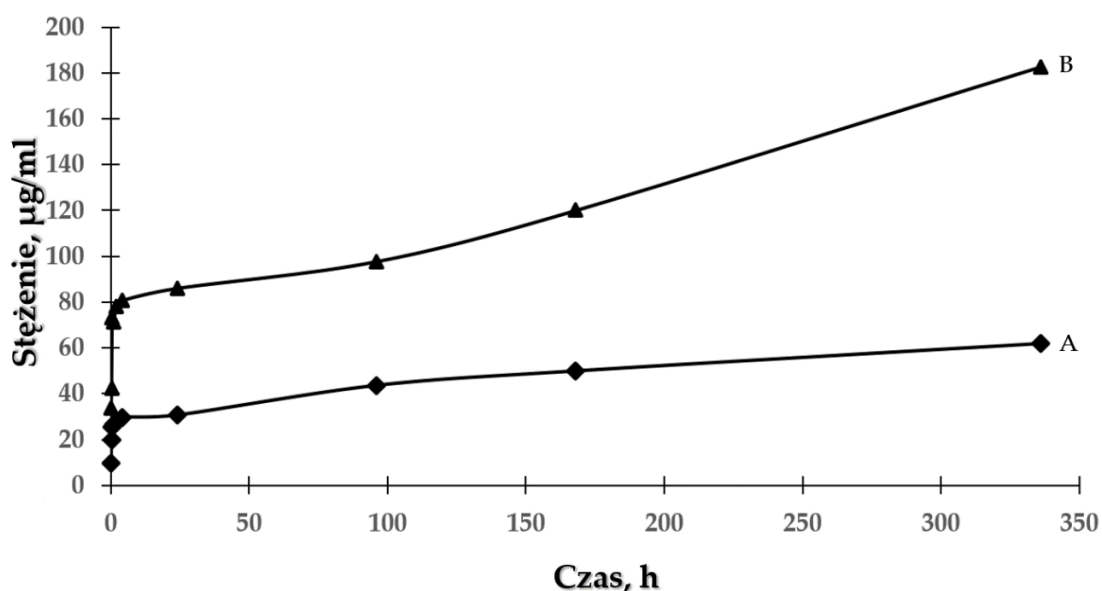


Rys. 30 Krzywa wzorcowa dla ekstraktu z liści zielonych *Ginkgo biloba*

W wyniku analizy stężenia ekstraktu *Ginkgo biloba* za pomocą techniki spektrofotometrycznej UV-Vis, przed i po enkapsulacji, średnia zamknięcia ekstraktu w nanocząsteczkach chitozanu z 5 pomiarów (5 niezależnych prób) wyniosła $53,93 \pm 1,62\%$.

3.3. Stopień uwalniania GBE z Ch(GB)NP

Przeprowadzono uwalnianie ekstraktu *Ginkgo biloba* z otrzymanych Ch(GB)NP w medium wodnym i w medium soli fizjologicznej w temperaturze 33°C . Stężenie uwolnionego materiału rdzenia określono metodą spektrofotometryczną w zakresie światła UV-VIS, badając absorpcję przy liczbie falowej z zakresu 257-270 nm charakterystycznego dla rutyny.



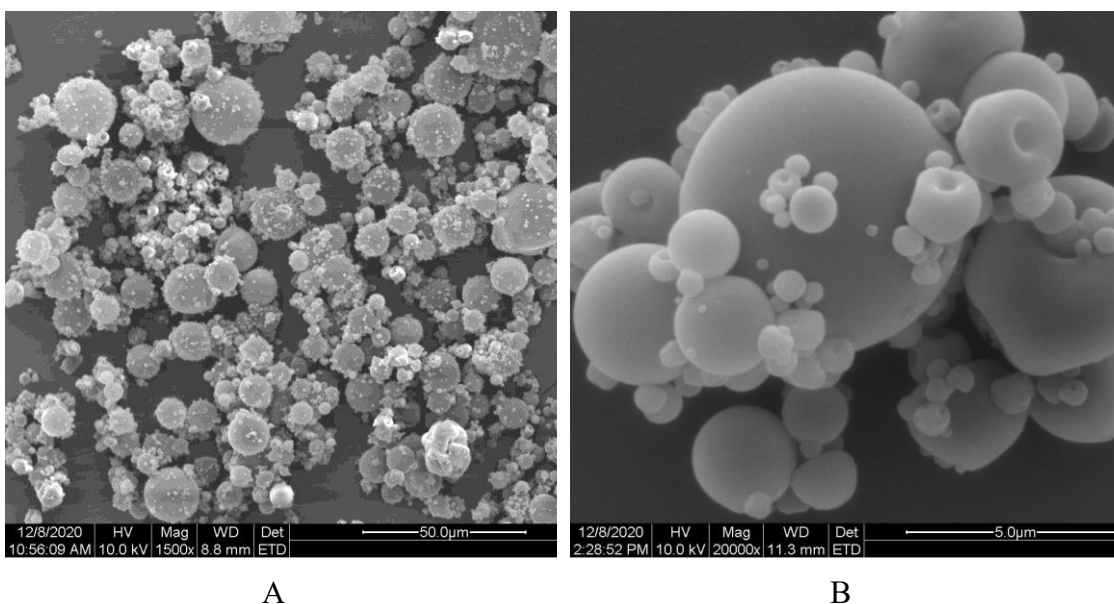
Rys. 31 Szybkość uwalniania ekstraktu *Ginkgo biloba* z Ch(GB)NP w wodzie – pH 7,0 (A) oraz w soli fizjologicznej – pH 5,8 (B)

Rys. 31 przedstawia krzywe uwalniania ekstraktu *Ginkgo biloba* z Ch(GB)NP. Na podstawie wyników przedstawionych na tym rysunku można stwierdzić, że nanocząstki zawierające ekstrakt z *Ginkgo biloba* charakteryzują się różną szybkością uwalniania materiału rdzenia w zależności od użytego medium. W ciągu pierwszych 24 godzin testu ekstrakt jest dość intensywnie uwalniany zarówno do środowiska wodnego jak również do soli fizjologicznej (stężenie uwalnianego ekstraktu w soli jest znacznie wyższe niż w wodzie). Po 24 godzinach ilość uwolnionego materiału rdzenia zmienia się nieznacznie stabilizując się w ośrodku wodnym i umiarkowanie zwiększając w soli fizjologicznej.

Intensywność uwalniania GBE jest większa w przypadku soli fizjologicznej niż w środowisku wodnym.

3.4. Charakterystyka mikroksułek alginianowych Al(Ch(GB)NP) oraz Al(GB)

Metodą żelowania jonowego otrzymano mikroksułki alginianowe zawierające Ch(GB)NP [Al(Ch(GB)NP)] lub ekstrakt z *Ginkgo biloba* – Al(GB). Do roztworu środka sieciującego chlorku wapnia wkroplono 5% roztwór zawierający nanocząstki Ch(GB)NP. Otrzymane mikroksułki z nanocząstkami miały barwę jasnobrązową. Na podstawie obrazów SEM (Rys. 32) można zaobserwować, że mikroksułki Al(Ch(GB)NPs) mają kulisty kształt i gładką, jednorodną powierzchnię.

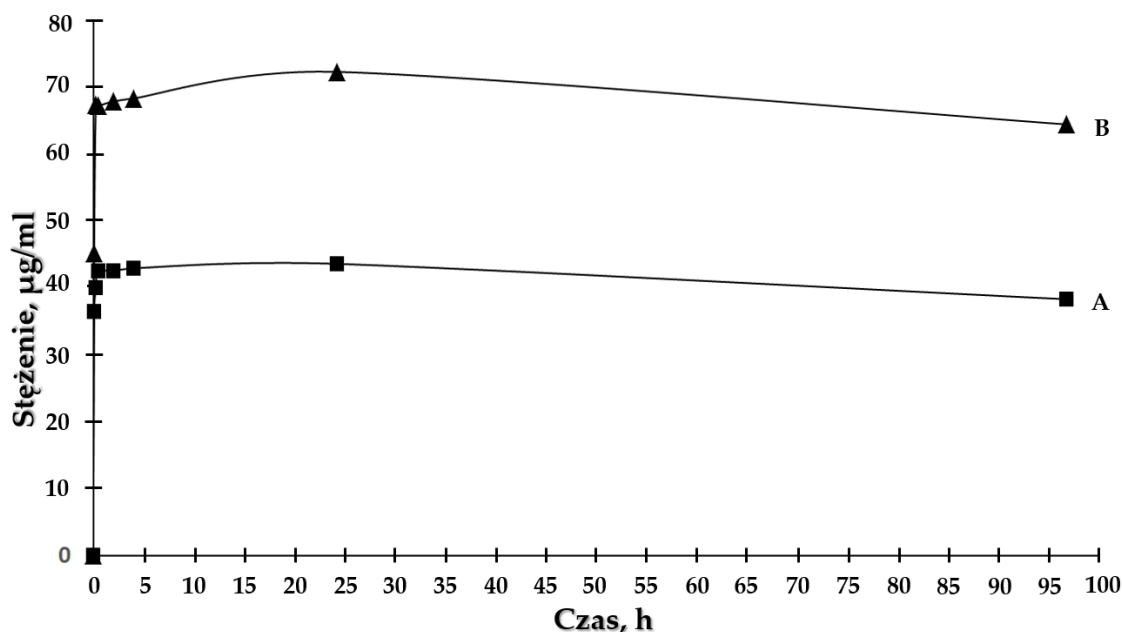


Rys. 32 Zdjęcia SEM Al(Ch(GB)NP przy powiększeniu 1500x (A) i 20000x (B)

3.5. Stopień uwalniania GBE z Al(GB) i Al(Ch(GB)NP)

3.5.1. Stopień uwalniania GBE z Al(GB)

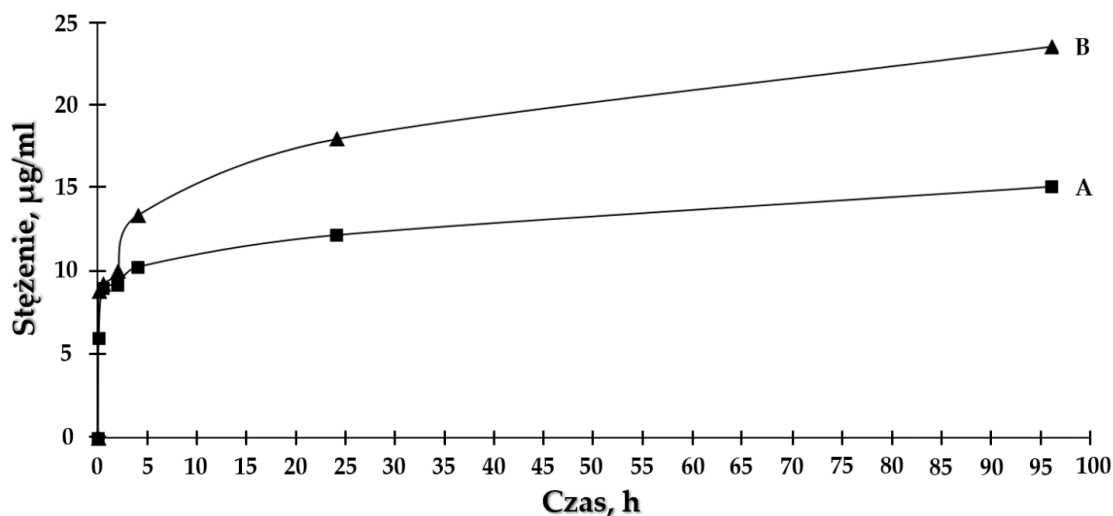
W przypadku mikroksułek Al(GB), które zawierają ekstrakt z *Ginkgo biloba*, następuje szybkie uwalnianie materiału rdzenia, które nieznacznie maleje w kolejnych godzinach testu (Rys. 33). Również w tym przypadku można zaobserwować intensywniejsze uwalnianie materiału rdzenia ekstraktu w medium soli fizjologicznej. Jest to prawdopodobnie związane z lepszą rozpuszczalnością ekstraktu *Ginkgo biloba* w soli fizjologicznej niż w wodzie. (Rys. 33).



Rys. 33 Szybkość uwalniania ekstraktu *Ginkgo biloba* z Al(GB) w wodzie (A) i soli fizjologicznej (B)

3.5.2. Stopień uwalniania GBE z Al(Ch(GB)NP)

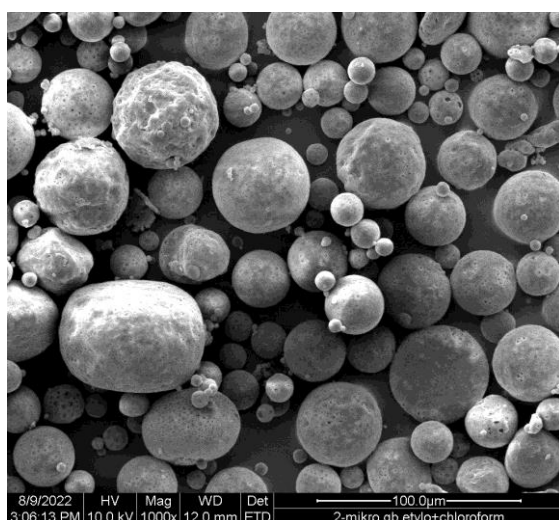
Na podstawie wyników przedstawionych na Rys. 34 można zaobserwować, że proces uwalniania GBE z Al(Ch(GB)NP) ma tendencję wzrostową w trakcie całego badania. Intensywne uwalnianie jest w ciągu pierwszych 24h, potem uwalnianie się stabilizuje, ale nadal w spowolniony sposób rośnie. Intensywność uwalniania materiału rdzenia, podobnie jak w przypadku z Ch(GB)NP i Al(GB), jest wyższa dla soli fizjologicznej. W odniesieniu do krzywych uwalniania ekstraktu z Al(GB), uwalnianie z Al(Ch(GB)NP) jest na niższym poziomie w obu mediach badawczych.



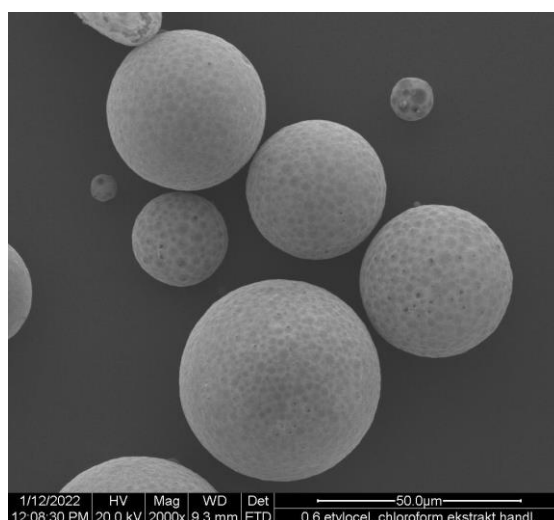
Rys. 34 Szybkość uwalniania ekstraktu *Ginkgo biloba* z Al(Ch(GB)NP) w wodzie (A) i soli fizjologicznej (B)

3.6. Charakterystyka mikrokapsulek etylocelulozowych Et(Ch(GB)NP) oraz Et(GB)

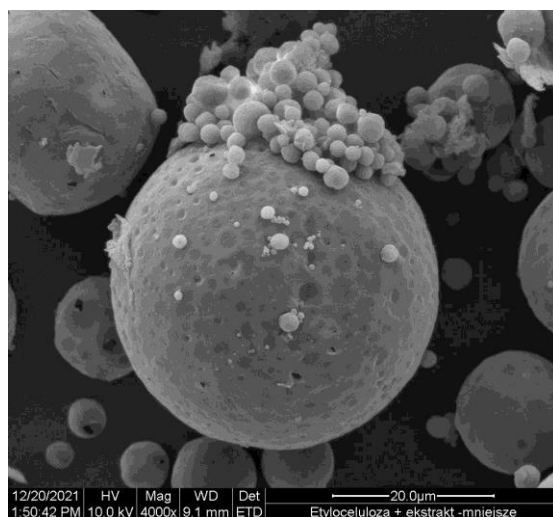
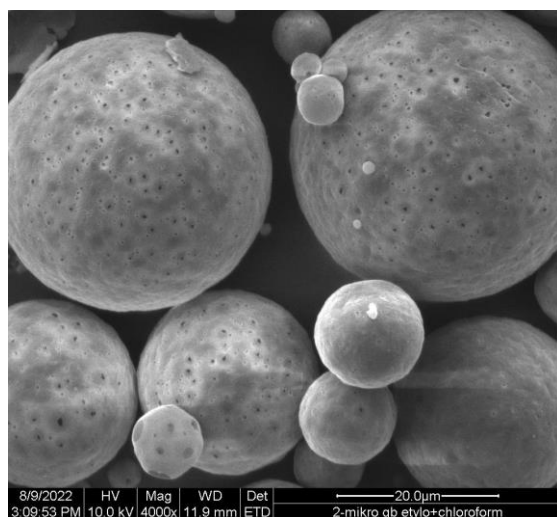
Mikrokapsułki etylocelulozowe z GBE – Et(GB) oraz z Ch(GB)NP – Et(Ch(GB)NP) uzyskano metodą emulsyjną z odparowaniem rozpuszczalnika. Otrzymane kapsułki zobrazowano za pomocą techniki SEM. Przedstawione Et(GB) są kuliste z dość gładką powierzchnią z licznymi widocznymi porami (Rys. 35), natomiast Et(Ch(GB)NP) są kapsułkami o bardzo nieregularnym kształcie z chropowatą i szorstką powierzchnią (Rys. 36).



A

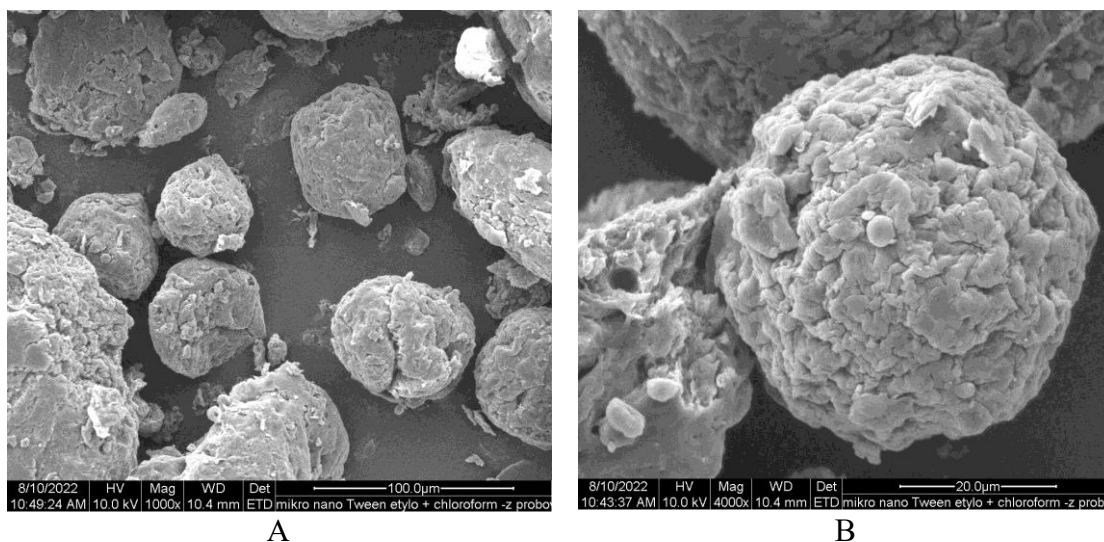


B



C

Rys. 35 Zdjęcia SEM Et(GB) przy powiększeniu 1000x (A), 2000x (B) i 4000x (C)

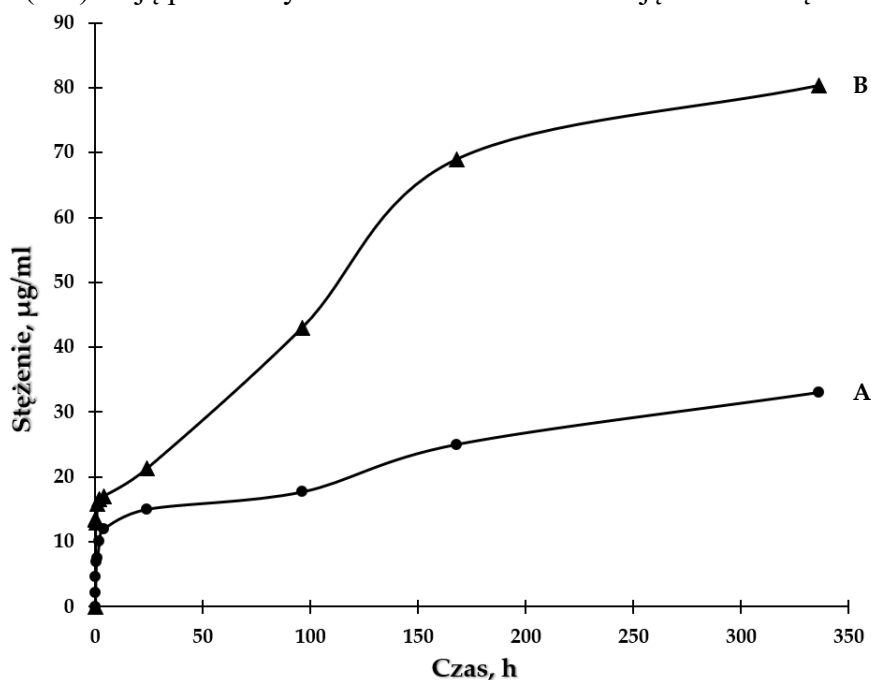


Rys. 36 Zdjęcia SEM Et(Ch(GB)NP) przy powiększeniu 1000x (A) i 4000x (B)

3.7. Stopień uwalniania GBE z Et(GB) i Et(Ch(GB)NP)

3.7.1. Stopień uwalniania GBE z Et(GB)

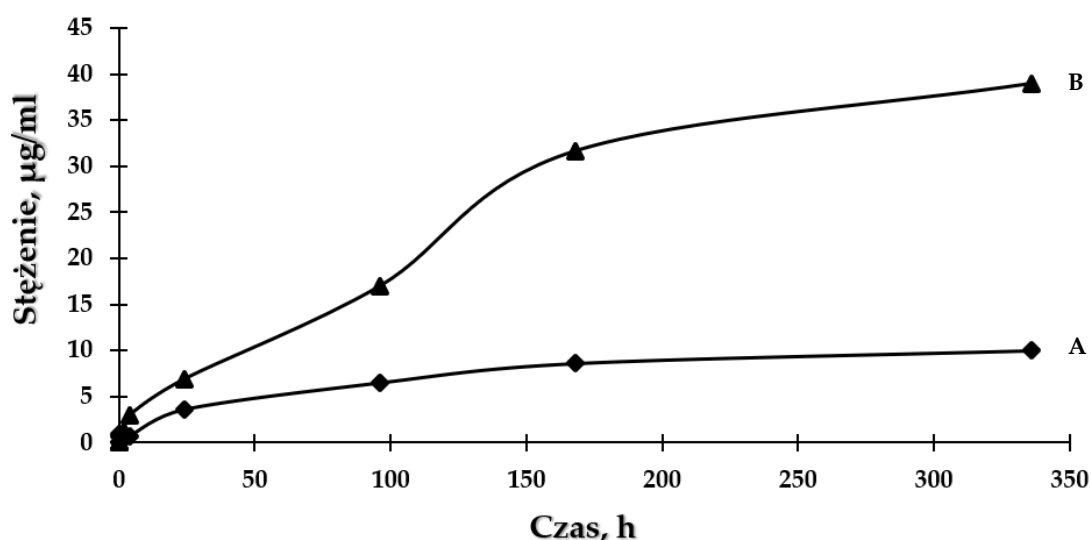
Analizując krzywe uwalniania ekstraktu z *Ginkgo biloba* z Et(GB) (Rys. 37) można zauważyć, że w ciągu 24h następuje intensywne uwalnianie materiału rdzenia. Następnie w kolejnych godzinach testu uwalnianie zmniejsza tempo, ale mimo to nadal rośnie. Również i w tym przypadku można zaobserwować intensywniejsze uwalnianie materiału rdzenia ekstraktu w medium soli fizjologicznej niż w wodzie. W przeciwieństwie do krzywych uwalniania GBE z Al(GB) do soli fizjologicznej i do wody, krzywe uwalniania GBE z Et(GB) mają przez cały czas trwania testu tendencję wzrostową.



Rys. 37 Szybkość uwalniania ekstraktu *Ginkgo biloba* z Et(GB) w wodzie (A) i soli fizjologicznej (B)

3.7.2. Stopień uwalniania GBE z Et(Ch(GB)NP)

Na podstawie wyników przedstawionych na Rys. 38 można zaobserwować, że proces uwalniania GBE z Et(Ch(GB)NP) ma również tendencję wzrostową w trakcie całego badania dla medium soli fizjologicznej [podobnie jak uwalnianie z Al(Ch(GB)NP) oraz Et(GB)]. Uwalnianie ekstraktu z Et(Ch(GB)NP) w ciągu 24h zachodzi w sposób dość intensywny, na podobnym poziomie do uwalniania z Al(Ch(GB)NP), ale na nieco niższym poziomie w porównaniu do uwalniania z Et(GB). Potem uwalnianie GBE z mikrokapsulek etylocelulozowych z nanocząstkami się stabilizuje i w medium wodnym zachodzi na stałym poziomie, natomiast w medium soli fizjologicznej nadal w powolny sposób rośnie.



Rys. 38 Szybkość uwalniania ekstraktu *Ginkgo biloba* z Et(Ch(GB)NP) w wodzie (A) i soli fizjologicznej (B)

3.8. Analiza FTIR-ATR nanocząstek chitozanowych

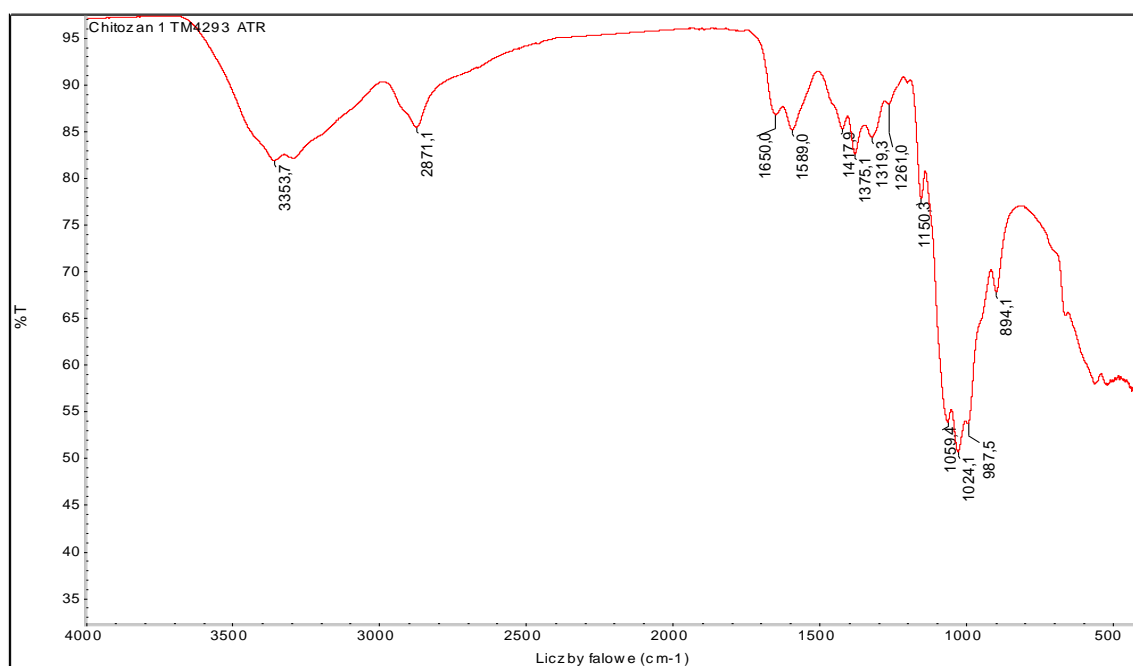
W wyniku analizy odbiciowej FTIR-ATR (Rys. 39) uzyskano widma dla badanych prób (czysty chitozan w postaci proszku, zliofilizowany ekstrakt z *Ginkgo biloba* oraz zliofilizowane nanocząstki chitozanowe z zamkniętym ekstraktem z *Ginkgo biloba* – Ch(GB)NP).

Widmo transmisyjne ekstraktu z *Ginkgo biloba* (Rys. 39A) posiada charakterystyczne pasma przypisane do wiązań rozciągających O–H z wiązaniem wodorowym przy liczbie falowej 3281 cm^{-1} , symetrycznych i asymetrycznych wiązań C–H przy 2924 cm^{-1} i 2861 cm^{-1} . Są również widoczne piki charakterystyczne dla wiązania C=O (pasmo rozciągające dla estru karbonylowego) przy 1694 cm^{-1} , wiązań

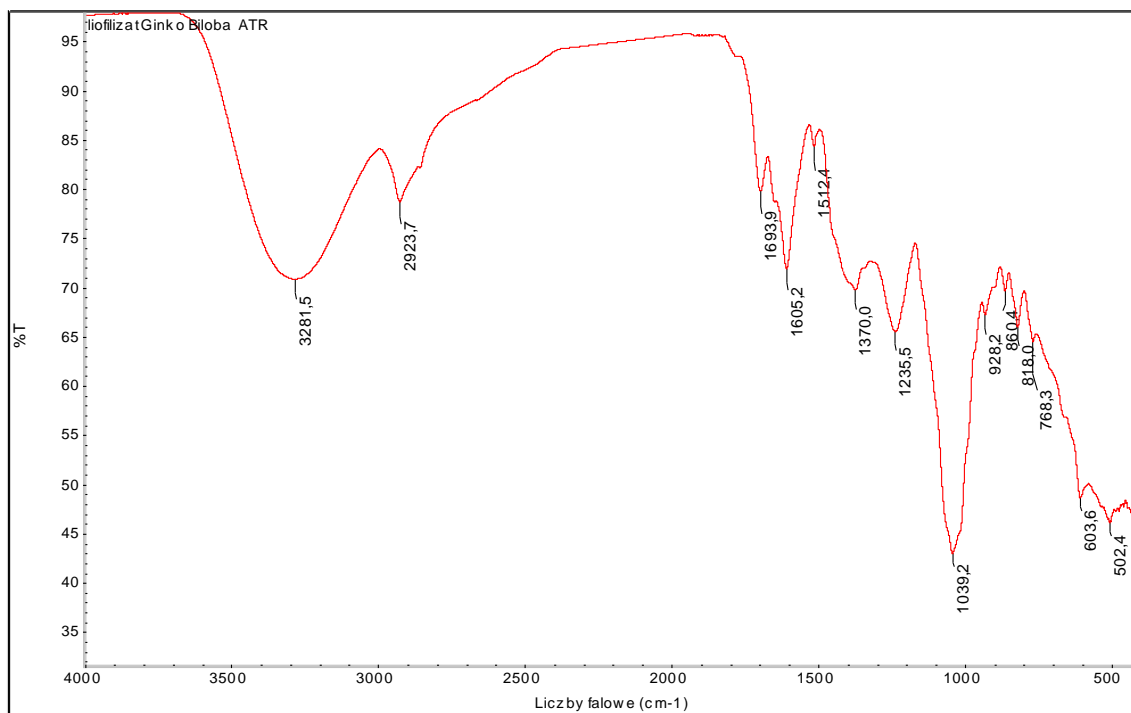
alifatycznych C–H przy 1512 i 1370 cm^{-1} , wiązań symetrycznych – 1235 cm^{-1} , wiązania rozciągającego C–O przy 1039 cm^{-1} .

W widmie czystego chitozanu (Rys. 39B) przy liczbie falowej 3354 cm^{-1} można zaobserwować pik charakterystyczny dla wiązań rozciągających O–H. Pasma przy 2871 cm^{-1} dla badanego polimeru przypisane są symetrycznym i asymetrycznym wiązaniom C–H. Przy 1650 cm^{-1} występuje charakterystyczne pasmo rozciągające wiązanie C=O w grupie N-acetylowej (amidu I), a przy 1589 cm^{-1} – pasmo charakterystyczne dla grupy aminowej (amidu II). Piki przy 1418 cm^{-1} i 1319 cm^{-1} charakteryzują się symetrycznymi deformacjami wiązań CH_2 i CH_3 . Widmo zawiera również typowe piki dla wiązań C–O–C, przy 1150 cm^{-1} dla wiązania glikozydowego oraz przy 1059 cm^{-1} dla pierścieniowego wiązania sacharydowego. Pasma obecne przy 894 cm^{-1} przypisano do grupy hydroksylowej.

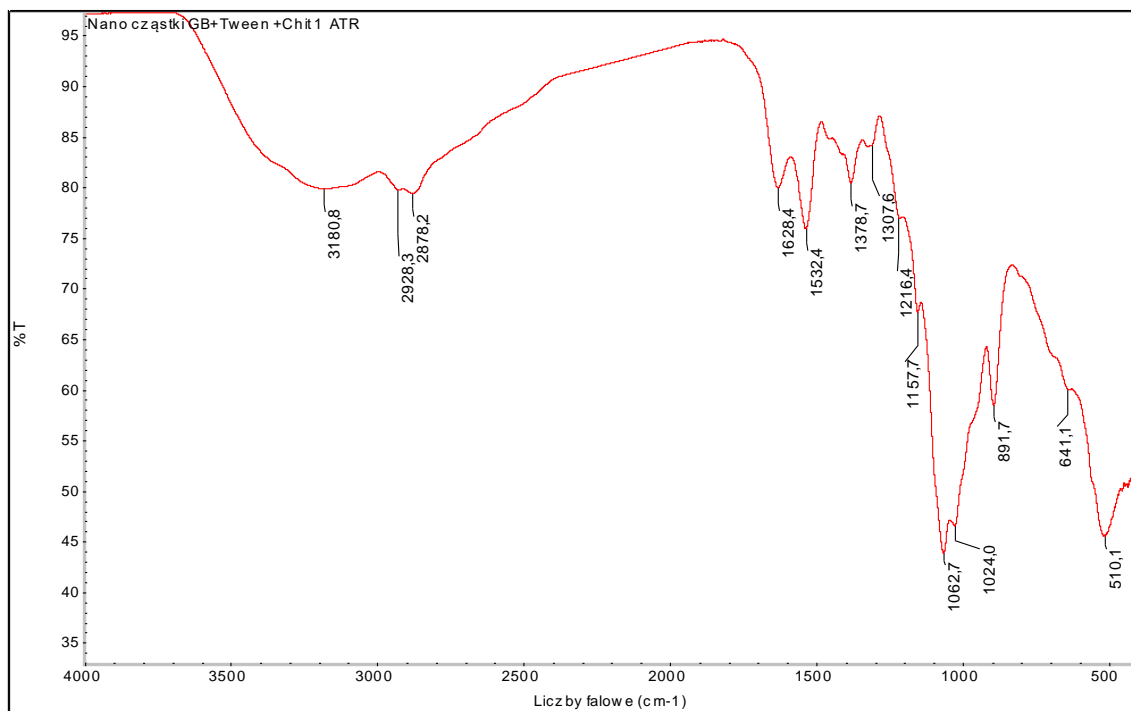
W przypadku widma FTIR-ATR dla Ch(GB)NP w odniesieniu do widm GBE i czystego chitozanu nie widać charakterystycznego piku dla ekstraktu zamkniętego w nanocząstkach chitozanu ze względu na nakładanie się kilku charakterystycznych pików dla wszystkich badanych składników (Rys. 39C).



A



B



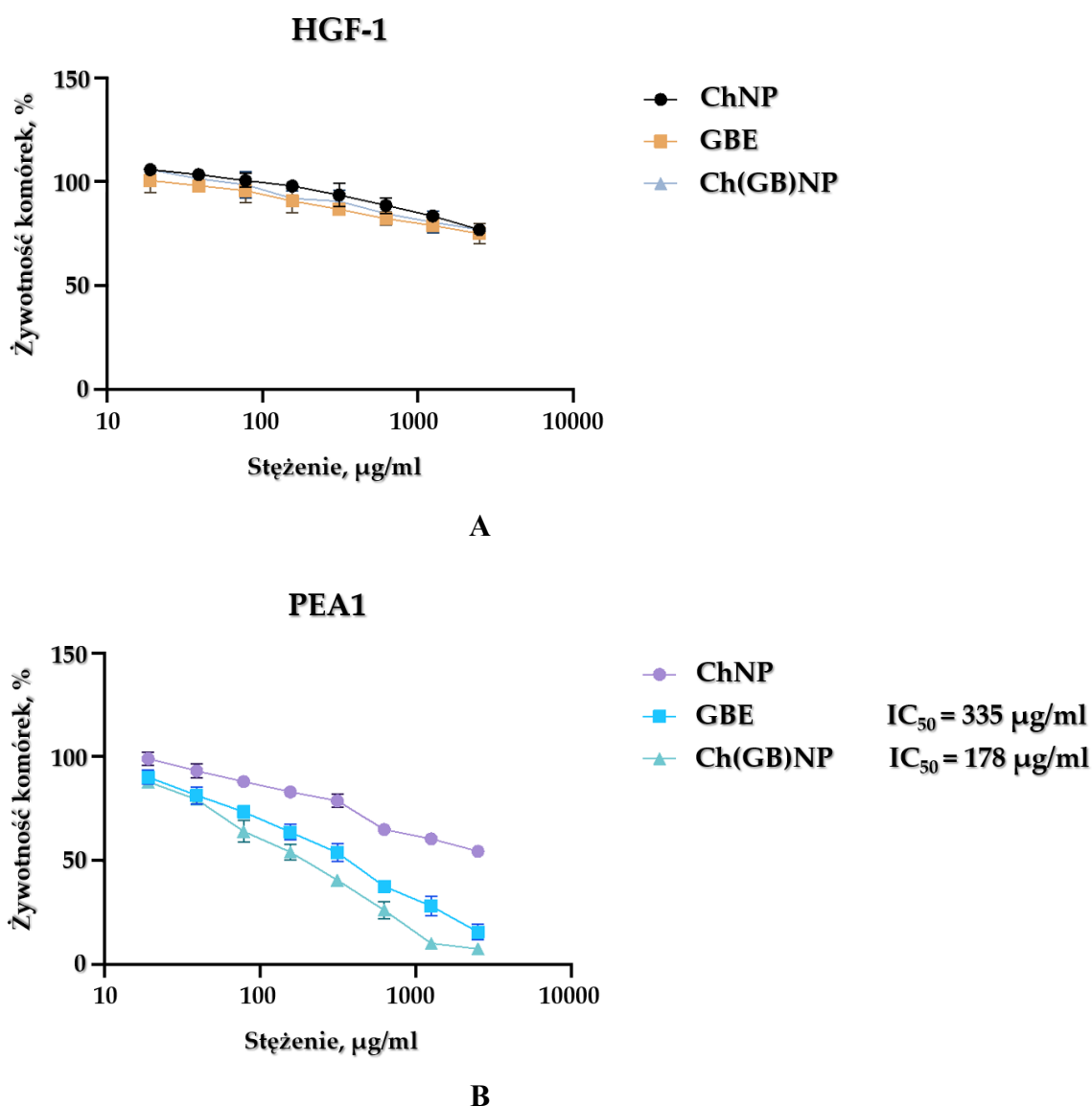
C

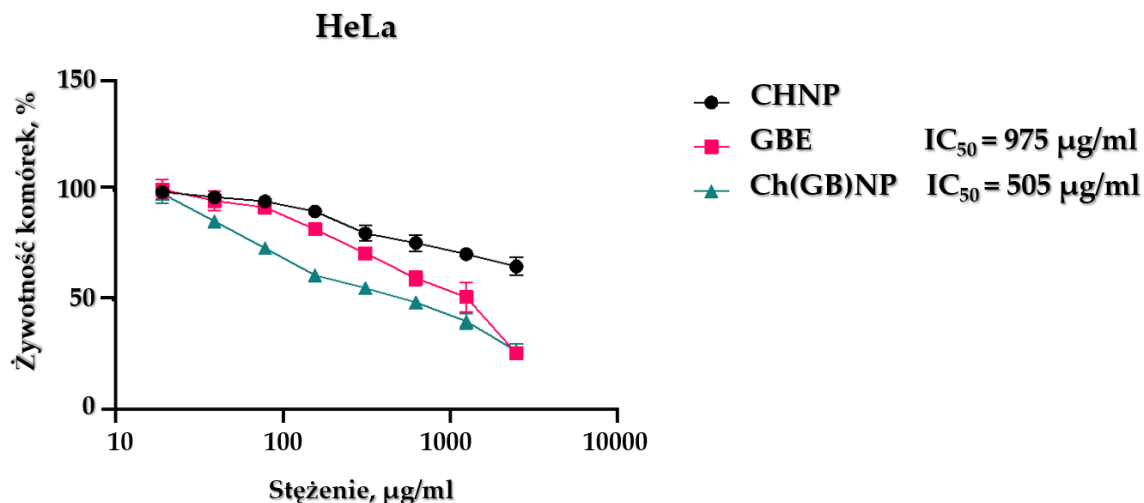
Rys. 39 Widma FTIR-ATR dla czystego proszku chitozanu (A), GBE (B) i Ch(GB)NP (C)

3.9. Badania oceny cytotoksyczności Ch(GB)NP

Badania cytotoksyczności wykazały umiarkowany efekt cytotoksyczny wobec linii komórek prawidłowych HGF-1 po potraktowaniu ich nanocząstkami chitozanowymi, ekstraktem z miłorzębu japońskiego oraz połączeniem nanocząstek chitozanu z GBE

w badanym zakresie stężeń (Rys. 40A). Z kolei wszystkie zastosowane kombinacje wykazały działanie cytotoksyczne wobec dwóch badanych linii komórek nowotworowych HeLa i PEA1. W przypadku linii komórek nowotworowych PEA1 zaobserwowano silniejsze działanie cytotoksyczne, dla GBE z IC_{50} wynosiło około 335 $\mu\text{g/ml}$, zaś dla Ch(GB)NP – $IC_{50}=178 \mu\text{g/ml}$ (Rys. 40B), co wskazuje na działanie synergistyczne (wzmacniające). Natomiast w przypadku komórek nowotworowych HeLa wykazano słabsze działanie cytotoksyczne po potraktowaniu ich nanocząstkami chitozanu. IC_{50} dla ekstraktu *Ginkgo biloba* wynosiło około 975 $\mu\text{g/ml}$, dla nanocząstek chitozanu w połączeniu z ekstraktem IC_{50} wynosiło około 505 $\mu\text{g/ml}$. Podobnie jak w przypadku PEA1, również w przypadku komórek HeLa zaobserwowano działanie wzmacniające nanocząstek z ekstraktem (Rys. 40C).





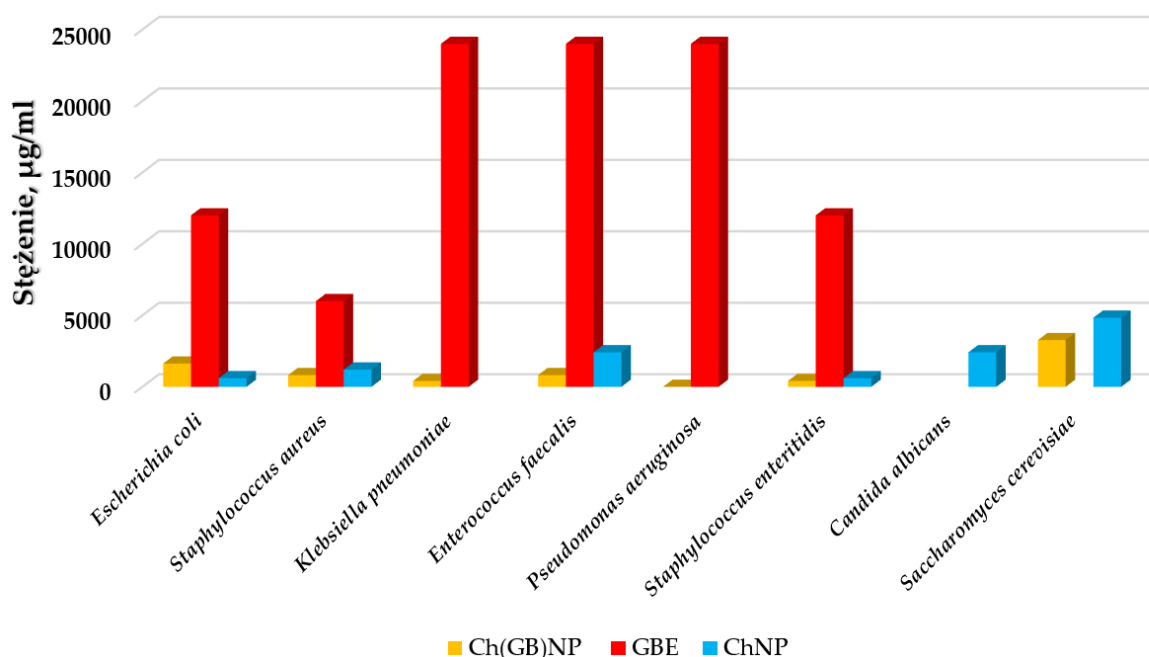
C

Rys. 40 Wpływ GBE, ChNP i Ch(GB)NP na żywotność komórek HGF-1 (A), PEA1 (B), i HeLa (C) (określoną w teście MTT po 24h); wartości przedstawiają średnie \pm odchylenie standardowe jako procent (%) kontroli

3.10. Badania mikrobiologiczne (wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego wzrost drobnoustrojów – bakterii i grzybów)

O wzroście drobnoustrojów świadczy pojawienie się zmętnienia lub osadu w pożywce płynnej. Ponieważ roztwory badane w połączeniu z bulionem powodowały zmętnienie i osad uniemożliwiające odczyt wyniku, ocenę wzrostu dokonano przez wysiew hodowli płynnych na podłoże agarowe. Przebadano próbki czystego ekstraktu (zatrąony 10% w/v wodny roztwór), pustych nanocząstek chitozanowych (o stężeniu 17,2 mg/ml) oraz nanocząstek z zamkniętym ekstraktem (o stężeniu 24,2 mg/ml) wobec 8 szczepów drobnoustrojów (6 szczepów bakteryjnych oraz 2 szczepów grzybów). Wyniki badań mikrobiologicznych zostały przedstawione na Rys. 41.

Minimalne stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów



Rys. 41 Minimalne stężenie GBE, ChNP i Ch(GB)NP hamujące wzrost drobnoustrojów (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus enteritidis*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*)

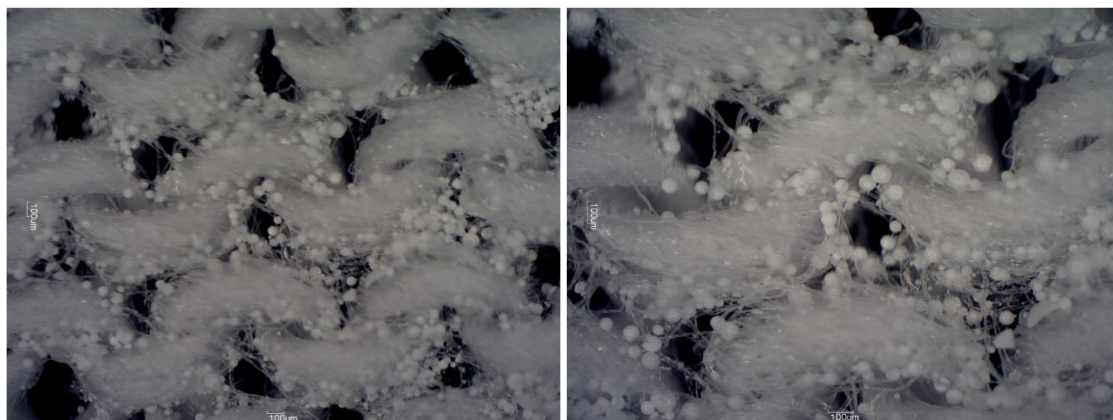
Czysty ekstrakt z *Ginkgo biloba* wykazał aktywność antybakteryjną (najsilniejszą wobec *Staphylococcus aureus* – z MIC dla stężenia 6000 µg/ml, pośrednią dla *Escherichia coli* i *Staphylococcus enteritidis* – z MIC przy stężeniu 12000 µg/ml, zaś najslabszą wobec *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* oraz *Pseudomonas aeruginosa* – z MIC przy stężeniu 24000 µg/ml). GBE nie wykazywał działania przeciw grzybom. ChNP wykazywały zarówno aktywność przeciwko bakteriom jak i grzybom (najsilniejszą wobec *Escherichia coli* i *Staphylococcus enteritidis* – z MIC przy stężeniu 610 µg/ml, mniej silną wobec *Staphylococcus aureus* – z MIC przy stężeniu 1210 µg/ml, słabszą dla *Enterococcus faecalis* i *Candida albicans* – z MIC przy stężeniu 2420 µg/ml i najslabszą dla *Saccharomyces cerevisiae* – z MIC przy stężeniu 4840 µg/ml). ChNP nie wykazywały aktywności mikrobiologicznej przeciwko *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa*. Z kolei Ch(GB)NP nie wykazywały aktywności tylko wobec *Candida albicans*. Natomiast wykazują aktywność mikrobiologiczną wobec reszty drobnoustrojów tj. począwszy od najsilniejszej wobec *Klebsiella pneumoniae* i *Staphylococcus enteritidis* – z MIC przy stężeniu 410 µg/ml, silnej wobec *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis* – z MIC przy stężeniu 820 µg/ml, słabszej wobec *Escherichia coli* – z MIC przy stężeniu 1630 µg/ml i najslabszej wobec

Saccharomyces cerevisiae – z MIC przy stężeniu 3270 $\mu\text{g/ml}$. Jest widoczny efekt wzmocnienia działania antybakteryjnego i antygrzybiczego w wyniku zastosowania nanocząstek z ekstraktem (z wyjątkiem *Escherichia coli*) w porównaniu do zastosowania pustych nanocząstek chitozanowych jak również samego ekstraktu.

3.11. Funkcjonalne tekstylia

3.11.1. Morfologia powierzchni funkcjonalnych tekstyliów

Wytworzono próbki funkcjonalnej bawełny z immobilizowanymi mikrokapsułami etylocelulozowymi. Otrzymano 2 rodzaje funkcjonalnych tekstyliów: dzianina bawełniana z mikrokapsułami z matrycą z etylocelulozy i rdzeniem w postaci nanocząstek z ekstraktem oraz mikrokapsuły z taką samą matrycą, ale innym rdzeniem – w formie czystego ekstraktu z *Ginkgo biloba*. Poniżej na Rys. 42 przedstawiono zdjęcie z mikroskopu optycznego powierzchni otrzymanej próbki funkcjonalnej bawełny.



A

B

Rys. 42 Obrazy z mikroskopu optycznego przedstawiające powierzchnię funkcjonalnej dzianiny bawełnianej z immobilizowanymi mikrokapsułami etylocelulozowymi z GBE, pow. 400x (A) i powierzchnię funkcjonalnej dzianiny bawełnianej z immobilizowanymi mikrokapsułami etylocelulozowymi z Ch(GB)NP, pow. 600x (B)

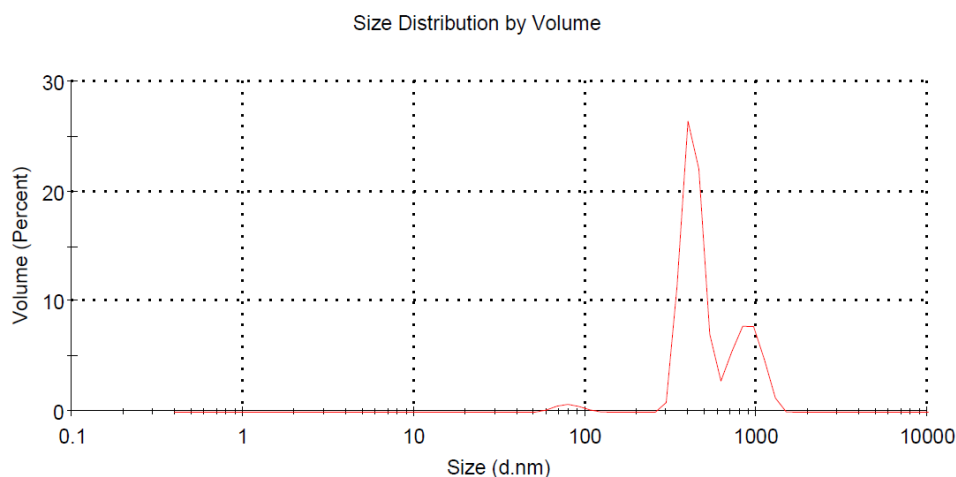
Na Rys. 16 na zdjęciach mikroskopowych są widoczne liczne kuliste, regularne mikrokapsuły z etylocelulozy z rdzeniem z GBE oraz z Ch(GB)NP, immobilizowane do dzianiny bawełnianej (widoczne charakterystyczne sploty).

3.11.2. Przenikanie nanocząstek przez pory w błonie dializacyjnej w medium soli fizjologicznej

Sprawdzono przenikanie nanocząstek z trzech prób (Ch(GB)NP, Et(Ch(GB)NP) oraz z funkcjonalnej bawełny z immobilizowanymi Et(Ch(GB)NP)) do medium soli

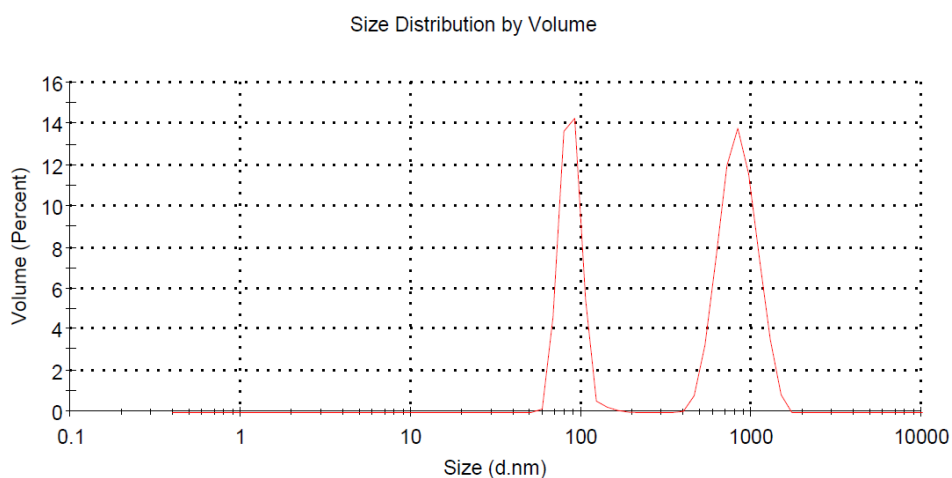
fizjologicznej przez błonę dializacyjną zgodnie z metodyką badawczą opisaną w punkcie 2.2.9. Próbki medium soli fizjologicznej poddano analizie z udziałem aparatu Zeta Sizer.

W próbce medium soli fizjologicznej, w której w temperaturze 33°C przez 72h była inkubowana próbka zliofilizowanych nanocząstek zaobserwowano obecność różnych wielkościowo frakcji Ch(GB)NP. W rozkładzie wielkości (w przeliczeniu na objętość próbki) zaobserwowano frakcje o średniej średnicy odpowiednio: 80,64; 427,90 oraz 883,20 nm (Rys. 43).



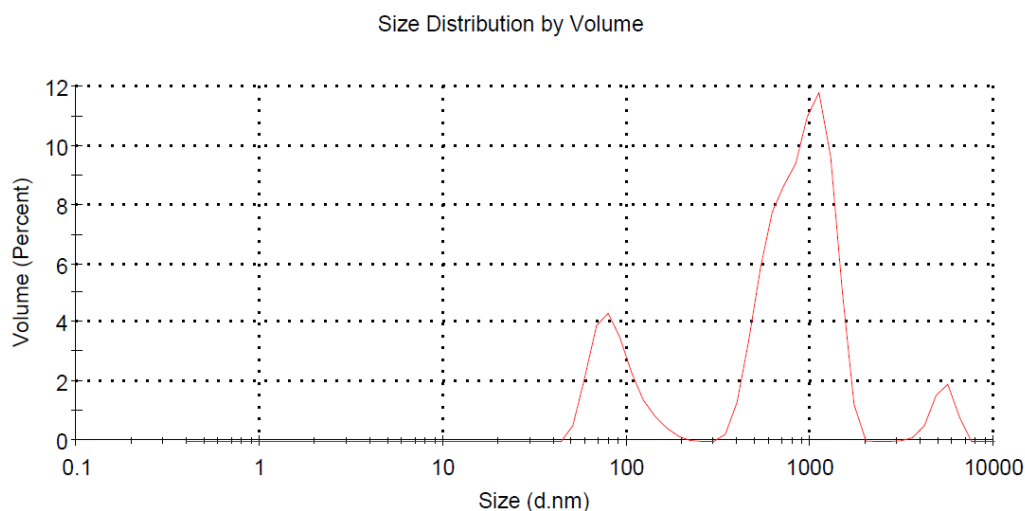
Rys. 43 Rozkład wielkości Ch(GB)NP w przeliczeniu na objętość badanego medium soli fizjologicznej, w której był umieszczony szczelnie zamknięty rękaw dializacyjny w określonej ilości zliofilizowanych nanocząstek

Z kolei w próbce soli fizjologicznej, w której w tych samych warunkach była inkubowana próbka mikrokapsuł z zamkniętymi nanocząstkami zaobserwowano obecność frakcji Ch(GB)NP o wielkości odpowiednio: 87,07 i 850,9 nm (Rys. 44).



Rys. 44 Rozkład wielkości Ch(GB)NP w przeliczeniu na objętość badanego medium soli fizjologicznej, w której był umieszczony szczelnie zamknięty rękaw dializacyjny w określonej ilości mikrokapsuł z zamkniętymi Ch(GB)NP

W ostatniej próbkę medium soli fizjologicznej, w której w warunkach jw. była inkubowana próbka funkcjonalnej dzianiny bawełnianej z immobilizowanymi mikrokapsułami etylocelulozowymi z Ch(GB)NP, stwierdzono obecność różnych frakcji nanocząstek oraz frakcję cząstek w skali mikro. W rozkładzie wielkości (w przeliczeniu na objętość próbki) zaobserwowano frakcje o średniej średnicy odpowiednio: 88,15 i 922,7 nm oraz frakcję mikrokapsulek o średniej średnicy 5,249 μm (Rys. 45).



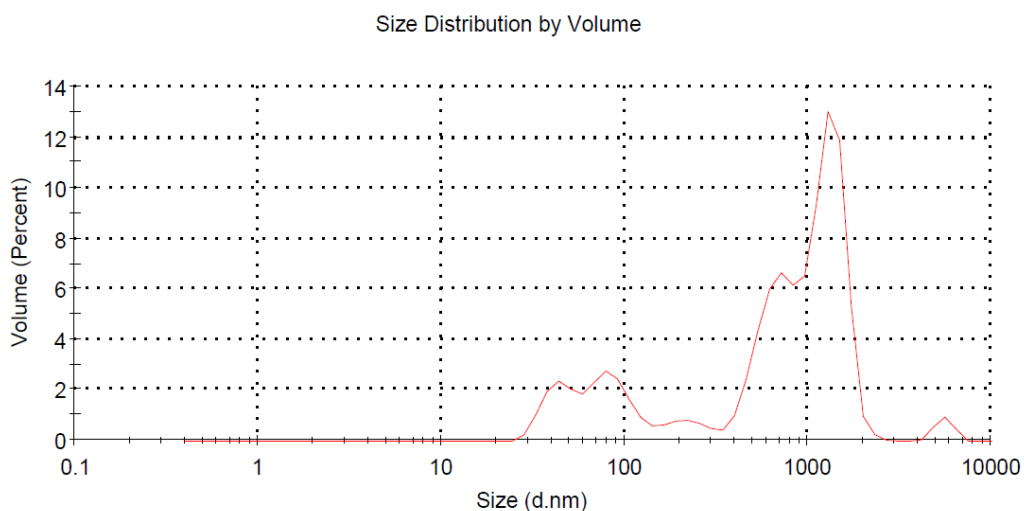
Rys. 45 Rozkład wielkości nanocząstek i mikrokapsulek w przeliczeniu na objętość badanego medium soli fizjologicznej, w której był umieszczony szczelnie zamknięty rękaw dializacyjny z próbką funkcjonalnej dzianiny bawełnianej z immobilizowanymi mikrokapsułami etylocelulozowymi z Ch(GB)NP

3.11.3. Określenie przenikania i uwalniania nanocząstek oraz ekstraktu z *Ginkgo biloba* z przygotowanych tekstyliów funkcjonalnych

Sprawdzono przenikanie nanocząstek z funkcjonalnej bawełny z immobilizowanymi Et(Ch(GB)NP)) do medium soli fizjologicznej przez błonę dializacyjną zgodnie z metodyką badawczą opisaną w punkcie 2.2.10. Określono również uwalnianie GBE metodą spektrofotometryczną w zakresie UV-VIS (dla pików charakterystycznych dla rutyny) z dwóch rodzajów próbek funkcjonalnych dzianin bawełnianych: z GBE oraz z Et(Ch(GB)NP). Próbki medium soli fizjologicznej poddano analizie z udziałem aparatu Zeta Sizer oraz analizie spektrofotometrycznej UV-VIS.

W próbkę medium soli fizjologicznej, nad którą w temperaturze 33°C przez 72h przy mieszaniu na mieszadle magnetycznym z prędkością 100 rpm była inkubowana próbka dzianiny bawełnianej z immobilizowanymi mikrokapsułkami etylocelulozowymi z nanocząstkami chitozanowymi zaobserwowano obecność różnych wielkościowo frakcji (w tym nanocząstki i mikrocząstki). W rozkładzie wielkości (w przeliczeniu na objętość

próbki) zaobserwowano frakcje o średniej średnicy odpowiednio: 222,0 nm; 646,9 nm – nanocząstki oraz 1,266 μm – mikrokapsułki) (Rys. 46).



Rys. 46 Rozkład wielkości nanocząstek i mikrokapsułek w przeliczeniu na objętość badanego medium soli fizjologicznej, nad którą była umieszczona folia dializacyjna z próbką funkcjonalnej dzianiny bawełnianej z immobilizowanymi mikrokapsułkami etylocelulozowymi z Ch(GB)NP

Przeprowadzono analizę spektrofotometryczną w zakresie światła UV-VIS dla dwóch prób mediów badawczych soli fizjologicznej celem wykrycia obecności i określenia stężenia ekstraktu z *Ginkgo biloba*. Wartości stężeń zostały wyliczone na podstawie krzywej wzorcowej dla ekstraktu z *Ginkgo biloba* (Rys 30) i odczytanej wartości absorbancji przypisanej do piksu charakterystycznego dla rutyny.

Stężenie ekstraktu w soli fizjologicznej (niezateżonej) w układzie z dzianiną bawełnianą z immobilizowanymi Et(GB) wynosiło 72,09 $\mu\text{g/ml}$ (czyli w całej próbce po upływie 72h inkubacji uwolniło się 3604,5 μg GBE). Z kolei w drugim układzie badawczym z zastosowaniem funkcjonalnej dzianiny z Et(Ch(GB)NP) stężenie ekstraktu w niezateżonej soli fizjologicznej wynosiło 27,6 $\mu\text{g/ml}$ (czyli w całej próbce po takim samym czasie inkubacji uwolniło się 1380 μg GBE).

4. Wnioski i dyskusja

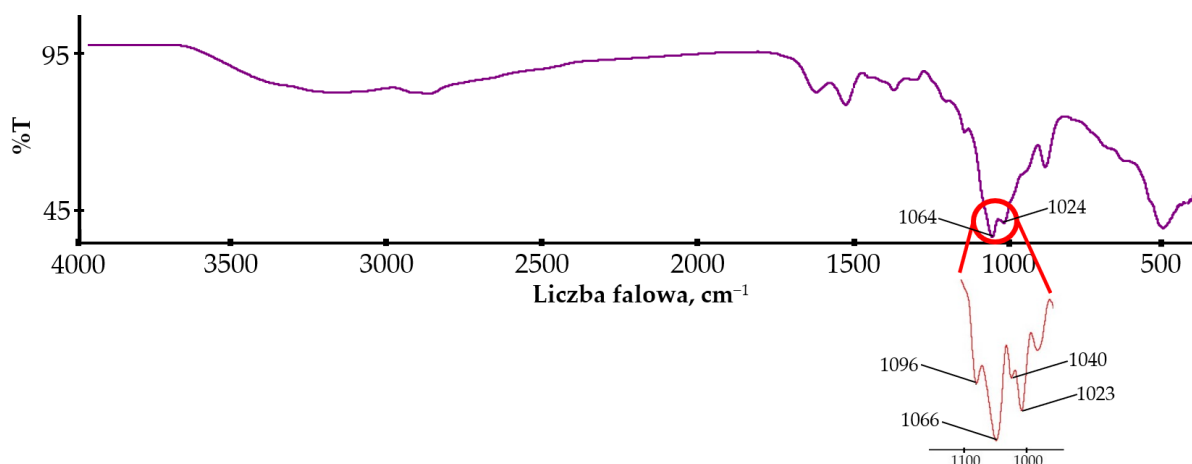
4.1. Ch(GB)NP

W badaniach w wyniku procesu żelowania jonowego otrzymano nanocząstki chitozanowe zawierające GBE o średniej średnicy 454,2 nm. Ch(GB)NP zostały scharakteryzowane pod względem wielkości i morfologii, kształtu i powierzchni za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej oraz analizy przy użyciu aparatu Zeta Sizer. Otrzymane frakcje nanocząstek pod względem wielkości odpowiadają tym nanocząsteczkom, które służą do podawania substancji aktywnych przez skórę. Patzelt

i wsp. zaobserwowali, że dla nanocząstek o wielkości w zakresie od 122 nm do 1000 nm w badaniach *in vitro* na modelu skóry wyizolowanej ze świńskiego ucha, nanocząstki o średniej średnicy 643 nm przenikały najdalej w głąb skóry za pośrednictwem mieszków włosowych (drogą transfolikularną) [198]. Abdel-Hafez i wsp., stosując technikę mikroskopii konfokalnej, udowodnili, że nanocząsteczki chitozanu znakowane FITC naniesione na powierzchnię skóry myszy wnikają w nią głęboko [344]. Najwięcej ChNP zaobserwowano w mieszkach włosowych, co potwierdza, że główną rolę w transdermalnej penetracji nanocząstek chitozanu odgrywa droga mieszkowa [55,344,345]. Zakłada się, że otrzymane nanocząstki chitozanu będą doskonałym nośnikiem substancji aktywnych wykorzystując drogę transdermalną jako drogę penetracji.

Do dalszych badań zostały użyte nanocząstki chitozanowe z zamkniętym ekstraktem z liści z *Ginkgo biloba* nie poddane procesowi sonikacji. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi proces sonikacji oprócz ujednoczenia frakcji nanocząstek pod względem wielkości powoduje również liczne uszkodzenia nanocząstek polimerowych takie jak powstawanie nieregularności oraz fragmentację ich powierzchni. Cho i wsp. udowodnili w swoich badaniach, że traktowanie ultradźwiękami nanocząstek z modyfikowanego chitozanu powoduje znaczną utratę materiału rdzenia tj. witaminy C [346].

Jednym z założeń przeprowadzonych badań było zamknięcie naturalnego ekstraktu GBE w nanocząstkach chitozanu. Uzyskano brązowo zabarwione Ch(GB)NP, co dowodzi, że ekstrakt z *Ginkgo biloba* został skutecznie zamknięty w nanocząstkach. Ponadto przeprowadzono analizę FTIR-ATR otrzymanych Ch(GB)NP. W wyniku dekonwolucji pików przy liczbie falowej 1024 cm^{-1} i 1064 cm^{-1} otrzymano piki przy liczbie falowej: 1) 1096, 2) 1066, 3) 1040 i 4) 1023 cm^{-1} , odpowiadające odpowiednio: 1) drganiom rozciągającym (symetrycznym i asymetrycznym) w grupie PO_3 w TPP; 2) i 3) drganiom rozciągającym C–O w GBE; 4) drganiom rozciągającym C–O w chitozanie (Rys. 47) [347].



Rys. 47 Widmo FTIR-ATR dla Ch(GB)NP z wykonaną dekonwolucją dla pików przy liczbie falowej 1024 i 1064 cm^{-1}

Wyniki pokazały, że ekstrakt GBE został pomyślnie zamknięty w nanocząsteczkach chitozanowych. Enkapsulacja ekstraktów roślinnych w naturalnych usieciowanych polimerach jest ważnym działem biomedycyny, zapewniającym wiele korzyści, np. zwiększoną stabilność naturalnych substancji czynnych, zrównoważone uwalnianie, zwiększoną stabilność leków, zapobieganie przedwczesnej degradacji substancji leczniczych, co skutkuje większą bioaktywnością nanocząstek i zapewnia terapię miejscową z niewielkimi skutkami ubocznymi [348,349].

Kinetykę uwalniania substancji czynnej z nanocząstek chitozanowych w dwóch mediach testowych (w wodzie – pH 7,0 i w soli fizjologicznej – pH 5,8) przeprowadzono za pomocą spektrofotometru UV-VIS. Oceniono profil uwalniania ekstraktu *Ginkgo biloba* z nanocząstek w środowisku zbliżonym do fizjologicznych płynów ustrojowych – w soli fizjologicznej. Ekstrakt w obu przypadkach ma tylko jedną barierę do pokonania (otoczkę z usieciowanego chitozanu), w związku (z czym uwalnianie GBE na początku zachodzi w szybszym tempie dla obu mediów), następnie uwalnianie w środowisku wodnym stabilizuje się w czasie. W przeciwieństwie do tego, w soli fizjologicznej uwalnianie w czasie umiarkowanie rośnie. Wynika to z faktu, że GBE w pierwszej kolejności uwalnia się z obrzeży nanocząstek. Następnie GBE przenika z głębszych warstw matrycy polimerowej do otaczającego medium badawczego, a powłoka polimerowa stanowi barierę dyfuzyjną, utrudniając i spowalniając szybkość przenikania ekstraktu do środowiska. Na podstawie badań kinetyki uwalniania materiału rdzenia z Ch(GB)NP można stwierdzić, że w obu przypadkach uwalnianie substancji czynnej odbywa się na drodze biernej dyfuzji. Mechanizm uwalniania ekstraktów roślinnych z NP polega na:

(a) uwalnianiu związków aktywnych związanych w warstwie powierzchniowej matrycy polimerowej nanocząstek;

(b) dyfuzji przez pęcznienie matrycy;

(c) uwalnianiu ekstraktu w wyniku erozji polimeru, rozkładu, hydrolizy lub degradacji rusztowania polimerowego, co skutkuje długotrwałym uwalnianiem leku [349].

Potwierdzono, że uwalnianie leku z nanocząstek chitozanowych charakteryzuje się procesem dwufazowym, gdzie początkowo następuje bardzo szybkie uwalnianie, a następnie wolniejsze, kontrolowane uwalnianie związków aktywnych do mediów badawczych takich jak bufor PBS, sól fizjologiczna, woda czy bufor HCl-TRIS [349-351]. Potwierdza to również schemat uwalniania uzyskany w przedłożonej pracy badawczej. Uwalnianie substancji czynnej z otoczki polimerowej jest regulowane przez jeden z następujących mechanizmów:

(a) powierzchnia nośnika leku ulega erozji;

(b) zrywanie wiązań na powierzchni lub w masie polimeru; lub

(c) dyfuzja zamkniętego ekstraktu.

W wielu przypadkach uwolnienie ekstraktu wiąże się z wykorzystaniem więcej niż jednego z wyżej wymienionych punktów [352].

Analizę kinetyczną uwalniania związków aktywnych (GBE) z nanocząstek chitozanu można przeprowadzić za pomocą modeli matematycznych: zerowego rzędu, pierwszego rzędu, modelu Higuchiego lub modelu Korsmeyera-Peppasa [353,354]. Najlepsze dopasowanie kinetyki wydzielania ekstraktu w roztworze soli fizjologicznej uzyskano dla modelu pierwszego rzędu (współczynnik regresji $R^2=0,9104$), a dla wydzielania zachodzącego w wodzie dla modelu Higuchiego ($R^2=0,9204$) (Tabela 6).

Tabela 6 Modele matematyczne i wartości współczynników regresji (R^2) uwalniania ekstraktu z miłorzębu japońskiego z Ch(GB)NP do obu mediów badawczych (woda i sól fizjologiczna)

Model matematyczny	Środowisko wodne	Środowisko soli fizjologicznej
Zerowego rzędu	0,8298	0,8823
Pierwszego rzędu	0,8552	0,9104
Higuchi	0,9204	0,8586
Korsmeyera-Peppasa	0,8608	0,8317

Kinetykę powolnego uwalniania w wyniku dyfuzji bada się za pomocą modeli zerowego, pierwszego rzędu i modelu Higuchiego [349,355-357]. Powolne

i kontrolowane uwalnianie ekstraktu z NP ma na celu utrzymanie dawki substancji czynnej w zakresie terapeutycznym. Dlatego ważne jest przygotowanie polimerowych systemów dostarczania leku, które mają profil uwalniania leku zerowego rzędu, w którym substancja czynna jest uwalniana równomiernie [349,358]. Jonassen i wsp. wykazali w swoich badaniach, że chitozan ma sztywną i rozciągniętą konformację w wodzie z powodu odpychania elektrostatycznego między dodatnio naładowanymi grupami aminowymi w łańcuchach chitozanu. Ładunki ulegają zredukowaniu, gdy zamiast wody jako medium zostaje użyty np. roztwór soli. Efekt ekranowania w środowisku soli fizjologicznej zmniejsza odpychanie elektrostatyczne między dodatnio naładowanymi grupami w łańcuchach chitozanu, a zatem łańcuchy te są bardziej elastyczne w medium soli [359]. Ponadto odczyn środowiska ma kluczowy wpływ na szybkość uwalniania substancji aktywnej z nanocząstek (woda – pH 7,0; sól fizjologiczna – pH 5,8). Potwierdza to wyniki badań dotyczące zwiększonego uwalniania ekstraktu *Ginkgo biloba* z Ch(GB)NP w soli fizjologicznej w stosunku do środowiska wodnego.

4.2. Badania cytotoksyczności i mikrobiologiczne

Test MTT jest czułym, ilościowym i wiarygodnym testem kolorymetrycznym oceniającym żywotność linii komórkowych, opartym na aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej obecnej w żywych komórkach, związanej z redukcją żółtego, rozpuszczalnego w wodzie bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowego (MTT) do ciemnoniebieskiego/purpurowego nierozpuszczalnego w wodzie formazanu. Efekt cytotoksyczny badano po raz pierwszy na różnych liniach komórkowych (HGF-1, PEA1 i HeLa). Badanie wykazało brak działania cytotoksycznego wobec prawidłowej linii komórkowej fibroblastów HGF-1 oraz efekt cytotoksyczny w stosunku do badanej linii nowotworowej – PEA1 po traktowaniu GBE, ChNP i Ch(GB)NP. Ekstrakt GBE wykazywał silne działanie cytotoksyczne na raka jajnika w badanym zakresie stężeń (25-5000 µg/ml) z $IC_{50}=335$ µg/ml. Silniejsze działanie cytotoksyczne wobec badanej linii nowotworowej potwierdzono dla Ch(GB)NP z $IC_{50}=178$ µg/ml. Z kolei dla komórek nowotworowych HeLa wykazano słabsze działanie cytotoksyczne przy $IC_{50}=975$ µg/ml dla ekstraktu GBE oraz przy $IC_{50}=505$ µg/ml dla nanocząstek Ch(GB)NP. Jest to efekt synergistycznego działania nanocząstek chitozanu i ekstraktu z *Ginkgo biloba*. Najmniejsze działanie cytotoksyczne wykazywały nanocząstki chitozanu bez ekstraktu. Interesującym aspektem wykonanego testu cytotoksyczności jest brak działania cytotoksycznego wszystkich badanych komponentów wobec linii komórek prawidłowych – ludzkich fibroblastów dziąsłowych

(HGF-1). Inne badania przeprowadzone przez Kim i wsp. wykazały, że GBE (EGb 761) nie ma działania cytotoksycznego na ludzkie fibroblasty w stężeniu 500 $\mu\text{g/ml}$ [360]. Wykazano, że niektóre składniki EGb 761 mają właściwości antyapoptotyczne [361]. Z drugiej strony Chao i wsp. wykazali cytotoksyczne działanie GBE na komórki ludzkiego raka wątrobowokomórkowego (HepG2 i Hep3B) z $\text{IC}_{50}=750 \mu\text{g/ml}$ w badanym zakresie stężeń (0–1000 $\mu\text{g/ml}$) [361]. Cytotoksyczne działanie ekstraktu GBE może być związane z występującą martwicą i/lub apoptozą. Zwiększone uwalnianie wskaźnika martwicy (LDH) przez komórki traktowane GBE wskazuje na zwiększone procesy martwicze. Z kolei zwiększona ekspresja białka p53 sugeruje aktywację szlaków apoptozy (choć markerów apoptozy nie mierzono bezpośrednio) [362]. Ginkgetin, który jest ważnym składnikiem EGb 761, w stężeniu 5 $\mu\text{g/ml}$ powodował wzrost poziomu nadtlenu wodoru w traktowanych nim komórkach raka jajnika i w konsekwencji doprowadził do indukcji apoptozy w linii komórek OVCAR-3, gdzie głównym szlakiem była aktywacja kaspazy w wyniku wytwarzania nadtlenu wodoru i w mniejszym stopniu autoutlenianie ginkgetinu [363]. Dodatkowo naładowane nanocząstki chitozanu umożliwiają niekwalencyjne wiązanie z tkankami i dzięki temu są wykorzystywane do celowanego dostarczania leków/chemioterapeutyków, co może stanowić alternatywną metodę leczenia i pomóc wzmocnić działanie istniejącej chemioterapii [364]. Ponadto literatura donosi, że czyste nanocząstki mają działanie przeciwnowotworowe, co zostało potwierdzone w badaniach Qi i wsp. Potwierdzili oni, że ChNP mają działanie cytotoksyczne na komórki rakowe wątroby (BEL7402), żołądka (BGC823) i okrężnicy (Colo320) w dawkach odpowiednio $\text{IC}_{50}=15 \mu\text{g/ml}$, $\text{IC}_{50}=21 \mu\text{g/ml}$ i $\text{IC}_{50}=28 \mu\text{g/ml}$, w badanym zakresie stężeń 0–100 $\mu\text{g/ml}$ [365]. Ci sami badacze udowodnili również, że nanocząstki chitozanowe nie działają cytotoksycznie na prawidłowe komórki wątroby (L-02) w tym samym zakresie stężeń [365]. Stwierdzono także, że wielkość nanocząstek odgrywa kluczową rolę w działaniu cytotoksycznym na komórki nowotworowe [365–367]. Bardzo małe nanocząstki wykazywały większą akumulację w komórkach nowotworowych i wydłużony okres półtrwania *in vivo* ze względu na zdolność unikania ich wchłaniania przez układ siateczkowo-śródbłonkowy [251]. Małe nanocząsteczki mogą dłużej pozostawać w obiegu, co z kolei skutkuje lepszą biodostępnością leku i zwiększonym uwalnianiem zawartego w nich leku *in vitro* [365]. Bardzo ważnym czynnikiem wpływającym na wybór chitozanu jako matrycy nanocząstek jest możliwość ich długotrwałego utrzymywania się w krwioobiegu. Pozwala to na opóźnienie ich

dysocjacji i działanie w komórkach docelowych, mniejsze skutki uboczne i wysoką selektywność i wybiórczość działania m.in. na komórki nowotworowe [364].

Minimalne stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów (MIC) dla GBE, ChNP i Ch(GB)NP określono prowadząc hodowle mikroorganizmów (6 szczepów bakteryjnych i 2 szczepów grzybów) w pożywce płynnej i następnie na płytkach z pożywką agarową. Niższa wartość MIC wskazuje, że do zahamowania wzrostu mikroorganizmu jest potrzebna mniejsza dawka substancji leczniczej; dlatego leki o niższych wynikach MIC są skuteczniejszymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi. Identyfikując odpowiednie substancje aktywne i ich odpowiednie, skuteczne stężenia, oceny MIC pozwalają zapobiegać ewolucji lekooporności różnych szczepów drobnoustrojów [368]. Badania MIC zostały przeprowadzone z użyciem ekstraktu komercyjnego zatężonego do poziomu 10% w/v. Użyty GBE wykazywał działanie przeciwbakteryjne w badanym zakresie stężeń. GBE w najmniejszym stężeniu wykazywał aktywność wobec *S. aureus* (c=6000 µg/ml). Dwukrotnie wyższe stężenie GBE wykazywało aktywność przeciwko *E. coli* i *S. enteritidis*, a czterokrotny wzrost stężenia hamował wzrost *K. pneumoniae*, *E. faecalis* oraz *P. aeruginosa*. Powyższe stężenia okazały się również minimalnymi stężeniami bakteriobójczymi (MBC), co potwierdził brak wzrostu na pożywkach agarowych, które były wysiewane z hodowli bulionowych. W badanym zakresie stężeń GBE nie wykazywał aktywności przeciwko szczepom grzybów. Ibrahim i wsp. potwierdzili swoimi badaniami działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze standaryzowanego ekstraktu z *Ginkgo biloba* (EGb 761) [369]. Wykazali oni, że dla *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. cerevisiae*, i *C. albicans* MIC wynosił 15 mg/ml, a MBC dla wszystkich szczepów (oprócz *K. pneumoniae*) wynosił 30 mg/ml (dla *K. pneumoniae* MBC wynosił 60 mg/ml) [369]. Inni badacze, wykorzystując wytworzony przez siebie ekstrakt z liści zielonych *Ginkgo biloba*, wykazali, że stężenie 50 mg/ml jest stężeniem MIC i powoduje zahamowanie wzrostu szczepów: *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Salmonella infantis*, *Staphylococcus epidermidis* DSMZ 20044, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis*, natomiast stężenie 100 mg/ml ma działanie bakteriobójcze dla wszystkich wymienionych bakterii [370]. W przypadku wykorzystania ChNP została wykazana zarówno aktywność przeciwbakteryjna jak również przeciwgrzybicza w badanym zakresie stężeń. Użyte ChNP najmniejszym stężeniu wykazywały aktywność wobec *E. coli* i *S. enteritidis* (c=610 µg/ml). Dwukrotnie wyższe stężenie ChNP wykazywało aktywność przeciwko *S. aureus*, czterokrotne – wobec *E. faecalis* i *C. albicans*, zaś ośmiokrotne – wobec *S. cerevisiae*. Powyższe

stężenia okazały się również minimalnymi stężeniami bakteriobójczymi (MBC), co potwierdził brak wzrostu na pożywkach agarowych wysiewanych z hodowli płynnych. ChNP nie wykazywały aktywności mikrobiologicznej przeciwko *K. pneumoniae* i *P. aeruginosa*. ChNP charakteryzują się szerokim spektrum działania przeciwbakteryjnego, bo wykazują skuteczność w hamowaniu wzrostu zarówno wobec bakterii Gram-ujemnych (G⁻) jak również Gram-dodatnich (G⁺). Mechanizm działania ChNP przeciwko bakteriom G⁻ i G⁺ nieco różni się od siebie ze względu na różnice w budowie ściany i błony komórkowej w obu grupach bakterii. Błona komórkowa bakterii G⁻ zawiera w swojej strukturze lipopolisacharyd (LPS) posiadający liczne grupy anionowe takie jak grupy fosforanowe czy pirofosforanowe wykazujące powinowactwo do kationowego chitozanu. Natomiast u bakterii G⁺ dominująca zewnętrzna ściana komórkowa jest zbudowana z mureiny (peptydoglikanu) i reszt kwasu teichojowego. Stanowi to kluczowe uzasadnienie, dlaczego utrata zawartości wewnątrzkomórkowej po traktowaniu ChNP zachodzi w większym stopniu w przypadku bakterii G⁻ niż G⁺ [371]. Cieńsza ściana komórkowa bakterii G⁻ czyni je bardziej podatnymi na działanie ChNP, zaś warstwa peptydoglikanu w ścianie komórkowej G⁺ utrudnia wewnętrzne wiązanie nanocząstek chitozanowych [372,373]. Poza typem bakterii (G⁺ czy G⁻) aktywność przeciwbakteryjna ChNP zależy także od innych czynników tj. etapu wzrostu bakterii, potencjału zeta, stężenia, odczynu pH, masy cząsteczkowej i stopnia deacetylacji [371]. Chen i wsp. wykazali, że stężeniem bakteriostatycznym użytych ChNP wobec szczepów *E. coli* jak i *S. aureus* jest stężenie w zakresie 0,5-1 mg/ml, natomiast stężenie bakteriobójcze wobec obu badanych szczepów wynosi 2,0 mg/ml [347]. Qi i wsp. wykazali, że MBC dla ChNP wobec *E. coli* i *S. aureus* wynosi odpowiednio 4 µg/ml i 8 µg/ml, przy czym obniżając pH te wartości spadają do odpowiednio 1 µg/ml i 4 µg/ml [375]. Du i wsp. udowodnili, że przeciwko *S. aureus* działa wyższe stężenie MIC i MBC (odpowiednio 234 µg/ml i 281 µg/ml) w porównaniu do stężenia MIC i MBC przeciwko *E. coli* (odpowiednio 117 µg/ml i 187 µg/ml) [376]. Wu i wsp. w swoich badaniach potwierdzili, że stężenie MIC dla nanocząstek chitozanowych przeciwko *E. coli* wynosi 625 µg/ml zaś MBC – 2,5 mg/ml. Z kolei Wartości MIC i MBC wobec *B. subtilis* wynoszą kolejno 312,5 µg/ml i 1,25 mg/ml [377]. Costa i wsp. prowadzili badania na szczepach szpitalnych tj. opornych na działanie wankomycyny *S. aureus* (VRSA), i *E. faecalis* (VREF) oraz *P. aeruginosa* z izolatu klinicznego. Wartość stężenia MIC ChNP wyniosła 2 mg/ml dla VRSA, VREF i *P. aeruginosa*, zaś stężenie MBC dla VREF wyniosło 6 mg/ml a dla *P. aeruginosa* – 7 mg/ml [378]. Biorąc pod uwagę, że wszystkie

testowane mikroorganizmy wykazują oporność na szereg antybiotyków, ChNP hamowały ich wzrost przy stosunkowo niskich wartościach MIC. Ci sami badacze prowadzili badania działania ChNP na szczepy gronkowca złocistego wrażliwego na działanie metycyliny (MSSA), oraz szczepy metycylinooporne: *S. aureus* (MRSA) i *S. epidermidis* (MRSE). Wykazali oni, że MIC nanocząstek chitozanowych wobec wszystkich testowanych szczepów wynosi 1,25 mg/ml, natomiast MBC dla MRSA wynosi 2,5 mg/ml, a dla MSSA – 2,25 mg/ml [379]. Rozpatrując aktywność przeciwgrzybiczą ChNP El Rabey i wsp. udowodnili, że MIC wobec 2 szczepów *C. albicans* (Ca-1 i Ca-2) wynosi odpowiednio 4,50 mg/ml i 4,75 mg/ml [380]. Torres-Rêgo i wsp. z kolei potwierdzili, że minimalne stężenie hamujące *C. albicans* wynosi 178,5 µg/ml [381].

Ch(GB)NP w badanym zakresie stężeń nie wykazywały aktywności tylko wobec *C. albicans*. Natomiast nanocząstki chitozanowe z GBE wykazywały aktywność mikrobiologiczną wobec reszty drobnoustrojów tj. począwszy od najsilniejszej aktywności wobec *K. pneumoniae* i *S. enteritidis* – z najniższym stężeniem MIC – 410 µg/ml. Dwukrotnie większe stężenie (MIC=820 µg/ml) było niezbędne do zahamowania wzrostu *S. aureus* i *E. faecalis* – MIC przy stężeniu 820 µg/ml, czterokrotnie większe – wobec *E. coli* – z MIC przy stężeniu 1,63 mg/ml i ośmiokrotnie większe wobec *S. cerevisiae* – z MIC przy stężeniu 3,27 mg/ml. W odniesieniu do minimalnych stężeń hamujących dla GBE oraz ChNP jest widoczny efekt wzmocnienia działania przeciwbakteryjnego i przeciwgrzybiczego w wyniku zastosowania nanocząstek z ekstraktem (z wyjątkiem *E. coli*). Badania mikrobiologicznego efektu synergistycznego nanocząstek chitozanowych i ekstraktu z *Ginkgo biloba* wobec bakterii i grzybów są badaniami innowacyjnymi, ponieważ nie ma odniesień literaturowych, które potwierdzają ten efekt. Badacze skupili się na badaniu innych substancji aktywnych (m.in. ekstraktów roślinnych czy leków) w połączeniu z działaniem chitozanowych nanocząstek. Ibrahim i wsp. dowiedli w swoich badaniach, że ChNP wzmacniają działanie antybiotyków (ciprofloksacyny i gentamycyny) poprzez zwiększenie strefy zahamowania wzrostu wokół krążków tekstylnych z naniesionymi różnymi stężeniami antybiotyków i nanocząstek chitozanowych z zamkniętymi antybiotykami. Strefa zahamowania wzrostu *S. aureus* wokół krążków z ChNP z ciprofloksacyną wzrosła o 94,7 % w stosunku do strefy zahamowania wokół krążków z ciprofloksacyną przy stężeniu 50 mg/ml antybiotyku, zaś strefa zahamowania wzrostu *E. coli* wokół krążków z ChNP-ciprofloksacyna wzrosła o 94,2% w odniesieniu do strefy wokół krążków

z samym antybiotykiem (przy takim samym stężeniu). W przypadku gentamycyny strefa zahamowania wzrostu obu bakterii wokół krążków z ChNP-gentamycyna wzrosła w przypadku *E. coli* – 12-krotnie, natomiast w przypadku *S. aureus* – 15-krotnie w odniesieniu do strefy zahamowania wokół krążków z samą gentamycyną (również przy stężeniu 50 mg/ml antybiotyku) [382]. Sotelo-Boyás i wsp. wykazali, że komponenty w postaci nanocząstek chitozanowych i olejku eterycznego z limonki, mają synergistyczny efekt w działaniu przeciwbakteryjnym przeciwko badanym patogenom przenoszonym przez żywność tj. *Listeria monocytogenes*, *Shigella dysenteriae*, *S. aureus* i *E. coli* [383]. Inni badacze udowodnili synergistyczny efekt działania ChNP i kurkuminy wobec *S. aureus* i *P. aeruginosa* prowadząc badania *in vivo* na myszach. Badanie wykazało, że ChNP obciążone kurkumina znacząco hamowały postęp zakażenia gronkowcem i pałeczką ropy błękitnej na skórze myszy, podczas gdy puste ChNP takiego zahamowania infekcji nie wykazywały. Badacze zaobserwowali również, że działanie przeciwbakteryjne ChNP z kurkumina jest znacznie lepsze w odniesieniu do samej kurkuminy. ChNP w systemach dostarczania substancji leczniczych zmniejszyły wady zwykłych systemów dostarczania, co prawdopodobnie wynika ze stopniowego uwalniania kurkuminy przez ChNP w obszarach objętych infekcją. W związku z tym nanocząstki chitozanowe w połączeniu z kurkumina dały efekt synergistyczny w działaniu przeciwbakteryjnym, które było silniejsze niż w przypadku obu składników działających osobno [384].

4.3. Mikrokapsułki alginianowe [Al(GB) i Al(Ch(GB)NP)]

Metodą żelowania jonotropowego otrzymano mikrokapsułki alginianowe z GBE – Al(GB) oraz z nanocząstkami – Al(Ch(GB)NP). Liczne widoczne zagłębienia na powierzchni mikrokapsulek Al(Ch(GB)NP), które powstały w wyniku szybkiego odparowania rozpuszczalnika w procesie tworzenia mikrokapsułki, świadczyły o tym, że otrzymano kapsułki wielordzeniowe z otoczką alginianową. Ponadto mikrokapsułki charakteryzujące się dużą wielkością porów na powierzchni mogą uwalniać zawarty w nich ekstrakt stosunkowo szybko do otaczającego medium badawczego, co potwierdziły badania. Na podstawie badań kinetyki uwalniania materiału rdzenia z mikrokapsulek można stwierdzić, że we wszystkich przypadkach uwalnianie substancji czynnej następowało poprzez bierną dyfuzję [385,386]. Substancja aktywna przenikała z wnętrza matrycy polimerowej do otaczającego środowiska, a otoczka polimerowa stanowiła barierę dyfuzyjną, utrudniając i spowalniając szybkość przenikania ekstraktu

do podłoża badawczego. W przypadku uwalniania z Al(GB) ekstrakt miał tylko jedną barierę do pokonania, dlatego uwalnianie ekstraktu na początku było większe i stabilizowało się w czasie. Z kolei w przypadku Al(Ch(GB)NP) występowały dwie bariery dyfuzyjne (chitozan i alginian), które pozwalały na delikatne spowolnienie uwalniania ekstraktu z powłok polimerowych. Zastosowanie materiału z dwiema barierami dyfuzyjnymi pozwoliłoby kontrolować uwalnianie substancji aktywnej, a niewielkie ilości uwalnianej substancji zapobiegałyby drażniącemu działaniu uwalnianego materiału rdzenia. Analizując profil uwalniania obu typów mikrokapsulek alginianowych można zaobserwować, że w przypadku Al(Ch(GB)NP) proces uwalniania ekstraktu miał tendencję wzrostową w trakcie całego badania (zarówno w środowisku wodnym jak i soli fizjologicznej). Przypuszcza się, że było to związane z obecnością dwóch barier dyfuzyjnych, dzięki czemu ekstrakt był uwalniany w wolniejszy sposób. W przypadku Al(GB) uwalnianie nastąpiło z dużą szybkością, ponieważ w ciągu 4h uwolnił się praktycznie cały materiał rdzenia. Wynika to z faktu, że ekstrakt miał do pokonania jedną barierę dyfuzyjną. Badania Polka i wsp. potwierdziły, że uwalnianie albuminy bydlęcej (BSA) z mikrokapsulek z otoczką alginianową osiągnęło poziom 77,96% całkowitego uwolnienia, z czego 73% albuminy uwolniło się w pierwszych 4h inkubacji a tylko 4% BSA – pomiędzy 4 a 24h godziną inkubacji w medium soli fizjologicznej [385]. Inne badania potwierdziły, że ekstrakt z *Ginkgo biloba* zamknięty w usieciowanych kompleksach nanożelu alginianowego uwolnił się do medium wodnego pH 6,8 na poziomie blisko 80% w ciągu 12h inkubacji w medium wodnym [386]. Polk i wsp. udowodnili także, że uwalnianie białka albuminy z mikrokapsulek chitozanoligianianowych (wykonanych z niemodyfikowanego chitozanu o wyższej masie cząsteczkowej) zachodziło na poziomie 37% całkowitej zawartości albuminy w pierwszych 4h inkubacji w soli fizjologicznej (pH 6,2), i wzrastało do poziomu 78% między 4 a 24h inkubacji w tym samym medium [385]. Powyższe badania potwierdzają dość szybkie uwalnianie ekstraktu zarówno z samych mikrokapsulek alginianowych jak i z mikrokapsulek alginianowych z nanocząstkami chitozanowymi. Przypuszcza się, że podczas aplikacji skórnych zbyt szybkie uwolnienie dużej ilości ekstraktu mogłoby wywołać efekt podrażnienia skóry, w związku z powyższym w pracy skupiono się na poszukiwaniach takiego nośnika, który będzie uwalniał ekstrakt wolniej, dłużej i bardziej równomiernie.

4.4. Mikrokapsułki etylocelulozowe [Et(GB) i Et(Ch(GB)NP)]

Mikrokapsułki z otoczką z etylocelulozy uzyskano metodą emulsyjną z odparowaniem rozpuszczalnika. Emulsja O/W powstała w wyniku intensywnego mieszania fazy wodnej składającej się z PVA (jako surfaktant) z GBE lub Ch(GB)NP, gdzie wkraplano fazę hydrofobową (etyloceluloza rozpuszczona w chloroformie). Et(GB) oraz Et(Ch(GB)NP) powstały poprzez samoorganizację fazy olejowej w formę mikrokropel zawieszonych w fazie wodnej i następnie poprzez całkowitą ewaporację rozpuszczalnika z uformowanych mikrokapsuł w trakcie procesu mieszania. Odparowanie rozpuszczalnika (chloroformu) z układu nastąpiło w podwyższonej temperaturze. Mikrokapsułki z otoczką etylocelulozową z ekstraktem mają liczne pory na swojej powierzchni, ale są one dużo mniejszych rozmiarów niż te, które zaobserwowano w mikrokapsułkach alginianowych. Z kolei Et(Ch(GB)NP) mają bardzo nierównomierną i chropowatą powierzchnię. Wielkość porów w otoczce polimerowej mikrokapsuł ma bezpośredni wpływ na szybkość uwalniania substancji aktywnej w nich zawartej, czyli w konsekwencji na możliwość kontrolowania jej dozowania w zależności od potencjalnych aplikacji. Analizując krzywe uwalniania ekstraktu z Et(GB) oraz z Et(Ch(GB)NP) kinetyka uwalniania dla obu typów mikrokapsuł ma tendencję wzrostową (w medium soli fizjologicznej) przez cały czas prowadzenia inkubacji. W przypadku medium wodnego można zauważyć, że uwalnianie stabilizuje się z upływem czasu zwłaszcza dla Et(Ch(GB)NP), natomiast uwalnianie GBE z Et(GB) przez cały czas trwania badania w wolnym tempie wzrasta. Podobnie jak dla obu typów mikrokapsuł alginianowych uwalnianie do soli fizjologicznej zachodziło na wyższym poziomie niż uwalnianie do wody. Prawdopodobnie było to spowodowane lepszą rozpuszczalnością ekstraktu z *Ginkgo biloba* w soli fizjologicznej (pH 5,8) niż w wodzie (pH 7,0). Prasertmanakit i wsp. udowodnili prowadząc własne badania, że z wytworzonych metodą emulsyfikacji mikrokapsuł etylocelulozowych zawierających kwas foliowy uwolniło się do 59% jego zawartości w 6h inkubacji w temp 37°C w buforze fosforanowym i do 70% jego zawartości w 24h inkubacji w tych samych warunkach [387]. Z kolei Yadav i wsp. wykazali w swoich badaniach, że aceklofenak jako NLPZ zamknięty w mikrokapsułkach z etylocelulozy uwolnił się do środowiska buforu fosforanowego (pH 6,8) na poziomie 70% całkowitej zawartości leku w 6h godzinie inkubacji w 37°C, natomiast w zakresie 80-92% po 24h inkubacji [388]. Murtaza i wsp. badali uwalnianie diklofenaku sodu z mikrokapsułek etylocelulozowych w medium wodnym. Badania wykazały, że 60% całkowitej zawartości diklofenaku

w mikrokapsułkach uwalnia się do otaczającego środowiska wodnego 2h i 20 minut [389]. Jak wynika z powyższych badań [387-389] stopień uwalniania substancji z mikrokapsułek etylocelulozowych jest zależny od charakteru substancji zamykanej w mikrokapsułce (hydrofilowa czy hydrofobowa), co w następstwie jest powiązane z jej powinowactwem do etylocelulozowej otoczki a także do medium, do którego się uwalnia. Hydrofobowa otoczka mikrokapsułki pozwala na szybsze tempo uwalniania hydrofobowego leku, zaś hydrofilowy nośnik uwalnia szybciej hydrofilowe substancje lecznicze, co zostało potwierdzone badaniami [390]. Ponadto charakter otaczającego środowiska, do którego następuje uwalnianie substancji leczniczej również ma wpływ na tempo migracji materiału rdzenia. Związki hydrofilowe, np. wodne ekstrakty roślinne wykazują naturalną tendencję do bardzo szybkiej dyfuzji w kierunku otaczającej fazy wodnej. Etyloceluloza jako polimer o charakterze lipofilowym spowalnia proces dyfuzji związków hydrofilowych, ale otaczające, hydrofilowe środowisko badawcze go przyspiesza [390]. Mikroenkapsulacja nanocząstek chitozanowych z ekstraktem pozwoliła w dużym stopniu spowolnić uwalnianie GBE do otaczającego medium. Badania, które przeprowadzili Hasan i wsp. [390] potwierdziły, że zastosowanie mikroenkapsulacji nanocząstek PCL z zamkniętym ibuprofenem lub octanem tryptoreliny przy użyciu etylocelulozy zmniejszyła uwalnianie do otaczającego medium w temperaturze 37°C zgodnie z punktami:

- z poziomu 71,7% zawartości ibuprofenu dla NPs w 15 minucie inkubacji w medium do poziomu 27,7% zawartości ibuprofenu w mikrokapsułkach etylocelulozowych z zamkniętymi nanocząstkami PCL (medium – bufor fosforanowy, pH 7,4);

- z poziomu 78,3% zawartości ibuprofenu dla NPs w 24h inkubacji w medium do poziomu 57,3% zawartości ibuprofenu w mikrokapsułkach etylocelulozowych z zamkniętymi nanocząstkami PCL (medium – bufor fosforanowy, pH 7,4);

- z poziomu 71,0% zawartości octanu tryptoreliny dla NPs w 15 minucie inkubacji w medium do poziomu 5,4% zawartości octanu tryptoreliny w mikrokapsułkach etylocelulozowych z zamkniętymi nanocząstkami PCL (do medium 0,1 M NaCl);

- z poziomu 73,5% zawartości octanu tryptoreliny dla NPs w 24h inkubacji w medium do poziomu 31,5% zawartości octanu tryptoreliny w mikrokapsułkach etylocelulozowych z zamkniętymi nanocząstkami PCL (do medium 0,1 M NaCl) [390].

Fleczkó i wsp. skupili się na porównaniu uwalniania waniliny z 2 rodzajów mikrokapsułek etylocelulozowych: niepowlekanych oraz powlekanych usieciowaną warstwą chitozanową (badania uwalniania prowadzono przez 3 tygodnie w temperaturze

50°C). Oba rodzaje mikrokapsulek wykazywały przedłużone uwalnianie, aczkolwiek naniesiona warstwa chitozanowa zasadniczo wydłużyła uwalnianie materiału rdzenia. W 6. dniu prowadzenia eksperymentu mikrokapsułki powlekane chitozanem uwolniły około 20% całkowitej zawartości waniliny, podczas gdy mikrokapsułki niepowlekane ten sam procent uwalniania osiągnęły po upływie zaledwie 1 dnia. Po 2 tygodniach prowadzenia badania niepowlekane mikrokapsułki uwolniły 60% całkowitej zawartości waniliny, a mikrokapsułki powlekane – nieco poniżej 30% zawartości materiału rdzenia, zaś po upływie 3 tygodni mikrokapsułki niepowlekane uwolniły 80% zawartości waniliny, a powlekane – 30% całkowitej zawartości waniliny [391].

Badania potwierdziły, że nośnik etylocelulozowy do zamykania nanocząstek chitozanowych z ekstraktem jak również samego ekstraktu z *Ginkgo biloba* spełnia rolę w spowolnieniu wydzielania ekstraktu do medium wodnego i medium soli fizjologicznej. Uwalnianie GBE zachodzące przez pojedynczą barierę etylocelulozy (w przypadku Et(GB)) oraz przez dwie bariery polimerowe: usieciowany chitozan i etylocelulozę (w przypadku Et(Ch(GB)NP)) ma tendencję wzrostową (w soli fizjologicznej) lub stabilizującą się w czasie (w środowisku wodzie), zatem wytypowane polimery jako nośniki substancji aktywnej spełniają oczekiwania nośnika do kontrolowanego i spowolnionego uwalniania w czasie.

4.5. Funkcjonalne tekstylia

W wyniku przeprowadzonych prób badawczych otrzymano dwa rodzaje funkcjonalnej dzianiny bawełnianej, do której zostały immobilizowane mikrokapsuły etylocelulozowe z zamkniętym ekstraktem z *Ginkgo biloba* (pierwsza dzianina funkcjonalna) oraz mikrokapsuły etylocelulozowe z nanocząstkami chitozanowymi z GBE (druga dzianina funkcjonalna). Mikrokapsuły zostały przytwierdzone do dzianiny bawełnianej przy udziale kleju chitozanowego (kleju z polimeru z surowców odnawialnych). Do immobilizacji mikrokapsuł do materiałów włókienniczych były wykorzystywane przez innych badaczy różne związki syntetyczne m.in. lateksy syntetyczne: lateksy poliakrylanowe, styren-butadien, poli(octan winylu), kopolimery etylen-octan winylu, żywice syntetyczne: żywice mocznikowo–melaminowo–formaldehydowe, żywice poliuretanowe i epoksydowe, żywice z octanu winylu, kauczuki syntetyczne: poliuretany, kauczuki nitrylowe i chloroprenowe, silikony i inne związki [392]. W związku z powyższym użycie lepiszcza na bazie polimerów naturalnych zwiększa wartość produktu w kontekście „Zielonej Chemii” ze względu na

wykorzystanie naturalnych surowców i w konsekwencji w toku użytkowania produktu jego potencjalną szybką biodegradację i ekologiczne produkty biorozpadu.

Badacze skupiają się na zamykaniu różnych substancji w mikrokapsułach. W zależności od aplikacji końcowego produktu tekstylnego w mikrokapsułach mogą być zamykane: barwniki do trwałego drukowania i barwienia tekstyliów w tym barwniki termo-, foto- i elektrochromowe [393-399]. Innym kierunkiem aplikacyjnym są tekstylia ogniodoporne z organicznymi i nieorganicznymi związkami zmniejszającymi palność zamkniętymi w mikrokapsułach przytwierdzonymi do podłoża tekstylnego. Takie zbiegi stosuje się w celu zapobiegania wydzielaniu lub sublimacji środków chemicznych zmniejszających palność, uniknięcia reakcji z nośnikiem tekstylnym i/lub w celu przezwyciężenia hydrofilowości substancji. Tego typu materiały tekstylne obejmują odzież strażacką i wojskową, a także tekstylia do wnętrz samochodowych i domowych [400-403]. Kolejną bardzo ciekawą gałęzią zastosowań mikrokapsułowania są tekstylia funkcjonalne do aktywnej termoregulacji, które znajdują zastosowanie w tekstyliach izolacyjnych, odzieży technicznej i sportowej. Większość takich tekstyliów do regulacji termicznej wykorzystuje materiały o przemianie fazowej (PCM), w których dynamiczny proces wymiany ciepła zachodzi w temperaturze topnienia. Typowymi organicznymi PCM są węglowodory parafinowe lub lipidy o temperaturze topnienia zbliżonej do temperatury ciała [404-407]. Ważnym aspektem badawczym pod kątem zapobiegania problemom skórnyom wywołanych przez szkodliwe działanie promieniowania UV są tekstylia ochronne z inkorporowanymi mikrokapsułami z syntetycznymi lub naturalnymi związkami pochłaniającymi promieniowanie UV [408,409]. Również tekstylia o działaniu repelentnym zawierających w immobilizowanych mikrokapsułach insektycydy, akarycydy i inne repelenty cieszą się ogromnym zainteresowaniem wśród badaczy oraz na rynku konsumentów [410,411]. Tekstylia z funkcją zapachową zawierają olejki eteryczne, perfumy lub aromaty jako materiał rdzenia zamknięte w mikrokapsułkach w celu stopniowego uwalniania substancji zapachowych. Składniki aktywne są albo stopniowo uwalniane przez przepuszczalne otoczki polimerowe, albo materiał rdzenia jest zamknięty w szczelnej matrycy polimerowej do czasu ich uwolnienia pod wpływem nacisku mechanicznego lub tarcia podczas użytkowania tekstyliów funkcjonalnych [412-415]. Niektóre związki aromatyczne zawarte w olejkach eterycznych oprócz walorów zapachowych i wrażeń węchowych zapewniają także ochronę przeciwbakteryjną [416]. Funkcjonalne wyroby tekstylne do zastosowań medycznych i kosmetycznych muszą składać się z materiałów biokompatybilnych

(najlepiej z materiałów pochodzenia naturalnego) oraz być dopuszczone do bezpośredniego kontaktu ze skórą. W funkcjonalnych tekstyliach medycznych immobilizowane mikrokapsuły mogą zawierać różne związki terapeutyczne, np. antybiotyki, kannabidiol, olej lipowy ozonowane oleje roślinne czy salicylan metylu [417-421]. Z kolei wyroby tekstylne do zastosowań w kosmetologii zawierają mikrokapsuły z zamkniętymi różnymi składnikami o właściwościach pielęgnacyjnych i aromaterapeutycznych, np. witaminy oraz olejki eteryczne [422-424].

Tekstylika funkcjonalne z immobilizowanymi mikrokapsułami z zamkniętymi w nich nanocząstkami z ekstraktem stanowią nowość naukową. Podwójna bariera polimerowa (otoczka polimerowa mikrokapsuł etylocelulozowych oraz otoczka chitozanowa nanocząstek) stanowi doskonałą ochronę przed utratą materiału rdzenia. Ponadto zakłada się, że przy badaniach aplikacyjnych parametrów użytkowych tekstyliów funkcjonalnych mikrokapsuły etylocelulozowe będą ulegały zniszczeniu pod wpływem działania czynników mechanicznych (ucisk, tarcie) i będą uwalniały nanocząstki chitozanowe, które będą mogły wnikać za pośrednictwem przydatków skórnych (mieszki włosowe) w głąb skóry. Średni rozmiar porów w skórze mieści się w przedziale 40-100 μm [425], zatem daje to potencjalne możliwości wnikania nanocząstek poprzez pory skórne. Badania przenikania (za pomocą aparatu Zeta Sizer oraz techniką spektrofotometryczną UV-VIS) nanocząstek z ekstraktem GBE oraz samego ekstraktu *Ginkgo biloba* potwierdziły penetrację NPs przez błonę dializacyjną o wielkości porów zbliżonej do wielkości porów w skórze. Massella i wsp. uzyskali bawełniane tkaniny funkcjonalne z immobilizowanymi nanocząstkami z melatoniną, której przenikanie było badane za pomocą pionowych komór Franza, płynem akceptorowym był bufor PBS, a całość była badana w temperaturze 33°C [243]. Badacze wykazali, że z tkanin funkcjonalnych z nanocząstkami umieszczonych na membranie przymocowanej za pomocą zacisków do roztworu PBS uwalnia się melatonina (obecność melatoniny potwierdzona metodą spektrofotometryczną). Uzyskane wyniki potwierdziły fakt, że funkcjonalne tkaniny są skutecznym narzędziem do dostarczania melatoniny przez skórę w sposób ciągły. Taka forma aplikacyjna melatoniny może zapobiegać efektom ubocznym w postaci metabolizmu pierwszego przejścia występującym w przypadku podawania leków doustnie [243]. Ponadto tkaniny funkcjonalne wykazują postęp w porównaniu z konwencjonalnymi systemami przezskórnymi, takimi jak kremy czy maści, które należy nakładać miejscowo kilka razy dziennie [243]. Ci sami badacze pracowali nad uwalnianiem zamkniętej w nanocząstkach z PCL kofeiny, nanocząstki były

immobilizowane do tkaniny. Badania prowadzono przy użyciu tej samej komory Franza i płynu akceptorowego – buforu PBS, w tych samych warunkach. Wykazano, że kinetyka uwalniania kofeiny była znacząco mniejsza w przypadku układu zawierającego nanocząstki z kofeiną niż w przypadku wolnej kofeiny immobilizowanej do tkaniny, stosowanej jako kontrola pozytywna. W ramach tego eksperymentu potwierdzono, że proces kapsułkowania dodatkowo spowolnił uwalnianie zamkniętego związku. Było to spowodowane na skutek szeregu zachodzących zjawisk:

- 1) nanocząstki musiały zostać uwolnione z tkaniny i oddziaływać z membraną z porami o wielkości zbliżonej do porów w skórze;
- 2) następnie nanocząsteczki mogły albo przejść przez membranę dostarczając kofeinę do płynu akceptorowego, albo utknąć w porach membrany; w tym drugim przypadku kofeina musiała rozproszyć nanocząsteczki, które mogły działać jako zbiornik wewnątrz skóry [426].

Zimmiewska i wsp. uzyskali funkcjonalne tekstylia składające się z naturalnych włókien (lnu i bawełny organicznej) z immobilizowanymi etylocelulozowymi mikrokapsułami zawierającymi ekstrakt z zielonej herbaty lub fiołka trójbarwnego. Opracowane tekstylia (w formie odzieży) skutecznie wspomagały leczenie chorób dermatologicznych, wykazywały brak cytotoksyczności względem keratynocytów, chroniły przed szkodliwym promieniowaniem UV oraz poprawiły nawilżenie skóry [427].

Uzyskana w ramach badań przedłożonej pracy bawełniana dzianina funkcjonalna z immobilizowanymi mikrokapsułami etylocelulozowymi z nanocząstkami chitozanowymi z GBE spełnia funkcję tekstyliów o spowolnionym i/lub kontrolowanym uwalnianiu substancji aktywnej – ekstraktu z liści zielonych *Ginkgo biloba*. Uwalnianie z tekstyliów funkcjonalnych i przenikanie przez membranę dializacyjną (o wielkości porów zbliżonych do wielkości porów w skórze) nanocząstek z ekstraktem, co potwierdziły wyniki badań, daje ogromny potencjał aplikacyjny za pośrednictwem powłok skórnych w formie terapii alternatywnej i/lub uzupełniającej. Nanocząstki chitozanowe z GBE obecne w płynie akceptorowym (soli fizjologicznej) potwierdzają ich możliwości penetracyjne przez pory w skórze, co pozwalałoby na wchłanianie większej ilości ekstraktu o działaniu terapeutycznym przez sieć naczyń włosowatych w skórze. Tekstylia funkcjonalne jako systemy transdermalne o przedłużonym uwalnianiu pod wpływem różnych czynników, np. tarcie, pot i inne, zapewniłyby utrzymanie odpowiedniego poziomu terapeutycznego użytej substancji leczniczej bez

efektu dawki uderzeniowej, która mogłaby wywołać skutki niepożądane, np. podrażnienia skórne.

5. Podsumowanie

W pracy otrzymano funkcjonalną dzianinę zawierającą mikrokapsuły z nanocząstkami z ekstraktem *Ginkgo biloba*, która może być zastosowana jako terapeutyczny materiał włókienniczy do dostarczania substancji leczniczej drogą transdermalną.

W tym celu:

- ✓ Otrzymano nanocząstki chitozanowe zawierające ekstrakt *Ginkgo biloba* o statystycznej średnicy 454,2 nm. Potwierdzono, że substancja czynna została skutecznie zamknięta oraz określono kinetykę procesu uwalniania ekstraktu do środowiska wodnego oraz soli fizjologicznej.
- ✓ Stwierdzono, że uwalnianie substancji czynnej z nanocząstek odbywa się na drodze biernej dyfuzji. Uwalnianie ekstraktu w początkowym etapie zachodzi stosunkowo szybko do obu mediów, następnie uwalnianie w środowisku wodnym stabilizuje się w czasie a w soli fizjologicznej umiarkowanie rośnie. Wynika to z faktu, że *Ginkgo biloba* w pierwszej kolejności uwalnia się z powierzchni nanocząstek. Następnie przenika z głębszych warstw matrycy polimerowej do otaczającego medium, a powłoka polimerowa stanowi barierę dyfuzyjną, utrudniając i spowalniając szybkość przenikania ekstraktu do środowiska. Ponadto efekt ekranowania przez niskocząsteczkowe przeciwciała w środowisku soli fizjologicznej zmniejsza odpychanie elektrostatyczne między dodatnio naładowanymi grupami w łańcuchach chitozanu, a zatem łańcuchy te są bardziej elastyczne w medium soli w związku z czym uwalniają większą ilość ekstraktu z głębszych warstw nanocząstek.
- ✓ Potwierdzono, że zastosowanie nanocząstek chitozanowych z ekstraktem wykazuje efekt cytotoksyczny wobec linii komórek nowotworowych (PEA1 oraz HeLa) w badanym zakresie stężeń (25-5000 µg/ml), oraz nie wykazują efektu cytotoksycznego wobec komórek o budowie prawidłowej (HGF-1). Stwierdzono również, że użycie otrzymanych nanocząstek powoduje efekt wzmocnienia działania cytotoksycznego wobec linii nowotworowych w odniesieniu do użycia obu komponentów osobno.
- ✓ Wykazano, że otrzymane w pracy nanocząstki chitozanowe zawierające *Ginkgo biloba* wykazywały aktywność mikrobiologiczną wobec wszystkich testowanych szczepów bakterii i grzybów (z wyjątkiem *C. albicans*). W stosunku do minimalnych

stężeń hamujących dla ekstraktu *Ginkgo biloba* oraz nanocząstek chitozanu z ekstraktem, zeszytowany układ wykazuje efekt wzmocnienia działania przeciwbakteryjnego i przeciwwgrzybiczego.

✓ Ekstrakt *Ginkgo biloba* oraz nanocząstki chitozanowe zawierające ekstrakt zamknięto w mikrokapsułkach z etylocelulozy, stosując metodę emulsyjną z odparowaniem rozpuszczalnika. Mikrokapsułki z nanocząstkami chitozanu mają bardzo nierównomierną i chropowatą powierzchnię, w porównaniu do tych otrzymanych z samym ekstraktem.

✓ Analizując krzywe uwalniania ekstraktu z obu rodzajów mikrokapsuł etylocelulozowych stwierdzono, że szybkość uwalniania ma tendencję wzrostową (w medium soli fizjologicznej) przez cały czas prowadzenia inkubacji. W przypadku medium wodnego wykazano, że uwalnianie stabilizuje się z upływem czasu dla próbek z nanocząstkami chitozanowymi, natomiast w drugim przypadku przez cały czas trwania badania w wolnym tempie wzrasta. Prawdopodobnie było to spowodowane lepszą rozpuszczalnością ekstraktu z liści zielonych *Ginkgo biloba* w soli fizjologicznej (pH 5,8) niż w wodzie (pH 7,0).

✓ Mikrokapsułki immobilizowano za pomocą kleju chitozanowego na powierzchni dzianiny bawełnianej. Zastosowana podwójna bariera polimerowa (otoczka etylocelulozowa mikrokapsułek oraz otoczka chitozanowa nanocząstek) stanowi doskonałą ochronę przed utratą substancji aktywnej. Ponadto w trakcie użytkowania tekstyliów funkcjonalnych mikrokapsułki ulegają zniszczeniu pod wpływem działania czynników mechanicznych powodując uwalnianie nanocząstek. Badania potwierdziły penetrację nanocząstek przez błonę dializacyjną o wielkości porów zbliżonej do wielkości porów w skórze (w środowisku soli fizjologicznej), co potwierdza tezę przedłożonej rozprawy doktorskiej, że „możliwe jest wytworzenie materiałów włókienniczych zawierających mikrokapsuły z nanocząstkami z substancją aktywną jako terapeutyczne tekstylia do dostarczania substancji leczniczej drogą transdermalną”.

Literatura:

1. <https://www.databridgemarketresearch.com/reports/global-biomedical-textiles-market> [dostęp: 08.08.2023].
2. <https://serwisy.gazetaprawna.pl/zdrowie/artykuly/8244459,raport-o-zdrowiu-polakow-zazywanie-lekow-choroby-przewlekke.html> [dostęp: 09.08.2023].
3. World Health Statistics 2023: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. [dostęp: 09.08.2023].
4. Li G., Li Y., Chen G., He J., Han Y., Wang X., Kaplan, D.L. *Silk-Based Biomaterials in Biomedical Textiles and Fiber-Based Implants*. Adv. Healthc. Mater. 2015, 4(8), 1134-1151.
5. Chang K., Ginn B., Livingston N.K., Yao Z., Slavin B., King M.W., Chung S., Mao H.Q. *Medical Fibers and Biotextiles*; pod red.: Wagner W.R., Sakiyama-Elbert S.E., Zhang G., Yaszemski M.J.: *Biomaterials Science an Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press, wyd. 4, Seattle, USA, 2020, 575-600.
6. https://www.proakademia.eu/gfx/baza_wiedzy/62/innowacyjne_dziane_tekstyliamedyczne___wlasciwosci_i_obszar.pdf [dostęp: 20.02.2023].
7. Ali M.A., Shavandi A. *Medical textiles testing and quality assurance*; pod red.: Wang L.: *Performance Testing of Textiles Methods, Technology and Applications*. Woodhead Publishing Series in Textiles 2016, 129-153.
8. Wu S., Dong T., Li Y., Sun M., Qi Y., Liu J., Kuss M.A., Chen S., Duan B. *State-of-the-art review of advanced electrospun nanofiber yarn-based textiles for biomedical applications*. Appl. Mater. Today, 2022, 27, 101473, 1-27.
9. Zille A., Almeida L., Amorim T., Carneiro N., Esteves M.F., Silva C.J., Souto A.P. *Application of nanotechnology in antimicrobial finishing of biomedical textiles*. Mater. Res. Express, 2014, 1(3), 032003.
10. Martel B., Campagne C., Massika N.B. *When textiles help your recovery*. Med. Sci. 2017, 33(1), 73-78.
11. Akbari M., Tamayol A., Bagherifard S., Serex L., Mostafalu P., Faramarzi N., Mohammadi M.H., Khademhosseini A. *Textile technologies and tissue engineering: a path toward organ weaving*. Adv. Healthc. Mater., 2016, 5(7), 751-766.
12. Massella D., Argenziano M., Ferri A., Guan J., Giraud S., Cavalli R., Barresi A.A., Salaun F. *Bio-functional textiles: Combining pharmaceutical nanocarriers with fibrous materials for innovative dermatological therapies*. Pharm., 2019, 11(8):403.
13. Chang H., Luo J., Gulgunje P.V., Kumar S. *Structural and functional fibers*. Ann. Rev. Mater. Res. 2017, 47, 331-359.
14. Dinis H., Mendes P. *The brain tissue response to implanted silicon microelectrode arrays is increased when the device is tethered to the skull*. Biosens. Bioelectron., 2021, 172, 112781.
15. Tien N.D., Lyngstadaas S.P., Mano J.F., Blaker J.J., Haugen H.J. *Recent developments in chitosan-based micro/nanofibers for sustainable food packaging*,

- smart textiles, cosmeceuticals, and biomedical applications*. *Molecules*, 2021, 26(9):2683.
16. Aigner T.B., DeSimone E., Scheibel T. *Biomedical applications of recombinant silk-based materials*. *Adv. Mater.*, 2018, 30(19), 1704636.
 17. Akgol S., Ulucan-Karnak F., Kuru C.I., Kusat K. *The usage of composite nanomaterials in biomedical engineering applications*. *Biotechnol. Bioeng.* 2021, 118(8), 2906-2922.
 18. Guo C., Li C., Mu X., Kaplan D.L. *Engineering silk materials: From natural spinning to artificial processing*. *Appl. Phys. Rev.* 2020, 7(1), 011313, 1-18.
 19. Aibibu D., Hild M., Woeltje M., Cherif C. *Textile cell-free scaffolds for in situ tissue engineering applications*. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2016, 27 (3):63, 1-20.
 20. Jiao Y., Li C., Liu L., Wang F., Liu X., Mao J., Wang L. *Construction and application of textile-based tissue engineering scaffolds: a review*. *Biomater. Sci.* 2020, 8(13), 3574-3600.
 21. Ma J., Xue Y., Liang X., Liao C., Z. Tan, Tang B. *Bi-directional regulatable mechanical properties of 3D braided polyetheretherketone (PEEK)*. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2019, 103, 109811, 1-9.
 22. Tonndorf R., Aibibu D., Cherif C. *Collagen multifilament spinning*. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2020, 106, 110105, 1-9.
 23. Sumanasinghe R.D., King M.W. *New trends in biotextiles – the challenge of tissue engineering*. *J. Text. Appar. Technol.* 2003, 3, 2,1-13.
 24. King M.W. *Overview of opportunities in medical textiles*, *Can. Text. J.* 2001, 118 (4), 34-36.
 25. Sionkowska A. *Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: review*. *Prog. Polym. Sci.* 2011, 36(9), 1254-1276.
 26. Talebi N., Lopes D., Lopes J., Macário-Soares A., Dan A.D., Ghanbari R., Kahkesh K.H., Peixoto D., Giram P.S., Raza F., Veiga F., Sharifi E., Hamishehkar H., Paiva-Santos A.C. *Natural polymeric nanofibers in transdermal drug delivery*. *Appl. Mater. Today*, 2023, 30, 101726, 1-16.
 27. Gupta B.S. *Manufacture, types and properties of biotextiles for medical applications*; pod red.: King M.W., Gupta B.S, Guidoin R.: *Biotextiles as Medical Implants*. Woodhead Publishing, wyd. 1, Raleigh, USA, 2013, 3-47.
 28. Odian G. *Principles of Polymerization*, John Wiley & Sons Inc, wyd. 4, Nowy Jork, USA, 2004.
 29. Gajjar C.R., King M.W. *Biotextiles: Fiber to Fabric for Medical Applications*; pod red.: Gajjar C.R., King M.W.: *Resorbable Fiber-Forming Polymers for Biotextile Applications*. SpringerBriefs in Materials. Springer, Cham. USA, 2014.
 30. Egbuta M.A., McIntosh S., Waters D.L.E., Vancov T., Liu, L. *Biological Importance of Cotton By-Products Relative to Chemical Constituents of the Cotton Plant*. *Molecules*, 2017, 22 (1), 93,1-25.
 31. Gotmare V., Singh P., Tule B. *Wild and cultivated species of Cotton*; CICR Technical bulletin No.5, Mumbai-Maharashtra, 2000.

32. Liu C., Yuan D., Zhang X., Lin Z. *Isolation, characterization and mapping of genes differentially expressed during fibre development between Gossypium hirsutum and G. barbadense by cDNA-SRAP*. J. Genet. 2013, 92, 175-181.
33. Essien E.E., Aboaba S.O., Ogunwande I.A. *Constituents and antimicrobial properties of the leaf essential oil of Gossypium barbadense (Linn.)*. J. Med. Plant Res. 2011, 5, 702-705.
34. Ayeni M.J., Oyeyemi S.D., Kayode J., Peter G.P. *Phytochemical, proximate and mineral analyses of the leaves of Gossypium hirsutum L. and Momordica charantia L.* J. Nat. Sci. Res. 2015, 5, 99-107.
35. Sowmya C., Suryaprakash Reddy C., Amrutha V., Anilkumar D., Lohitha M. *Transdermal therapeutic systems - an overview*. IJPIR, 2012, 02, 02, 197-211.
36. Bojarczuk K.A., Lewicki M., Michalczak M., Smoleń A. *Evaluation of students' knowledge about skin care*. J. Educ. Health Sport. 2016, 6(6), 661-676.
37. <http://www.eucerin.pl/o-skorze/podstawowe-informacje-o-skorze/struktura-i-funkcje-skory> [dostęp: 18.02.2018].
38. Śliwowska A. *Badanie właściwości fizykochemicznych i aplikacyjnych formułacji kosmetycznych zawierających jasmonidy wraz z oceną kinetyki ich przenikania przez bariery imitujące skórę*, UAM, Poznań, 2017.
39. McGrath J.A., Uitto J. *Anatomy and organization of human skin*. Rook's Textbook of Dermatology, 2010, 8, 1-53.
40. Halprin K. M. *Epidermal "Turnover Time" – A Re-Examination*, Br. J. Dermatol. 1972, 86(1),1419.
41. Jones B.F. *A reappraisal of the use of infrared thermal image analysis in medicine*. IEEE Trans. Med. Imaging. 1998, 17(6), 1019-1027.
42. Jablonski N.G., Chaplin G. *The evolution of human skin coloration*. J. Hum. Evol. 2000, 39(1), 57-106.
43. Brody I. *An ultrastructural study on the role of the keratohyalin granules in the keratinization process*. J. Ultrastruct. Res. 1959, 3(1), 84-104.
44. Welzel J., Lankenau E., Birngruber R., Engelhardt R. *Optical coherence tomography of the human skin*. JAAD, 1997, 37(6), 958-963.
45. Choi M.J., Maibach H.I. *Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin*. Am. J. Clin. Dermatol. 2005, 6(4), 215-223.
46. Jaworska M., Sikora E., Ogonowski J. *Factors influencing the percutaneous penetration of active ingredients*. Wiad Chem, 2011, 3-4, 301-320.
47. Lawton S. *Skin barrier function and the use of emollients in dermatological nursing*. Br J Nurs, 2007, 16(12), 24-39.
48. Goldring S.R., Stephenson M.L., Downie E., Krane S.M., Korn J.H. *Heterogeneity in hormone responses and patterns of collagen synthesis in cloned dermal fibroblasts*. J. Clin. Investig, 1990, 85(3), 798.
49. Epstein E.H., Munderloh N.H. *Human skin collagen. Presence of type I and type III at all levels of the dermis*. J Biol Chem, 1978, 253(5), 1336-1337.
50. Welzel J. *Optical coherence tomography in dermatology: a review*. Skin Res Technol, 2001, 7(1), 1-9.

51. Malinowska M., Sikora E., Ogonowski J. *Percutaneous penetration of active cosmetics ingredients*. Wiad Chem, 2013, 67, 3-4, 321-344.
52. Czerwonka W., Puchalska D., Lipińska M., Habrat A. *Mechanisms and methods of active ingredients penetration through the skin lipid barrier*. Kosmetologia Estetyczna, 2018, 7(6), 667-671.
53. Hendrich A. B., Wesolowska O., Komorowska M., Motohashic N., Michalaka K. *The alterations of lipid bilayer fluidity induced by newly synthesized phenothiazine derivative*. Biophysical Chemistry, 2002, 275-285.
54. Benson H.A. *Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques*. Curr. Drug Deliv. 2005, 2(1), 23-33.
55. Knorr F., Lademann J., Patzelt A., Sterry W., Blume-Peytavi U., Vogt A. *Follicular transport route – research progress and future perspectives*. Eur J Pharm Biopharm. 2009, 71(2), 173-180.
56. Arct J., Chełkowska M. *Czy możliwe jest przewidywanie zdolności wnikania w skórę aktywnych składników produktów kosmetycznych?*, Wiadomości PTK, 2001, 4(3/4), 37- 42.
57. <http://www.aptekarzpolski.pl/2016/06/systemy-terapeutyczne/> [dostęp:19.09.2019].
58. Prokopowicz M., Różycki K.M. *Innovation in cosmetics*. WSN, 2017, 72, 448-456.
59. Sinha V.R., Kaur M.P. *Permeation enhancers for transdermal drug delivery*, Drug Dev Ind Pharm, 2000, 26(11), 1131-1140.
60. Williams A. C., Barry B. W. *Penetration enhancers*. Adv. Drug Deliv. Rev., 2012, 64, 128-137.
61. Pathan I.B., Setty C.M. *Chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery systems*. Trop. J. Pharm. Res., 2009, 8(2), 173-179.
62. Karakatsani M., Dedhiya M., Plakogiannis, F.M. *The effect of permeation enhancers on the viscosity and the release profile of transdermal hydroxypropyl methylcellulose gel formulations containing diltiazem HCl*. Drug Dev Ind Pharm, 2010, 36(10), 1195-1206.
63. Markowska-Radomska A. *Mechanizmy dyfuzji i fragmentacji w procesie uwalniania składnika z emulsji wielokrotnych*, Politechnika Warszawska, Warszawa, 2012.
64. Kumirska J., Stepnowski P. *Zastosowanie technik chromatograficznych do analizy chityny i chitozanu*, Lab, 2015, 4, 24-29.
65. Zamani A., Edebo L., Sjöström B., Taherzadeh M.J. *Extraction and precipitation of chitosan from cell wall of zygomycetes fungi by dilute sulfuric acid*. Biomacromol., 2007, 8, 3786-3790.
66. Draczyński Z. *Kopoliester butyrylo-acetylowy chityny jako nowy aktywny składnik nanokompozytów polimerowo-włóknistych*. Zeszyty Naukowe Nr 1159, Politechnika Łódzka, Łódź, 2013.
67. Rinaundo M. *Chitin and chitosan: Properties and applications*. Prog. Polym. Sci. 2006, 31, 603-632.
68. Synowiecki J., Khateeb N.A. *Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 2003, 43, 145-171.

69. Xia W., Liu P., Zhang J., Chen J. *Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides*. Food Hydrocoll, 2011, 25(2), 170-179.
70. <https://pl.wikipedia.org/wiki/Chitozan> [dostęp: 16.05.2020].
71. Aranaz I., Mengibar M., Harris R., Paños I., Miralles B., Acosta N., Galed G., Heras A. *Functional Characterization of Chitin and Chitosan*. Curr. Chem. Biol. 2009, 3, 203-230.
72. Mun S., Decker E.A., McClements D.J. *Effect of molecular weight and degree of deacetylation of chitosan on the formation of oil in water emulsions stabilized by surfactant-chitosan membranes*. J. Colloid. Interface Sci. 2006, 296, 581-590.
73. Lavertu M., Methot S., Tran-Khanh N., Buschmann M.D. *High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation*. Biomater. 2006, 27, 4815-4824.
74. Wang L.Y., Gu Y.H., Zhou Q.Z., Ma G.H., Wan Y.H., Su Z.G. *Preparation and characterization of uniform-sized chitosan microspheres containing insulin by membrane emulsification and two-step solidification process*, Colloids Surf. 2006, 50, 2, 126-135.
75. Silva C.M., Ribeiro A.J., Figueiredo M., Ferreira D., Veiga corresponding F. *Microencapsulation of hemoglobin in chitosan-coated alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation*. AAPS J, 2006, 13, 903-913.
76. Cosgrove J. *The Global Chitosan Market*. Nutraceuticals World Magazine, 2010.
77. Yang B.Y., Ding Q., Montgomery R. *Preparation and physical properties of chitin fatty esters*. Carbohydr. Res., 2009, 344, 3, 336-342.
78. Skożucka-Szary K., Rieske P., Piaskowski P. *Praktyczne aspekty zastosowania chityny i jej pochodnych w leczeniu ran*. Chemik, 2016, 70, 2, 89-98.
79. Skożucka-Szary K., Ramięga A., Piaskowska W., Janicki B., Grala M., Rieske P., Bartczak Z., Piaskowski S. *Synthesis and physicochemical characterization of chitin dihexanoate – A new biocompatible chitin derivative – In comparison to chitin dibutyrate*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2016, 60, 489-502.
80. Błasińska A. *Biofunkcyjne materiały włókninowe z dibutyrylochityny*. Zeszyty Naukowe Nr 1136, Politechnika Łódzka, Łódź, 2012.
81. Szosland L. *Synthesis of highly substituted butyryl chitin in the presence of perchloric acid*. J. Bioact. Compat. Polym. 1996, 11, 1, 61-71.
82. Szymonowicz M., Paluch D., Solski L., Pelka S., Błasińska A., Krucińska I., Szosland L. *Evaluation of the Influence of Dibutyrylchitin Material for Activation of Blood Coagulation System*. Inżynieria Biomateriałów, 2004, 123, 38-42.
83. Wawro D., Stęplewski W., Ciechańska D., Krucińska I., Wesołowska E. *The effect of solvent type on the mechanical properties of dibutyrylochitin (DBC) fibres*, Fibres Text. East. Eur., 2007, 3(62), 14-18.
84. Włochowicz A., Szosland L., Biniś D., Szumilewicz J. *Crystalline structure and mechanical properties of wet-spun dibutyrylchitin fibers and products of their alkaline treatment*. J. Appl. Polym. Sci., 2004, 94, 1861-1868.
85. Szosland L. *Synthesis of highly substituted butyryl chitin in the presence of perchloric acid*. J. Bioact. Compat. Polym. 1996, 11(1), 61-71.

86. Krucińska I., Komisarczyk A., Chrzanowski M., Paluch D. *Producing Wound Dressing Materials from Chitin Derivatives by Forming Nonwovens Directly from Polymer Solution*. *Fibres Text. East. Eur.* 2007, 15, 5-6 (64), 73-76.
87. Krucińska I., Komisarczyk A., Chrzanowski M., Gliścińska E., Wrzosek H. *Electrostatic field in electrospinning with a multicapillary head – Modelling and experiment*, *Fibres Text. East. Eur.* 2009, 3(74) 38-44.
88. Bračić M., Strnad S., Fras Zemljič L. *Polysaccharides in Medical Applications*; pod red.: Navard P.: *Bioactive Functionalisation of Silicones with Polysaccharides*. SpringerBriefs in Molecular Science, Springer, Cham, 2018; 17-26.
89. Basu A., Kunduru K.R., Abteew E., Domb A.J. *Polysaccharide-based conjugates for biomedical applications*. *Bioconjug. Chem.* 2015, 26, 1396-1412.
90. Muszyńska B., Jękot B., Topolska-Pasek M., Rzewińska A. *Właściwości prozdrowotne węglowodanów występujących w algach*. *FarmPol*, 2016, 72(7), 2-13.
91. Boguń M. *Nanokompozytowe włókna alginianowe i kompozyty z ich udziałem do zastosowań w inżynierii biomateriałowej*. Zeszyty Naukowe nr 1062, Politechnika Łódzka, Łódź, 2010.
92. Varaprasad K., Jayaramudu T., Kanikireddy V., Toro C., Sadiku E.R. *Alginate-based composite materials for wound dressing application: A mini review*. *Carbohydr. Polym.* 2020, 236, 116025.
93. Adeleke O.A. *Premium Ethylcellulose Polymer-Based Architectures at Work in Drug Delivery*. *Int. J. Pharm.*: X, 2019, 100023, 1-15.
94. Mehta R., Teckoe J., Schoener C., Workentine S., Ferrizzi D., Rajabi-Siahboomi A. *Investigation into the Effect of Ethylcellulose Viscosity Variation on the Drug Release of Metoprolol Tartrate and Acetaminophen Extended Release Multiparticulates – Part I*. *AAPS PharmSciTech*, 2016, 17, 1366-1375.
95. Davidovich-Pinhas M., Barbut S., Marangoni A.G. *Physical structure and thermal behavior of ethylcellulose*. *Cellulose*, 2014, 21, 3243-3255.
96. Rowe R.C., Sheskey P., Quinn M. *Handbook of pharmaceutical excipients*. Pharmaceutical Press, wyd. 6, London, UK, 2009, 262-267.
97. Grund J., Koerber M., Walther M., Bodmeier R. *The effect of polymer properties on direct compression and drug release from water-insoluble controlled release matrix tablets*. *Int. J. Pharm.* 2014, 469(1), 94-101.
98. Zhang C., Tang J., Liu D., Li X., Cheng L., Tang X. *Design and evaluation of an innovative floating and bioadhesive multiparticulate drug delivery system based on hollow structure*. *Int. J. Pharm.* 2016, 503 (1–2), 41-55.
99. Zhang Y., Huang Z., Omari-Siaw E., Lu S., Zhu Y., Jiang D., Wang M., Yu J., Xu X., Zhang W. *Preparation and in vitro–in vivo evaluation of sustained-release matrix pellets of capsaicin to enhance the oral bioavailability*. *AAPS PharmSciTech*, 2016, 17(2), 339-349.
100. Kobus-Cisowska J., Flaczyk E., Siger A., Kmiecik D. *Effect of the extraction process on yield and composition of selected extracts from maidenhair tree green and yellow leaves*. *Nauka Przyr. Technol.*, 2015, 9, 1, #9, 1-15.

101. Sabaner M.C., Dogan M., Altin S.S., Balaman C., Yilmaz C., Omur A., Zeybek I., Palaz M. *Ginkgo Biloba affects microvascular morphology: a prospective optical coherence tomography angiography pilot study*. *Int Ophthalmol*, 2021, 41, 1053-1061.
102. Dziwenka M., Coppock R.W. *Ginkgo biloba*; pod red.: Gupta R.C.: *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*. Elsevier, USA, 2016, 681-691.
103. DeFeudis F., Drieu K. *Ginkgo biloba extract (EGb 761) and CNS functions basic studies and clinical applications*. *Curr. Drug Targets*, 2005, 1(1), 25-58.
104. Pereira E., Barros L., Ferreira I. *Chemical characterization of Ginkgo biloba L. and antioxidant properties of its extracts and dietary supplements*. *Ind. Crops Prod.*, 2013, 51, 244-248.
105. O'Reilly J. *Ginkgo biloba – large scale extraction and processing*; pod red.: van Beek T.A.: *Ginkgo biloba*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Holandia, 2000, 99-109.
106. Zhang C.W., Wang C.Z., Tao R. *Analysis on the physicochemical properties of Ginkgo biloba leaves after enzymolysis based ultrasound extraction and Soxhlet extraction*. *Molecules*, 2016, 21(1) 97, 1-11.
107. Van Beek T.A. *Ginkgolides and bilobalide: their physical, chromatographic and spectroscopic properties*. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, 17, 5001-5012.
108. Singh B., Kaur P., Gopichand, Singh R.D., Ahuja P.S. *Biology and chemistry of Ginkgo biloba*. *Fitoterapia*, 2008, 79(6), 401-418.
109. Divya K., Jisha M.S. *Chitosan nanoparticles preparation and applications*. *Environ. Chem. Lett.* 2017, 16(1), 101-112.
110. Yuan L., Pan M., Shi K., Hu D., Li Y., Chen Y., Qian Z. *Nanocarriers for promoting skin delivery of therapeutic agents*, *Appl. Mater. Today*, 2022, 27, 101438, 1-19.
111. Whitesides G.M. *The 'right' size in nanobiotechnology*. *Nat Biotechnol.* 2003, 21(10), 1161-1165.
112. Makhluf S., Dror R., Nitzan Y., Abramovich Y., Jelinek R., Gedanken A. *Microwave-assisted synthesis of nanocrystalline MgO and its use as a bactericide*. *Adv Funct Mater*, 2005, 15(10), 1708-1715.
113. Carter P., Narasimhan B., Wang Q. *Biocompatible Nanoparticles and Vesicular Systems in Transdermal Drug Delivery for Various Skin Diseases*. *Int. J. Pharm.* 2019, 30, 555, 49-62.
114. Elahi N., Kamali M., Baghersad M.H. *Recent biomedical applications of gold nanoparticles: a review*. *Talanta*, 2018, 184, 537-556.
115. Chen Y., Wu Y., Gao J., Zhang Z., Wang L., Chen X., Mi J., Yao Y., Guan D., Chen B., Dai Y. *Transdermal vascular endothelial growth factor delivery with surface engineered gold nanoparticles*. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, 9(6), 5173-5180.
116. Siddiqi K.S., Husen A., Rao R.A.K. *A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties*. *J. Nanobiotechnology*, 2018, 16(1), 1-28.

117. Lio D.C.S., Liu C.H., Oo M.M.S., Wiraja C., Teo M.H.Y., Zheng M.J., Chew S.W.T., Wang X.M., Xu C.J. *Transdermal delivery of small interfering RNAs with topically applied mesoporous silica nanoparticles for facile skin cancer treatment*. *Nanoscale*, 2019, 11, 17041-17051.
118. Zou L., Ding W., Zhang Y., Cheng S., Li F., Ruan R., Wei P., Qiu B. *Peptide-modified vemurafenib-loaded liposomes for targeted inhibition of melanoma via the skin*. *Biomater.* 2018, 182, 1-12.
119. Hua S. *Lipid-based nano-delivery systems for skin delivery of drugs and bioactives*. *Front. Pharmacol*, 2015, 6:219, 1-5.
120. Jain S., Patel N., Shah M.K., Khatri P., Vora N. *Recent advances in lipid-based vesicles and particulate carriers for topical and transdermal application*. *J. Pharm. Sci.* 2017, 847, 106(2), 423-445.
121. Nounou M.M., El-Khordagui L.K., Khalafallah N.A., Khalil S.A. *Liposomal formulation for dermal and transdermal drug delivery: past, present and future*. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 2008, 2(1), 9-18.
122. Jiang T., Wang T., Li T., Ma Y., Shen S., He B., Mo R. *Enhanced transdermal drug delivery by transferrin-embedded oligopeptide hydrogel for topical chemotherapy of melanoma*. *ACS Nano*, 2018, 12, 9693-9701.
123. Escobar-Chávez J.J., Rodríguez-Cruz I.M., Domínguez-Delgado C.L., Díaz-Torres R., Revilla-Vázquez A.L., Alencaster N.C. *Nanocarrier systems for transdermal drug delivery*; pod red.: Sezer A.D.: *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*. InTech, 2012.
124. Touitou E., Dayan N., Bergelson L., Godin B., Eliaz M. *Ethosomes novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties*. *JCR*, 2000, 65(3), 403-418.
125. Namdeo A., Jain N. *Niosomal delivery of 5-fluorouracil*. *J. Microencapsul.* 1999, 855, 16(6), 731-740.
126. Mukherjee S., Ray S., Thakur R. *Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system*. *Indian J. Pharm. Sci.* 2009, 71(4), 349-358.
127. Bhaskar K., Anbu J., Ravichandiran V., Venkateswarlu V., Rao Y.M. *Lipid nanoparticles for transdermal delivery of flurbiprofen: formulation, in vitro, ex vivo and in vivo studies*. *Lipids Health Dis.* 2009, 8(1), 6, 1-15.
128. KÜchler S., Herrmann W., Panek-Minkin G., Blaschke T., Zoschke C., Kramer K.D., Bittl R., Schäfer-Korting M. *SLN for topical application in skin diseases. Characterization of drug-carrier and carrier-target interactions*. *Int. J. Pharm.* 2010, 390(2), 225-233.
129. Ferreira M., Barreiros L., Segundo M.A., Torres T., Selores M., Lima S.A.C., Reis S. *Topical co-delivery of methotrexate and etanercept using lipid nanoparticles: a targeted approach for psoriasis management*. *Colloids Surf.* 2017, 159, 23-29.
130. Dudhipala N., Gorre T. *Neuroprotective effect of ropinirole lipid nanoparticles enriched hydrogel for parkinson's disease: in vitro, ex vivo, pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation*. *Pharm.* 2020, 12, 448, 1-24.
131. You P.J., Yuan R., Chen C.Y. *Design and evaluation of lidocaine – and prilocaine-loaded nanoparticulate drug delivery systems for topical anesthetic analgesic*

- therapy: a comparison between solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers.* Drug Des. Dev. Ther., 2017, 11, 2743-2752.
132. Desai P., Patlolla R.R., Singh M. *Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery.* Mol. Membr. Biol. 2010, 27(7), 247-259.
 133. Zhang Y.T., Xia Q., Li Y.Y., He Z.H., Li Z., Guo T., Wu Z.H., Feng N.P. *CD44 assists the topical anti-psoriatic efficacy of curcumin-loaded hyaluronan-modified ethosomes: a new strategy for clustering drug in inflammatory skin.* Theranostics, 2019, 9, 48-64.
 134. De Mattos C.B., Argenta D.F., Melchiades G.D.L., Sechini Cordeiro M.N., Tonini M.L., Moraes M.H., Weber T.B., Roman S.S., Nunes R.J., Teixeira H.F., Steindel M., Koester L.S. *Nanoemulsions containing a synthetic chalcone as an alternative for treating cutaneous leishmaniasis: optimization using a full factorial design.* Int. J. Nanomed. 2015, 10, 5529-5542.
 135. Seong J.S., Yun M.E., Park S.N. *Surfactant-stable and pH-sensitive liposomes coated with N-succinyl-chitosan and chitoooligosaccharide for delivery of quercetin.* Carbohydr. Polym. 2018, 18, 659-667.
 136. Lee E.H., Lim S.J., Lee M.K. *Chitosan-coated liposomes to stabilize and enhance transdermal delivery of indocyanine green for photodynamic therapy of melanoma,* Carbohydr. Polym. 2019, 224, 115143, 1-7.
 137. Singh Y., Meher J.G., Raval K., Khan F.A., Chaurasia M., Jain N.K., Chourasia M.K. *Nanoemulsion: concepts, development and applications in drug delivery.* JCR, 2017, 252, 28-49.
 138. Cevc G., Gebauer D., Stieber J., Schatzlein A., Blume G. *Ultraflexible vesicles, transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin.* BBA, 1998, 1368, 201-215.
 139. Gupta P.N., Mishra V., Rawat A., Dubey P., Mahor S., Jain S., Chatterji D.P., Vyas S.P. *Non-invasive vaccine delivery in transfersomes, niosomes and liposomes: a comparative study.* Int. J. Pharm., 2005, 293, 73-82.
 140. Mishra D., Dubey V., Asthana A., Saraf D.K., Jain N.K. *Elastic liposomes mediated transcutaneous immunization against hepatitis B.* Vaccine, 2006, 24, 4847-4855.
 141. Sguizzato M., Mariani P., Spinozzi F., Benedusi M., Cervellati F., Cortesi R., Drechsler M., Prioux R., Valacchi G., Esposito E. *Ethosomes for coenzyme Q10 cutaneous administration: from design to 3D skin tissue evaluation.* Antioxidants, 2020, 9, 485, 1-19.
 142. Palmer B., DeLouise L. *Nanoparticle-Enabled Transdermal Drug Delivery Systems for Enhanced Dose Control and Tissue Targeting.* Molecules, 2016, 21(12), 1719, 1-17.
 143. Owen S.C., Chan D.P.Y., Shoichet M.S. *Polymeric micelle stability,* Nano Today, 2012, 7, 53-65.
 144. Tadros T.F. *Applied Surfactants: Principles and Applications,* John Wiley & Sons, Wokingham, UK, 2006.

145. Zheng X., Xie J.Z., Zhang X., Sun W.T., Zhao H.Y., Li Y.T., Wang C. *An overview of polymeric nanomicelles in clinical trials and on the market*. Chin. Chem. Lett., 2021, 32, 243-257.
146. Hwang D., Ramsey J.D., Kabanov A.V. *Polymeric micelles for the delivery of poorly soluble drugs: from nanoformulation to clinical approval*. Adv. Drug Deliv. Rev. 2020, 156, 80-118.
147. Lapteva M., Mignot M., Mondon K., Moller M., Gurny R., Kalia Y.N. *Self-assembled mPEG-hexPLA polymeric nanocarriers for the targeted cutaneous delivery of imiquimod*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2019, 142, 553-562.
148. Yuan L.P., Pan M., Lei M.Y., Zhou X.L., Hu D.R., Liu Q.Y., Chen Y., Li W., Qian Z.Y. *A novel composite of micelles and hydrogel for improving skin delivery of hydrocortisone and application in atopic dermatitis therapy*. Appl. Mater. Today, 2020, 19, 100593.
149. Zhou Q., Zhang L., Yang T.H., Wu H. *Stimuli-responsive polymeric micelles for drug delivery and cancer therapy*. Int. J. Nanomed. 2018, 13, 2921-2942.
150. Shi L.Q., Feng H.Y., Li Z.R., Shi J., Jin L., Li J.G. *Co-delivery of paclitaxel and siRNA with pH-responsive polymeric micelles for synergistic cancer therapy*. J. Biomed. Nanotechnol. 2021, 17, 322-329.
151. Dianzani C., Zara G.P., Maina G., Pettazzoni P., Pizzimenti S., Rossi F., Barrera G. *Drug delivery nanoparticles in skin cancers*. Biomed Res. Int. 2014, 1-13.
152. Santos A., Veiga F., Figueiras A. *Dendrimers as pharmaceutical excipients: synthesis, properties, toxicity and biomedical applications*. Mater. 2020, 13:65.
153. Buhleier E., Wehner W., Vögtl F. „Cascade“ and „Nonskid-Chainlike“ syntheses of molecular cavity and topologies. Synth. 1978, 2, 155-158.
154. Sękowski S., Miłowska K., Gabryelak T. *Dendrimers in biomedical sciences and nanotechnology*. Postepy Hig Med Dosw. 2008, 62, 725-733.
155. Klajnert B., Przygodzki T. *Dendrimers in therapeutic applications*. Post. Biochem., 2003, 49, s. 290-297.
156. Svenson S., Tomalia, D.A. *Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field*. Adv. Drug Deliv. Rev. 2012, 64, 102-115.
157. Mendes L.P., Pan J.Y., Torchilin V.P. *Dendrimers as nanocarriers for nucleic acid and drug delivery in cancer therapy*. Molecules, 2017, 22 (9):1401, 1-21.
158. Chauhan A.S., Sridevi S., Chalasani K.B., Jain A.K., Jain S.K., Jain N.K., Diwan P.V. *Dendrimer-mediated transdermal delivery: enhanced bioavailability of indomethacin*. JCR, 2003, 90(3), 335-343.
159. Kesharwani P., Jain K., Jain N.K. *Dendrimer as nanocarrier for drug delivery*. Prog. Polym. Sci. 2014, 39(2), 268-307.
160. Venuganti V.V.K., Perumal O.P. *Effect of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimer on skin permeation of 5-fluorouracil*. Int. J. Pharm. 2008, 361(1-2), 230-238.
161. Hoenzke S., Gerecke C., Elpelt A., Zhang N., Unbehauen M., Kral V., Fleige E., Paulus F., Haag R., Schaefer-Korting M., Kleuser B., Hedtrich S. *Tailored dendritic core-multishell nanocarriers for efficient dermal drug delivery: a systematic top-down approach from synthesis to preclinical testing*. JCR, 2016, 242, 50-63.

162. Niederhafner P., Sebestik J., Jezek J. *Peptide dendrimers*. J. Pept. Sci. 2005, 11(12), 757-788.
163. Lohan S.B., Icken N., Teutloff C., Saeidpour S., Bittl R., Lademann J., Fleige E., Haag R., Haag S.F., Meinke M.C. *Investigation of cutaneous penetration properties of stearic acid loaded to dendritic core-multi-shell (CMS) nanocarriers*. Int. J. Pharm. 2016, 501, 271-277.
164. Dias A.P., Santos S.D., da Silva J.V., Parise R., Ferreira E.I., El Seoud O., Giarolla J. *Dendrimers in the context of nanomedicine*. Int. J. Pharm. 2020, 573, 118814, 1-85.
165. Yang Y., Pearson R.M., Lee O., Lee C.W., Chatterton R.T., Khan S.A., Hong S. *Dendron-based micelles for topical delivery of endoxifen: a potential chemopreventive medicine for breast cancer*. Adv. Funct. Mater. 2014, 24, 2442-2449.
166. Lerch S., Dass M., Musyanovych A., Landfester K., Mailänder V. *Polymeric nanoparticles of different sizes overcome the cell membrane barrier*. Eur J Pharm Biopharm, 2013, 84, 265-274.
167. Michalak G., Głuszek K., Piktel E., Deptuła P., Puszkarz I., Niemirowicz K., Bucki R. *Polymeric nanoparticles – a novel solution for delivery of antimicrobial agents*. Medical Studies/Studia Medyczne, 2016, 32(1), 56-62.
168. Mahapatro A., Singh D.K. *Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines*. J Nanobiotechnol, 2011, 9, 55, 1-11.
169. Khalil I., Burns A., Radecka I., Kowalczyk M., Khalaf T., Adamus G., Johnston B., Khechara, M. *Bacterial-Derived Polymer Poly- γ -Glutamic Acid (γ -PGA)-Based Micro/Nanoparticles as a Delivery System for Antimicrobials and Other Biomedical Applications*. Int. J. Mol. Sci. 2017, 18(2), 313, 1-18.
170. Karlsson J., Vaughan H.J., Green J.J., Doherty M.F., Segalman R.A., Kane R.S. *Biodegradable polymeric nanoparticles for therapeutic cancer treatments*. Annu Rev Chem Biomol Eng, 2018, 9, 105-127.
171. Goyal R., Macri L.K., Kaplan H.M., Kohn J. *Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery*. JCR, 2016, 240, 77-92.
172. Ghormade V., Deshpande M.V., Paknikar K.M. *Perspectives for nanobiotechnology enabled protection and nutrition of plants*. Biotechnol Adv. 2011, 29(6), 792-803.
173. Liu X., Heng W.S., Paul, Li P.Q., Chan L.W. *Novel polymeric microspheres containing norcantharidin for chemoembolization*. JCR, 2006, 116, 35-41.
174. Abe T., Sakane M., Ikoma T., Kobayashi M, Nakamura S., Ochiai N. *Intraosseous delivery of paclitaxel-loaded hydroxyapatitealginate composite beads delaying paralysis caused by metastatic spine cancer in rats*. J. Neurosurg. Spine, 2008, 9, 502-510.
175. Bouhadir K.H., Alsberg E., Mooney D.J. *Hydrogels for combination delivery of antineoplastic agents*. Biomater. 2001, 22, 2625-2633.
176. Al-Ghananeem A.M., Malkawi A.H., Muammer Y.M., Balko J.M., Black E.P., Mourad W., Romond E. *Intratumoral delivery of Paclitaxel in solid tumor from*

- biodegradable hyaluronan nanoparticle formulations*. AAPS PharmSciTech, 2009, 10, 410-417.
177. Gerber D.E., Gallia G.L., Tyler B.M., Eberhart C.G., Royer G., Grossman S.A. *A novel polymer gel for the delivery of local therapies to intracranial tumors: In vivo safety evaluation*. J. Biomed. Mater. Res. A, 2011, 99, 479-484.
 178. Li X., Kong X., Zhang J., Wang Y., Wang Y., Shi S., Guo G., Luo F., Zhao X., Wei Y., Qian Z. *A novel composite hydrogel based on chitosan and inorganic phosphate for local drug delivery of camptothecin nanocolloids*. J. Pharm. Sci. 2011, 100, 232-241.
 179. Ampollini L., Sonvico F., Barocelli E., Cavazzoni A., Bilancia R., Mucchino C., Cantoni A.M., Carbognani P. *Intrapleural polymeric films containing cisplatin for malignant pleural mesothelioma in a rat tumour model: a preliminary study*. Eur. J. Cardiothorac. Surg. 2010, 37, 557-565.
 180. Davidson B.S., Izzo F., Cromeens D.M., Stephens L.C., Siddik Z.H., Curley S.A. *Collagen matrix cisplatin prevents local tumor growth after margin-positive resection*. J. Surg. Res. 1995, 58, 618-624.
 181. Almond B.A., Hadba A.R., Freeman S.T., Cuevas B.J., York A.M., Detrisac C.J., Goldberg E.P. *Efficacy of mitoxantrone-loaded albumin microspheres for intratumoral chemotherapy of breast cancer*. JCR, 2003, 9, 147-155.
 182. McDaniel J.R., Callahan D.J., Chilkoti A. *Drug delivery to solid tumors by elastin-like polypeptides*, Adv. Drug Deliv. Rev., 2010, 62, 1456-1467.
 183. Konishi M., Tabata Y., Kariya M., Suzuki A., Mandai M., Nanbu K., Takakura K., Fujii S. *In vivo anti-tumor effect through the controlled release of cisplatin from biodegradable gelatin hydrogel*. JCR, 2003, 92, 301-313.
 184. Stuart K., Stokes K., Jenkins R., Trey C., Clouse M. *Treatment of hepatocellular carcinoma using doxorubicin/ethiodized oil/gelatin powder chemoembolization*. Cancer, 1993, 72, 3202-3209.
 185. Shokry M., Hathout R. M., Mansour S. *Exploring gelatin nanoparticles as novel nanocarriers for Timolol Maleate: Augmented in-vivo efficacy and safe histological profile*. Int. J. Pharm. 2018, 545(1-2), 229-239.
 186. Hoffman A.S. *The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems*. JCR, 2008, 153-163.
 187. De Souza R., Zahedi P., Allen C.J., Piquette-Miller M. *Polymeric drug delivery systems for localized cancer chemotherapy*. Drug Deliv. 2010, 17, 365-375.
 188. Moses M.A., Brem H., Langer R. *Advancing the field of drug delivery: taking aim at cancer*. Cancer Cell, 2003, 4, 337-341.
 189. Reza M.S., Quadir M.A., Haider S.S. *Comparative evaluation of plastic, hydrophobic and hydrophilic polymers as matrices for controlled-release drug delivery*, J. Pharm. Sci. 2003, 6, 282-291.
 190. Wolinsky J.B., Colson Y.L., Grinstaff M.W. *Local drug delivery strategies for cancer treatment: Gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers*. JCR, 2012, 159(1), 14-26.

191. Chatterjee S., Hui P.C.L. *Review of applications and future prospects of stimuli-responsive hydrogel based on thermo-responsive biopolymers in drug delivery systems*. Polym. 2021, 13(13):2086, 1-15.
192. Chatterjee S., Hui C. L. *Review of stimuli-responsive polymers in drug delivery and textile application*. Molecules, 2019, 24(14):2547, 1-18.
193. Zhang Z., Tsai P.C., Ramezanli T., Michniak-Kohn B.B. *Polymeric nanoparticles-based topical delivery systems for the treatment of dermatological diseases*. Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol, 2013, 5(3), 205-218.
194. Hines D.J., Kaplan D.L. *Poly(lactic-co-glycolic) acid-controlled-release systems: Experimental and modeling insights*. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 2013, 30, 257-276.
195. Gentile P., Chiono V., Carmagnola I., Hatton P.V. *An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering*. Int. J. Mol. Sci. 2014, 15, 3640-3659.
196. Sun L., Liu Z., Wang L., Cun D., Tong H.H., Yan R., Chen X., Wang R., Zheng Y. *Enhanced topical penetration, system exposure and anti-psoriasis activity of two particle-sized, curcumin-loaded PLGA nanoparticles in hydrogel*. JCR, 2017, 254, 44-54.
197. Baroli B., Ennas M.G., Loffredo F., Isola M., Pinna R., Lopez-Quintela M.A. *Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin*. J. Investig. Dermatol. 2007, 127, 1701-1712.
198. Patzelt A., Richter H., Knorr F., Schafer U., Lehr C.M., Daehne L., Sterry W., Lademann J. *Selective follicular targeting by modification of the particle sizes*. JCR, 2011, 150(1), 45-48.
199. Nardin C., Bolikal D., Kohn J. *Nontoxic block copolymer nanospheres: design and characterization*. Langmuir. 2004, 20(26), 11721-11725.
200. Sheihet L., Dubin R.A., Devore D., Kohn J. *Hydrophobic drug delivery by self-assembling triblock copolymer-derived nanospheres*. Biomacromolecules. 2005, 6(5), 2726-2731.
201. Batheja P., Sheihet L., Kohn J., Singer A.J., Michniak-Kohn B. *Topical drug delivery by a polymeric nanosphere gel: formulation optimization and in vitro and in vivo skin distribution studies*. JCR, 2011, 149(2), 159-167.
202. Ramezanli T., Kilfoyle B.E., Zhang Z., Michniak-Kohn B.B. *Polymeric nanospheres for topical delivery of vitamin D₃*. Int. J. Pharm. 2017, 516(1-2), 196-203.
203. Alvarez-Roman R., Barre G., Guy R.H., Fessi H. *Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection*. Eur J Pharm Biopharm, 2001, 52, 191-195.
204. Turos E., Shim J.Y., Wang Y., Greenhalgh K., Suresh Kumar Reddy G.S., Dickey S., Lim D.V. *Antibiotic-conjugated polyacrylate nanoparticles: new opportunities for development of anti-MRSA agents*. Bioorg Med Chem Lett, 2007, 17, 53-56.
205. Greenhalgh K., Turos E. *In vivo studies of polyacrylate nanoparticle emulsions for topical and systemic applications*. Nanomed. 2009, 5, 46-54.

206. Sachlos E., Czernuszka J.T. *Making tissue engineering scaffolds work. Review: The application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds.* Eur. Cell Mater. 2003, 5, 29-40.
207. Das S., Bellare J.R., Banerjee R. *Protein based nanoparticles as platforms for aspirin delivery for ophthalmologic applications.* Colloids Surf. B, 2012, 93, 161-168.
208. Vandervoort J., Ludwig A. *Preparation and evaluation of drug-loaded gelatin nanoparticles for topical ophthalmic use.* Eur J Pharm Biopharm, 2004, 57(2), 251-261. doi:10.1016/s0939-6411(03)00187-5.
209. Zhang X., Zhang H., Yin L., Hu R., Qiu T., Yin Y., Xiong X., Zheng H., Wang. Q. *A pH-sensitive nanosystem based on carboxymethyl chitosan for tumor-targeted delivery of daunorubicin.* JBN, 2016, 12(8), 1688-1698.
210. Hu R., Zheng H., Cao J., Davoudi Z., Wang Q. *Synthesis and in vitro characterization of carboxymethyl chitosan-CBA-doxorubicin conjugate nanoparticles as pH-sensitive drug delivery systems.* JBN, 2017, 13(9), 1097-1105.
211. Ohya Y., Shiratani M., Kobayashi H., Ouchi T. *Release behavior of 5-fluorouracil from chitosan-gel nanospheres immobilizing 5-fluorouracil coated with polysaccharides and their cell specific cytotoxicity,* J. Macromol. Sci. A. 1994, 31, 629-642.
212. Kim D.G., Jeong Y.I., Choi C., Roh S.H., Kang S.K., Jang M.K., Nah J.W. *Retinol-encapsulated low molecular water-soluble chitosan nanoparticles.* Int J Pharm, 2006, 319, 130-138.
213. Hasanovic A., Zehl M., Reznicek G., Valenta C. *Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles as a possible skin drug delivery system for aciclovir with enhanced stability.* J Pharm Pharmacol, 2009, 61, 1609-1616.
214. Özbaş-Turan S., Akbuğa J. *Plasmid DNA-loaded chitosan/TPP nanoparticles for topical gene delivery.* Drug Deliv. 2011, 18, 215-222.
215. Fereig S.A., El-Zaafarany G.M., Arafa M.G., Abdel-Mottaleb M.M.A. *Tacrolimus-loaded chitosan nanoparticles for enhanced skin deposition and management of plaque psoriasis.* Carbohydr. Polym. 2021, 268, 118238, 1-16.
216. Katas H., Hussain Z., Ling T.C. *Chitosan Nanoparticles as a Percutaneous Drug Delivery System for Hydrocortisone.* J. Nanomater. 2012, 1-11.
217. Al-Kassas R., Wen J., Cheng A.E.M., Kim A.M.J., Liu S.S.M., Yu J. *Transdermal delivery of propranolol hydrochloride through chitosan nanoparticles dispersed in mucoadhesive gel.* Carbohydr. Polym. 2016, 153, 176-186.
218. Nair R.S., Morris A., Billa N., Leong C.O. *An Evaluation of Curcumin-Encapsulated Chitosan Nanoparticles for Transdermal Delivery.* AAPS PharmSciTech, 2019, 20, 69, s. 1-13.
219. Li F., Shi Y., Liang J., Zhao L. *Curcumin-loaded chitosan nanoparticles promote diabetic wound healing via attenuating inflammation in a diabetic rat model.* J. Biomater. Appl. 2019, 088532821986092, 1-11.
220. Ta Q., Ting J., Harwood S., Browning N., Simm A., Ross K., Olier I., Al-Kassas R. *Chitosan nanoparticles for enhancing drugs and cosmetic components penetration through the skin.* Eur. J. Pharm. Sci. 2021, 160, 105765, 1-15.

221. Wang T., Zheng Y., Shen Y., Shi Y., Li F., Su C., Zhao L. *Chitosan nanoparticles loaded hydrogels promote skin wound healing through the modulation of reactive oxygen species*. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2017, 46 (Sup1), 138-149.
222. Sami D.G., Abdellatif A., Azzazy H.M.E. *Turmeric/Oregano Formulations for Treatment of Diabetic Ulcer Wounds*. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 2020, 46(10), 1613-1621.
223. Jafari A., Hassanajili S., Karimi M.B., Emami A., Ghaffari F., Azarpira N. *Effect of organic/inorganic nanoparticles on performance of polyurethane nanocomposites for potential wound dressing applications*. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2018, 88, 395-405.
224. Loo H.L., Goh B.H., Lee L.H., Chuah L.H. *Application of chitosan-based nanoparticles in skin wound healing*. *AJPS*, 2022, 17, 3, 299-332.
225. Tiyafoonchai W. *Chitosan nanoparticles: a promising system for drug delivery*. *Naresuan Univ. Eng. J.* 2003,11(3), 51-66.
226. Sailaja A., Amareshwar P., Chakravarty P. *Different techniques used for the preparation of nanoparticles using natural polymers and their application*. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2011, 3(Suppl 2), 45-50.
227. Calvo P., Remunan-Lopez C., Vila-Jato J.L., Alonso M.J. *Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers*. *J. Appl. Polym. Sci.* 1997, 63(1), 125-132.
228. Fan W., Yan W., Xu Z., Ni H. *Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique*. *Colloids Surf.* 2012, 90, 21-27.
229. Yanat M., Schroën K. *Preparation methods and applications of chitosan nanoparticles; with an outlook toward reinforcement of biodegradable packaging*. *React Funct Polym.* 2021, 161, 104849, 1-12.
230. Liu H., Gao C. *Preparation and properties of ionically cross-linked chitosan nanoparticles*. *Polym. Adv. Technol.* 2009, 20, 613-619.
231. Hejjaji E.M.A., Smith A.M., Morris G.A. *Evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan nanoparticles prepared using different chitosan to tripolyphosphate (CS:TPP) ratios*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018, 120, 1610-1617.
232. Quiñones J.P., Peniche H., Peniche C. *Chitosan based self-assembled nanoparticles in drug delivery*. *Polym.* 2018, 10, 1-32.
233. Yang Y., Wang S., Wang Y., Wang X., Wang Q., Chen M. *Advances in self-assembled chitosan nanomaterials for drug delivery*. *Biotechnol. Adv.* 2014, 32, 1301-1316.
234. Chen Y., Mohanraj V.J., Parkin J.E. *Chitosan-dextran Sulfate Nanoparticles for delivery of an anti-angiogenesis peptide*. *Lett Peptide Sci.* 2003, 10(5), 621-629.
235. Denuziere A., Ferrier D., Damour O., Domard A. *Chitosan–chondroitin sulfate and chitosan–hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties*. *Biomater.* 1998, 19(14), 1275-1285.
236. Ichikawa S., Iwamoto S., Watanabe J. *Formation of biocompatible nanoparticles by self-assembly of enzymatic hydrolysates of chitosan and carboxymethyl cellulose*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69(9), 1637-1642.

237. Maitra A., Ghosh P.K., De T.K., Sahoo S.K. *Process for the preparation of highly monodispersed polymeric hydrophilic nanoparticles*. Patent US5874111A, 1999.
238. Gaur U., Sahoo S.K., De T.K., Ghosh P.C., Maitra A., Ghosh P.K. *Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system*. *Int. J. Pharm.* 2000, 202(1), 1-10.
239. Mitra S., Gaur U., Ghosh P.C., Maitra A.N. *Tumour targeted delivery of encapsulated dextran–doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier*. *JCR*, 2001, 74(1), 317-323.
240. Bhattarai N., Ramay H.R., Chou S.H., Zhang M. *Chitosan and lactic acid-grafted chitosan nanoparticles as carriers for prolonged drug delivery*. *Int J Nanomed*, 2006, 1(2), 181-187.
241. Thinh N.N., Hanh P.T.B., Ha L.T.T., Anh L.N., Hoang T.V., Hoang, V.D., Dang L.H., Khoi N.V., Lam T.D. *Magnetic chitosan nanoparticles for removal of Cr(VI) from aqueous solution*. *Mater. Sci. Eng.* 2013, 33(3), 1214-1218.
242. Yuwei C., Jianlong W. *Preparation and characterization of magnetic chitosan nanoparticles and its application for Cu(II) removal*. *Chem. Eng. J.* 2011, 168 (1), 286-292.
243. Massella D., Leone F., Peila R., Barresi A.A., Ferri A., *Functionalization of Cotton Fabrics with Polycaprolactone Nanoparticles for Transdermal Release of Melatonin*. *J. Funct. Biomater.* 2018, 9(1), 1-15.
244. Cevc G., Vierl U. *Nanotechnology and the transdermal route. A state of the art review and critical appraisal*. *JCR*, 2010, 141, 277-299.
245. Soppimath K.S., Aminabhavi T.M., Kulkarni A.R., Rudzinski W.E. *Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices*. *JCR*, 2001, 70, 1-20.
246. Hans M.L., Lowman A.M. *Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting*. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 2002, 6, 319-327.
247. Calvo N.L., Sreekumar S., Svetaz L.A., Lamas M.C., Moerschbacher B.M., Leonardi D. *Design and Characterization of Chitosan Nanoformulations for the Delivery of Antifungal Agents*. *Int J Mol Sci.*, 2019, 20(15):3686, 1-16.
248. Rajivgandhi G., Saravanan K., Ramachandran G., Li J.L., Yin L., Quero F., Alharbi N.S., Kadaikunnan S., Khaled J.M., Manoharan N., Li W.J. *Enhanced anti-cancer activity of chitosan loaded Morinda citrifolia essential oil against A549 human lung cancer cells*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020, 164, 4010-4021.
249. Menezes P.D., Frank L.A., Lima B.D., de Carvalho Y.M., Serafini M.R., Quintans-Júnior L.J., Pohlmann A.R., Guterres S.S., Araújo A.A. *Hesperetin-loaded lipid-core nanocapsules in polyamide: a new textile formulation for topical drug delivery*. *Int. J. Nanomedicine*, 2017, 12, 2069-2079.
250. Arroyo-Maya I. J., McClements, D. J. *Biopolymer nanoparticles as potential delivery systems for anthocyanins: Fabrication and properties*. *Food Res. Int.* 2015, 69, 1-8.
251. Ghaheh F.S., Khoddami A., Alihosseini F., Gomes A., Ribeiro A., Cavaco-Paulo A., Silva C. *Protein-based nanoformulations for α -tocopherol encapsulation*. *Eng. Life Sci.* 2016, 17(5), 523-527.

252. Samaszko-Fierteck J., Roguszczyk P., Dmochowska B., Ślusarz R., Madaj J., *Rutyna – budowa, właściwości*, Wiad. Chem. 2016, 70, 7-8, 435-453.
253. Türkoğlu G.C., Sarıuşık A.M., Erkan G., Yıkılmaz M.S., Kontart O. *Micro- and nano-encapsulation of limonene and permethrin for mosquito repellent finishing of cotton textiles*. Iran. Polym. J. 2020, 29(4), 321-329.
254. Venturini C.G., Bruinsmann F.A., Contri R.V., Fonseca F.N., Frank L.A., D'Amore C.M., Raffin R.P., Buffon A., Pohlmann A.R., Guterres S.S. *Co-encapsulation of imiquimod and copaiba oil in novel nanostructured systems: promising formulations against skin carcinoma*. Eur. J. Pharm. Sci. 2015, 79, 36-43.
255. Mania S., Tylingo R. *Metoda kapsułkowania z wykorzystaniem systemu współosiowego*; pod red.: Tarko T., Duda-Chodak A., Witczak M., Najgebauer-Lejko D.: *Technologia produkcji i bezpieczeństwo żywności*. Polskie Towarzystwo Technologów Żywności, Kraków, 2014, 100-109.
256. Korus J., Achremowicz B., Sikora M. *Mikrokapsułkowanie substancji spożywczych*. ŻNTJ, 1997, 1(10), 30-40.
257. Bartkowiak A., Brylak W. *Hydrożelowe mikrokapsułki z udziałem naturalnych i chemicznie modyfikowanych chitozanów – właściwości mechaniczne i porowatość*. Polimery, 2006, 51, 7-8, 547-554.
258. Budnicka M., Gadomska-Gajadur A., Ruśkowski P., Synoradzki L. *Polimery biodegradowalne w leczeniu gruźlicy. Cz. I. Epidemiologia, terapia i metody leczenia*. Polimery, 2017, 62, 10, 711-719.
259. Piasecka A., Goderska K. *Mikrokapsułkowanie białek – metody i zastosowanie*. Biotechnologia, 2010, 1(88), 34-45.
260. Sharma S., Mittal A., Gupta V. K., Singh H. *Improved stabilization of microencapsulated Cathepsin B in harsh conditions*. Enzyme Microb. Technol. 2007, 40, 337-342.
261. Agnihotri N., Mishra R., Goda C., Arora M. *Microencapsulation - a novel approach in drug delivery: a review*. Indo-Glob. Res. J. Pharm. Sci. 2012, 2, 1-20.
262. Gilewicz P., Tal-Figiel B., Figiel W., Kwiecień M. *Nowoczesne rozwiązania w zakresie wytwarzania i kontroli jakości emulsji*. Czasopismo Techniczne. Chemia, 2012, 109, 2, 25-40.
263. Markowska-Radomska A. *Mechanizmy dyfuzji i fragmentacji w procesie uwalniania składnika z emulsji wielokrotnych*, Politechnika Warszawska, Warszawa, 2012.
264. Griffin W.C. *Classification of Surface-Active Agents by HLB*. J. Soc. Cosmet. Chem. 1949, 1, 311-326.
265. Samborska K. *Suszenie rozpyłowe w przemyśle spożywczym*, Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego, 2008, 1, 63-69.
266. Dłużewska E., *Mikrokapsułkowanie dodatków do żywności*. Przemysł Spożywczy, 2008, 5, 30-35.
267. Piątkowski M., Zbiciński I. *Plomieniowe suszenie rozpyłowe*. Inż. Ap. Chem., 2010, 49, 1, 87-88.
268. Sawicki W., Łepek P., Kleina M. *Otoczki na tabletkach i peletkach – budowa, funkcja, mechanizm i metody powlekania*. Farm Pol, 2010, 66(5), 378-382.

269. Stawarski T., Sieradzki E., Bartos N., Stawarska A. *Porównanie szybkości uwalniania pantoprazolu z tabletek dojelitowych i układów wielozbiornikowych*. Farm Pol, 2014, 70(5), 231-134.
270. Lasoń E., Ogonowski J. *Kapsułkowanie – metoda immobilizacji materiałów bioaktywnych*. Lab, 2012, 15(1), 29-35.
271. Reis C.P., Neufeld R.J., Vilela S., Ribeiro A.J., Veiga F. *Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles*. J. Microencapsul., 2006, 23(3), 245-257.
272. Vasir J.K., Tambwekar K., Garg S., *Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system*. Int. J. Pharm. 2003, 255(1-2), 13-32.
273. Varde N.K., Pack D. *Microspheres for controlled release drug delivery*. Expert Opin Biol Ther, 2004, 4(1), 1-17.
274. Burgess D.J., Hickey A.J. *Microsphere technology and applications*; pod red.: Swarbrick J.: *Encyclopedia of pharmaceutical technology*, Informa Healthcare, wyd.3, Boca Raton, USA, 2007, 2328-2337.
275. Sinha V.R., Singla A.K., Wadhawan S., Kaushik R., Kumria R., Bansal K., Dhawan S. *Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs*. Int. J. Pharm. 2004, 274(1-2), 1-33.
276. Szymańska E., Winnicka K., *Mikrosfery – nowoczesna postać leku do oczu o kontrolowanym uwalnianiu*. Technologia Postaci Leku, 2009, 65, 5, 378-386.
277. Sam M.T., Gayathri D.S., Sandhya K.V. *Formulation and evaluation of ketorolac tromethamine-loaded albumin microspheres for potential intramuscular administration*, AAPS Pharm Sci. Tech, 2007, 8(1), 1-9.
278. Vidhyalakshmi R., Bhakayaraj R., Subhasree R. S., *Encapsulation the Future of Probiotics – A Review*. Adv. Biol. Res. 2009, 3(3-4), 96-103.
279. Jyothi N.V., Prasanna P.M., Sakarkar S.N., Prabha K.S., Ramaiah P.S., Srawan G.Y. *Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency*. J Microencapsul. 2010, 27(3), 187-197.
280. Varde N.K., Pack D. *Microspheres for controlled release drug delivery*. Expert Opin Biol Ther, 2004, 4, 1-17.
281. Zhang J., Wang Y., Qu Q., Lu T., Li F., Wang, J., Yang A., Zou Y., Huang, C. *Preparation of Single, Heteromorphic Microspheres, and Their Progress for Medical Applications*. Macromol Mater Eng. 2020, 306(2), 2000593, 1-17.
282. Barbosa-Cànovas G.V., Ortega-Rivas E., Juliano P., Yan H. *Food Powders Physical Properties, Processing, and Functionality*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA, 2005.
283. Shahidi F., Han X-Q. *Encapsulation of food ingredients*, Crit Rev Food Sci Nutr. 1993, 33(6), 501-547.
284. <http://www.aptekarzpolski.pl/2016/04/technologie-malych-czastek-liposomy-mikroczastki-mikrokapsulki-mikrosfery-nanoczastki-lipidowe/> [dostęp:15.10.2018].
285. Brandau T. *Preparation of monodisperse controlled release microcapsules*. Int. J. Pharm. 2002, 242(1-2), 179-184.

286. Zsikó S., Csányi E., Kovács A., Mária Budai-Szücs , Gácsi A., Berkó S. *Methods to Evaluate Skin Penetration In Vitro*. Sci. Pharm. 2019, 87, 19, 1-22.
287. <https://biotts.com/dla-inwestorow/> [dostęp: 20.01.2022].
288. Shah V.P., Yacobi A., Rădulescu F.S., Miron D.S., Lane M.E. *A science based approach to topical drug classification system (TCS)*. Int. J. Pharm. 2015, 491, 21-25.
289. Kalia Y.N., Guy R.H. *Modeling transdermal drug release*. Adv. Drug Deliv. Rev. 2001, 48, 159-172.
290. Machado A.C.H.R., Lopes P.S. Raffier C.P. Haridass, I.N., Roberts M., Grice J. Leite-Silva V.R. *Skin Penetration*; pod red.: Sakamoto K., Lochhead H., Maibach H., Yamashita Y.: *Cosmetic Science and Technology: Principles and Applications*. Elsevier, 2017, Amsterdam, Holandia, 741-755.
291. Moser K., Kriwet K., Naik A., Kalia Y.N., Guy, R.H. *Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2001, 10, 103-112.
292. Delgado-Charro M.B., Guy R.H. *Effective use of transdermal drug delivery in children*. Adv. Drug Deliv. Rev. 2014, 73, 63-82.
293. Anissimov Y.G., Jepps O.G., Dancik Y., Roberts M.S. *Mathematical and pharmacokinetic modelling of epidermal and dermal transport processes*. Adv. Drug Deliv. Rev. 2013, 65,169-190.
294. Anissimov Y.G., Roberts M.S. *Diffusion Modelling of Percutaneous Absorption Kinetics: 4. Effects of a Slow Equilibration Process Within Stratum Corneum on Absorption and Desorption Kinetics*. J. Pharm. Sci. 2009, 98, 772–781. doi: 10.1002/jps.21461
295. Todo H., Oshizaka T., Kadhum W., Sugibayashi K. *Mathematical Model to Predict Skin Concentration after Topical Application of Drugs*. Pharm. 2013, 5, 634-651.
296. Franz T.J. *Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data*. J. Investig. Derm. 1975, 64, 190-195.
297. Sesto Cabral M.E., Ramos A.N., Cabrera C.A., Valdez J.C., González S.N. *Equipment and method for in vitro release measurements on topical dosage forms*. Pharm. Dev. Technol. 2015, 20, 619-625.
298. Ng S. F., Rouse J. J., Sanderson F. D., Meidan V., Eccleston G. M. *Validation of a static Franz diffusion cell system for in vitro permeation studies*. Aaps Pharmscitech. 2010, 11(3), 1432-1441.
299. Farmakopea Polska XI, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, 2017.
300. Liebenberg W., Engelbrecht E., Wessels A., Devarakonda B., Yang W., De Villiers M.M. *A comparative study of the release of active ingredients from semisolid cosmeceuticals measured with Franz, enhancer or flow-through cell diffusion apparatus*. JFDA, 2004, 12(1), 19-28.
301. Olejnik, A., Gościańska J., Nowak I. *Active compounds release from semisolid dosage forms*. J. Pharm. Sci. 2012, 101(11), 4032-4045.
302. Siewert M., Dressman J., Brown C. K., Shah V. P., Aiache J. M., Aoyagi N., Crison J. *FIP/AAPS guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms*. AAPS PharmSciTech, 2003, 4(1), 43-52.

303. Kong F., Singh R.P. *Disintegration of solid foods in human stomach*, *J. Food Sci.* 2008, 73(5), 67-80.
304. Hanson R., Heaney J. *A primer on automating the vertical diffusion cell (VDC)*, *Dissolution Technol*, 2013, 20(2), 40-44.
305. Hauck W.W., Shah V.P., Shaw S.W., Ueda C.T. *Reliability and reproducibility of vertical diffusion cells for determining release rates from semisolid dosage forms*, *Pharm. Res.* 2007, 24(11), 2018-2024.
306. Schmid M.H., Korting H.C. *The concept of the acid mantle of the skin: its relevance for the choice of skin cleansers*. *Dermatology*, 1995, 191(4), 276-280.
307. European Medicines Agency. *FDA Draft Guideline on Quality and Equivalence of Topical Products EMA/CHMP/QWP/708282/2018*; European Medicines Agency, Amsterdam, Holandia, 2018.
308. Tsai C.J., Hsu L.R., Fang J.Y., Lin H.H. *Chitosan hydrogel as a base for transdermal delivery of berberine and its evaluation in rat skin*. *Biol. Pharm. Bull.* 1999, 22(4), 397-401.
309. Szałek E. *Bioequivalence study for dermatological drugs – EMA draft guideline*. *Farmacja Współczesna*, 2019, 12, 142-150.
310. Zielińska A., *Synteza i charakterystyka stałych nanocząstek oraz nanostrukturalnych nośników lipidowych przeznaczonych do celów kosmetycznych i farmaceutycznych*, UAM, Poznań, 2018.
311. Sinkó B., Garrigues T.M., Balogh G.T., Nagy Z.K., Tsinman O., Avdeef A., Takács-Novák K. *Skin – PAMPA: A new method for fast prediction of skin penetration*. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2012, 45, 698-707.
312. Kansy, M., Senner F., Gubernator K. *Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes*. *J. Med. Chem.* 1998, 41, 1007-1010.
313. Ottaviani G., Martel S., Carrupt P.A. *Parallel artificial membrane permeability assay: a new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability*. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 3948-3954.
314. Sinkó B., Kökösi J., Avdeef A., Takács-Novák K. *A PAMPA Study of the Permeability-Enhancing Effect of New Ceramide Analogues*. *Chem. Biodivers.* 2009, 6, 1867-1874.
315. Sinkó B., Pálfi M., Béni S., Kökösi J., Takács-Novák K. *Synthesis and Characterization of Long-Chain Tartaric Acid Diamides as Novel Ceramide-Like Compounds*. *Molecules*, 2010, 15, 824-833.
316. https://santhoshkumarchittimalla.blogspot.com/2018/01/absorption-passive-and-active-transport_21.html [dostęp: 24.01.2022].
317. Arct J., Eysymont A. *Innowacyjność w kosmetologii*, Wydawnictwa Wyższej Szkoły Zawodowej Kosmetyki i Pielęgnacji Zdrowia, Warszawa, Polska, 2013.
318. Dragicevic N., Maibach H.I. *Percutaneous Penetration Enhancers Drug Penetration Into/Through the Skin*. Springer, Berlin/Heidelberg, Niemcy, 2017.
319. Lademann J., Jacobi U., Surber C., Weigmann H.J., Fluhr J.W. *The tape stripping procedure – evaluation of some critical parameters*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009, 72(2), 317-323.

320. Hughes A. J., Tawfik S.S., Baruah K.P., O'Toole E.A., O'Shaughnessy R.F.L. *Tape strips in dermatology research*. Br. J. Dermatol. 2021, 185(1), 26-35.
321. Ruela A.L.M., Perissinato A.G. de Lino M.E.S., Mudrik P.S., Pereira G.R. *Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations*. Braz. J. Pharm. Sci. 2016, 52, 527-544.
322. Klang V., Schwarz J.C., Lenobel B., Nadj M., Auböck J., Wolzt M., Valenta C. *In vitro vs. in vivo tape stripping: Validation of the porcine ear model and penetration assessment of novel sucrose stearate emulsions*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2012, 80, 604-614.
323. Arct J., Kozyra K., Mieloch M., Dzierzgowski S. *Metody strippingu w ocenie dostępności dermalnej surowców kosmetycznych*. Innowacyjność w kosmetologii, 2013, 91-103.
324. Escobar-Chavez J.J., Merino-Sanjuán V., López-Cervantes M., Urban-Morlan Z., Piñón-Segundo E., Quintanar-Guerrero D., Ganem-Quintanar A. *The Tape-Stripping Technique as a Method for Drug Quantification in Skin*. J. Pharm. Pharm. Sci. 2008, 11, 104.
325. Navidi W., Hutchinson A., N'Dri-Stempfer B., Bunge A. *Determining bioequivalence of topical dermatological drug products by tape-stripping*. J. Pharmacokinet. Pharmacodyn., 2008, 35, 337-348.
326. Herkenne Ch., Alberti I., Naik A., Kalia Y.N., Mathy F.X., Preat V., Guy, R.H. *In vivo Methods for the Assessment of Topical Drug Bioavailability*. Pharm. Res. 2008, 25, 87-103.
327. Gorantla S., Saha R. N., Singhvi G. *Spectrophotometric method to quantify tofacitinib in lyotropic liquid crystalline nanoparticles and skin layers: Application in ex vivo dermal distribution studies*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2021, 255, 119719, 1-8.
328. Westfall A., Sigurdson G.T., Rodriguez-Saona L.E., Giusti M.M. *Ex Vivo and in vivo assessment of the penetration of topically applied anthocyanins utilizing ATR-FTIR/PLS regression models and HPLC-PDA-MS*. Antioxidants, 2020, 9(6):486, 1-14.
329. Gürbüz A., Güngör S., Erdal M.S. *Formulation and in vitro Characterization of Transethosomes for Dermal Drug Delivery*. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi – Journal of Advanced Research in Health Sciences, 2019, 2(2), 51-59.
330. Kirkby M., Sabri A.B., Scurr D.J., Moss G.P. *Dendrimer-mediated permeation enhancement of chlorhexidine digluconate: Determination of in vitro skin permeability and visualisation of dermal distribution*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2021, 159, 77-87.
331. Demurtas A., Pescina S., Nicoli S., Santi P., de Araujo D. R., Padula C. *Validation of a HPLC-UV method for the quantification of budesonide in skin layers*. J. Chromatogr. B Biomed. Appl. 2021, 1164, 122512, 1-5.
332. OECD. Test Guideline 427: Skin absorption: *In Vivo* Method; OECD: Paryż, France, 2004.
333. OECD. Test Guideline 428: Skin absorption: *In Vitro* Method; OECD: Paryż, France, 2004.

334. Zhang L.W., Monteiro-Riviere N.A. *Use of confocal microscopy for nanoparticle drug delivery through skin*. J. Biomed. Opt. 2012, 18, 061214, 1-5.
335. Förster M., Bolzinger M.A., Montagnac G., Briançon S. *Confocal Raman microspectroscopy of the skin*. Eur. J. Dermatol. 2011, 851-863.
336. Wang P., An Y., Liao Y. *A novel peptide-based fluorescent chemosensor for Cd(II) ions and its applications in bioimaging*. Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 2019, 216, 61-68.
337. König K., Ehlers A., Stracke F., Riemann I. *In vivo Drug Screening in Human Skin Using Femtosecond Laser Multiphoton Tomography*. Skin Pharm. Physiol. 2006, 19, 78-88.
338. Ashtikar M., Matthäus C., Schmitt M., Krafft C., Fahr A., Popp J. *Non-invasive depth profile imaging of the stratum corneum using confocal Raman microscopy: First insights into the method*. Eur. J. Pharm. Sci. 2013, 50, 601-608.
339. Arct J., Eysymont A. *Metody oceny inter- i transepidermalnej dostępności substancji czynnych*, Innowacyjność w kosmetologii, 2013, 5-23.
340. Van Meerloo J., Kaspers G. J. L., Cloos, J. *Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. Cancer Cell Culture*, Methods Mol Biol. 2011, 731, 237-245.
341. Porras-Gómez M., Vega-Baudrit J., Núñez-Corrales S. *Ampicillin-loaded chitosan nanoparticles for in vitro antimicrobial screening on Escherichia coli*; pod red.: Dongre, R.S.: *Chitin-Chitosan-Myriad Functionalities in Science and Technology*. IntechOpen, wyd.1, Londyn, UK, 2018, 245-258.
342. Ghaheh F.S., Khoddami A., Alihosseini F., Jing S., Ribeiro A., Cavaco-Paulo A., Silva C. *Antioxidant cosmetotextiles: Cotton coating with nanoparticles containing vitamin E*. Process Biochem, 2017, 59, 46-51.
343. Kowalska-Krochmal B., Dudek-Wicher R. *The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance*. Pathogens, 2021, 10, 165, 1-21.
344. Abdel-Hafez S.M., Hathout R.M., Sammour O.A. *Tracking the transdermal penetration pathways of optimized curcumin-loaded chitosan nanoparticles via confocal laser scanning microscopy*. Int. J. Biol. Macromol. 2018, 108, 753-764.
345. Lademann J., Richter H., Teichmann A., Otberg N., Blume-Peytavi U., Luengo J., Weiss B., Schaefer U.L., Lehr C.M., Wepf R., Sterry W. *Nanoparticles – An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2007, 66(2), 159-164.
346. Cho Y., Kim J.T., Park H.J. *Size-controlled self-aggregated N-acyl chitosan nanoparticles as a vitamin C carrier*. Carbohydr. Polym. 2012, 88(3), 1087-1092.
347. Karavelioglu Z., Cakir-Koc R. *Preparation of chitosan nanoparticles as Ginkgo Biloba extract carrier: In vitro neuroprotective effect on oxidative stress-induced human neuroblastoma cells (SH-SY5Y)*. Int. J. Biol. Macromol. 2021, 192, 675-683.
348. Saravanakumar K., Mariadoss A.V.A., Sathiyaseelan A., Wang M.H. *Synthesis and characterization of nano-chitosan capped gold nanoparticles with multifunctional bioactive properties*. Int. J. Biol. Macromol. 2020, 165, 747-757.
349. Herdiana Y., Wathoni N., Shamsuddin S., Muchtaridi M. *Drug release study of the chitosan-based nanoparticles*. Heliyon, 2022, 8, e08674.

350. George D., Maheswari P.U., Begum K.M.M.S. *Chitosan-cellulose hydrogel conjugated with L-histidine and zinc oxide nanoparticles for sustained drug delivery: kinetics and in-vitro biological studies*. Carbohydr. Polym. 2020, 236, 116101, 1-11.
351. Katas H., Raja M.A.G., Lam K.L. *Development of Chitosan Nanoparticles as a Stable Drug Delivery System for Protein/siRNA*. Int. J. Biomater. 2013, 2013, 146320, 1-9.
352. Weng J., Tong H.H.Y., Chow S.F. *In vitro release study of the polymeric drug nanoparticles: Development and validation of a novel method*. Pharm. 2020, 12, 732.
353. Dash S., Murthy P.N., Nath L., Chowdhury P. *Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems*. Acta Pol. Pharm. 2010, 67, 3, 217-223.
354. Paarakh M.P., Jose P.A., Setty C., Christopher G.V.P. *Release kinetics – concepts and applications*. IJPRT, 2018, 8, 12-20.
355. Quiñones J.P., Szopko R., Schmidt C., Covas C.P. *Novel drug delivery systems: Chitosan conjugates covalently attached to steroids with potential anticancer and agrochemical activity*. Carbohydr. Polym. 2011, 84, 858-864.
356. Thai H., Nguyen C.T., Thach L.T., Tran M.T., Mai H.D., Nguyen T.T.T., Le G.D., Can M.V., Tran L.D., Bach G.L., Ramadass K., Sathish C.I., Van Q. *Characterization of chitosan/alginate/lovastatin nanoparticles and investigation of their toxic effects in vitro and in vivo*. Sci. Rep. 2020, 10, 1-15.
357. Patel R., Gajra B., Rh P., Patel G. *Ganciclovir loaded chitosan nanoparticles preparation and characterization*. J. Nanomed. Nanotechnol. 2016, 7:6, 1-8.
358. Son G.H., Lee B.J., Cho C.W. *Mechanisms of drug release from advanced drug formulations such as polymeric-based drug-delivery systems and lipid nanoparticles*. J. Pharm. Investig. 2017, 47(4), 287-296.
359. Jonassen H., Kjørniksen A.L., Hiorth M. *Effects of ionic strength on the size and compactness of chitosan nanoparticles*. Colloid. Polym. Sci. 2012, 290(10), 919-929.
360. Kim S.J., Lim M.H., Chun I.K., Won Y.H. *Effects of Flavonoids of Ginkgo biloba on Proliferation of human skin fibroblast*. Skin Pharmacol. 1997, 10, 200-205.
361. Chao C.J., Chu C.C. *Effects of Ginkgo biloba extract on cell proliferation and cytotoxicity in human hepatocellular carcinoma cells*. World J. Gastroenterol. 2004, 10, 37-41.
362. Lee K.H., Kim K.C., Jung Y.J., Ham Y.H., Jang J.J., Kwon H., Sung, Y.C., Kim S.H., Han S.K., Kim C.M. *Induction of apoptosis in p53-deficient human hepatoma cell line by wild-type p53 gene transduction: Inhibition by antioxidant*. Mol. Cells 2001, 12, 17-24.
363. Su Y., Sun C.M., Chuang H.H., Chang P.T. *Studies on the cytotoxic mechanisms of ginkgetin in a human ovarian adenocarcinoma cell line*. Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol. 2000, 362, 82-90.
364. Ding J., Guo Y. *Recent advances in chitosan and its derivatives in cancer treatment*. Front. Pharmacol. 2022, 13, 888740.

365. Qi L., Xu Z., Jiang X., Li Y., Wang M. *Cytotoxic activities of chitosan nanoparticles and copper-loaded nanoparticles*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15, 1397-1399.
366. Qi L.F., Xu Z.R., Li Y., Jiang X., Han X.Y. *In vitro effects of chitosan nanoparticles on proliferation of human gastric carcinoma cell line MGC803 cells*. *World J. Gastroenterol.* 2005, 11, 5136-5141
367. Loh J.W., Saunders M., Lim L.Y. *Cytotoxicity of Monodispersed Chitosan Nanoparticles against the Caco-2 Cells*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012, 262, 273-282.
368. <https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology> [dostęp: 26.08.2023].
369. Ibrahim M.P., Nuhu A.A. *Phytochemical Screening and Antibacterial/Antifungal Activities of Ginkgo biloba Extract EGb 761*. *IOSR-JPBS*, 2016, 11:1, 43-49.
370. Karakaya F., Şahin B., Bülbül A.S., Ceylan Y., Kurt E., Tarakçı M.F. *Investigation of antimicrobial and antibiofilm effects of Ginkgo biloba L.* *Res. J. Biol. Sci.* 2020, 13(2), 28-36.
371. Chandrasekaran M., Kim K.D., Chun S.C. *Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles: A Review*. *Processes* 2020, 8(9), 1173, 1-23.
372. Katas H., Lim C.S., Azlan A.Y.H.N., Buang F., Busra M.F.M. *Antibacterial activity of biosynthesized gold nanoparticles using biomolecules from Lignosus rhinocerotis and chitosan*. *Saudi Pharm. J.* 2018, 27, 283-292.
373. Venkatesham M., Ayodhya D., Madhusudhan A., Babu N.V., Veerabhadram G. *A novel green one-step synthesis of silver nanoparticles using chitosan: Catalytic activity and antimicrobial studies*. *Appl. Nanosci.* 2012, 4, 113-119.
374. Chen F.; Shi, Z.; Neoh, K.G.; Kang, E.T. *Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles*. *Biotechnol. Bioeng.* 2009, 104(1), 30-39.
375. Qi L., Xu Z., Jiang X., Hu C., Zou X. *Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles*. *Carbohydr. Res.* 2004, 339, 2693-2700.
376. Du W.L., Niu S.S., Xu Y.L., Xu Z.R., Fan C.L. *Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions*. *Carbohydr. Polym.*, 2009, 75(3), 385-389.
377. Wu T., Wu C., Fu S., Wang L., Yuan C., Chen S., Hu Y. *Integration of lysozyme into chitosan nanoparticles for improving antibacterial activity*. *Carbohydr. Polym.*, 2017, 155, 192-200.
378. Costa E.M., Silva S., Veiga M., Tavaría F.K., Pintado M.M. *Exploring chitosan nanoparticles as effective inhibitors of antibiotic resistant skin microorganisms – From in vitro to ex vitro testing*. *Carbohydr. Polym.*, 2018, 201, 340-346.
379. Costa E.M., Silva S., Vicente S., Neto C., Castro P.M., Veiga M., Madureira R., Tavaíra F., Pintado M.M. *Chitosan nanoparticles as alternative anti-staphylococci agents: Bactericidal, antibiofilm and antiadhesive effects*. *Mater. Sci. Eng. C.* 2017, 79, 221-226.
380. El Rabey H.A., Almutairi F.M., Alalawy A.I., Al-Duais M.A., Sakran M.I., Zidan N.S. Tayel A.A. *Augmented control of drug-resistant Candida spp. via fluconazole*

- loading into fungal chitosan nanoparticles*. Int. J. Biol. Macromol. 2019, 141, 511-516.
381. Torres-Rêgo M., Gláucia-Silva F., Soares K.S.R., de Souza L.B.F.C., Damasceno, I.Z., dos Santos-Silva E., Lacerda A.F., Chaves G.M., da Silva-Júnior A.A., de Freitas Fernandes-Pedrosa M. *Biodegradable cross-linked chitosan nanoparticles improve anti-Candida and anti-biofilm activity of TistH, a peptide identified in the venom gland of the Tityus stigmurus scorpion*. Mater. Sci. Eng. C. 2019, 13, 109830.
 382. Ibrahim H.M., El-Bisi M.K., Taha G.M., El-Alfy E.A. *Preparation of biocompatible chitosan nanoparticles loaded by tetracycline, gentamycin and ciprofloxacin as novel drug delivery system for improvement the antibacterial properties of cellulose based fabrics*. Int. J. Biol. Macromol. 2020, 161, 1247-1260.
 383. Sotelo-Boyás M.E., Correa-Pacheco Z.N., Bautista-Baños S., Corona-Rangel M.L. *Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens*. LWT, 2017, 77.
 384. Mofazzal Jahromi M.A., Al-Musawi S., Pirestani M., Ramandi M.F., Ahmadi K., Rajayi H., Hassan Z.M., Kamali M., Mirnejad R. *Curcumin-loaded Chitosan Tripolyphosphate Nanoparticles as a safe, natural and effective antibiotic inhibits the infection of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa in vivo*. Iran J Biotech. 2014, 12(3), e1012, 1-8.
 385. Polk A., Amsden B., De Yao K., Peng T., Goosen M.F.A. *Controlled Release of Albumin from Chitosan-Alginate Microcapsules*. J. Pharm. Sci. 1994, 83(2), 178-185.
 386. Md S., Abdullah S., Alhakamy N.A., Shaik R.A., Eldakhakhny B.M., Omar U.M., Eid B.G., Ansari A.R., Alamoudi A.J., Rizg W.Y. *Development and Evaluation of Ginkgo biloba/Sodium Alginate Nanocomplex Gel as a Long-Acting Formulation for Wound Healing*. Gels, 2022, 8, 189, 1-19
 387. Prasertmanakit S., Praphairaksit N., Chiangthong W., Muangsin N. *Ethyl Cellulose Microcapsules for Protecting and Controlled Release of Folic Acid*. AAPS PharmSciTech, 2009,10(4), 1104-1112.
 388. Yadav A.V., Shete A.S., Dabke A.P., Shinde V.R. *Formulation and In-vitro Evaluation of Aceclofenac Microcapsules*. Int. J. Pharmtech Res. 2009, 1, 2, 135-138.
 389. Murtaza G., Ahmad M., Shahnaz G. *Microencapsulation of Diclofenac Sodium by Nonsolvent Addition Technique*. Trop. J. Pharm. Res. 2010, 9(2), 187-195.
 390. Hasan A.S., Socha M., Lamprecht A., Ghazouani F.E., Sapin A., Hoffman M., Maincent P., Ubrich N. *Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release*. Int. J. Pharm., 2007, 344(1-2), 53-61.
 391. Feczko T., Kokol V., Voncina B. *Preparation and characterization of ethylcellulose-based microcapsules for sustaining release of a model fragrance*. Macromol. Res., 2010, 18(7), 636-640.

392. Zhao F., Rao B., Xue W., Wang F., Li C., Lao J., Wang L. *The Development of Eco-Friendly Dye Microcapsules for Wool Fabric Dyeing Application*. J. Polym. Environ. 2019, 27, 1202-1211.
393. She F.Y., Qi D.M., Chen Z.J., Shao J.Z., Yang L. *Preparation of Organic Pigment Microcapsules and its Application in Pigment Printing of Silk Fabric*. Adv. Mater. Res. 2012, 441, 145-149.
394. Shi M., Lu B., Li X., Jin Y., Ge M. *Thermochromic Luminescent Fiber Based on Yellow Thermochromic Microcapsules: Preparation, Properties, and Potential Application Areas*. Cellulose, 2021, 28, 5005-5018.
395. Tözüm M.S., Alay Aksoy S., Alkan C. *Manufacturing Surface Active Shell and Bisphenol A Free Thermochromic Acrylic Microcapsules for Textile Applications*. Int. J. Energy Res. 2021, 45, 7018-7037.
396. Hozić N., Kert M. *Influence of Different Colourants on Properties of Cotton Fabric, Printed with Microcapsules of Photochromic Dye*. Tekstilec, 2019, 62, 208-218.
397. Fan F., Wu Y. *Photochromic Properties of Color-Matching, Double-Shelled Microcapsules Covalently Bonded onto Cotton Fabric and Applications to Outdoor Clothing*. J. Appl. Polym. Sci. 2017, 134, 44698.
398. Sheng M., Zhang L., Jiang S., Yang L., Zaaboul F., Fu S. *Bioinspired Electro-Responsive Multispectral Controllable Dye-Doped Liquid Crystal Yolk-Shell Microcapsules for Advanced Textiles*. ACS Appl. Mater. Interfaces, 2021, 13, 13586-13595.
399. Wang C., Jiang X., Cui P., Sheng M., Gong X., Zhang L., Fu S. *Multicolor and Multistage Response Electrochromic Color-Memory Wearable Smart Textile and Flexible Display*. ACS Appl. Mater. Interfaces 2021, 13, 12313-12321.
400. Li Y., Wang B., Sui X., Xie R., Xu H., Zhang L., Zhong Y., Mao Z. *Durable Flame Retardant and Antibacterial Finishing on Cotton Fabrics with Cyclotriphosphazene/Polydopamine/Silver Nanoparticles Hybrid Coatings*. Appl. Surf. Sci. 2018, 435, 1337-1343.
401. Giraud S., Bourbigot S., Rochery M., Vroman I., Tighzert L., Delobel R., Poutch F. *Flame Retarded Polyurea with Microencapsulated Ammonium Phosphate for Textile Coating*. Polym. Degrad. Stab. 2005, 88, 106-113.
402. Lin M., Yang Y., Xi P., Chen S.L. *Microencapsulation of Water-Soluble Flame Retardant Containing Organophosphorus and its Application on Fabric*. J. Appl. Polym. Sci. 2006, 102, 4915-4920.
403. Golja B., Šumiga B., Boh B., Medved J., Pušić T., Forte Tavcer P. *Application of Flame Retardant Microcapsules to Polyester and Cotton Fabrics*. Mater. Technol. 2014, 48, 105-111.
404. Li J., Zhu X., Wang H., Lin P., Jia L., Li L., Chen Y. *Synthesis and Properties of Multifunctional Microencapsulated Phase Change Material for Intelligent Textiles*. J. Mater. Sci. 2021, 56, 2176-2191.
405. Skurkytė-Papievienė V., Abraitienė A., Sankauskaitė A., Rubežienė V., Dubinskaitė K. *Enhancement of Thermal Properties of Bio-Based Microcapsules Intended for Textile Applications*. Open Chem. 2020, 18, 669-680.

406. Saraç E.G., Öner E., Kahraman M.V. *Microencapsulated Organic Coconut Oil as a Natural Phase Change Material for Thermo-Regulating Cellulosic Fabrics*. Cellulose, 2019, 26, 8939-8950.
407. Benmoussa D., Molnar K., Hannache H., Cherkaoui O. *Development of Thermo-Regulating Fabric Using Microcapsules of Phase Change Material*. Mol. Cryst. Liq. Cryst. 2016, 627, 163-169.
408. Pargai D., Jahan S. *Application of Vitis vinifera Microcapsules on Cotton Fabric: A Potential to Prevent UV-Induced Skin Problems*. J. Nat. Fibers, 2020, 17, 412-426.
409. Hong S.A., Kim I.Y., Kim H.R., Song W.S. *Manufacture of UV Absorbers and UV Protection Fabrics Using Microcapsules*. Fibers Polym. 2011, 12, 491-498.
410. Hassan M.M., Sunderland M. *Antimicrobial and Insect-Resist Wool Fabrics by Coating with Microencapsulated Antimicrobial and Insect-Resist Agents*. Prog. Org. Coat. 2015, 85, 221-229.
411. Kim J.R. *Eucalyptus Oil-Loaded Microcapsules Grafted to Cotton Fabrics for Acaricidal Effect against Dermatophagoides farinae*. J. Microencapsul. 2017, 34, 262-269.
412. Wang S., Zhang W., Chen Y., Zhang S., Wang W. *The Aromatic Properties of Polyurea-Encapsulated Lavender Oil Microcapsule and their Application in Cotton Fabrics*. J. Nanosci. Nanotechnol. 2019, 19, 4147-4153.
413. Silva M., Martins I.M., Barreiro M.F., Dias M.M., Rodrigues A.E. *Functionalized Textiles with PUU/Limonene Microcapsules: Effect of Finishing Methods on Fragrance Release*. J. Text. Inst. 2017, 108, 361-367.
414. Zhao D., Jiao X., Zhang M., Ye K., Shi X., Lu X., Shea K.J. *Preparation of High Encapsulation Efficiency Fragrance Microcapsules and Their Application in Textiles*. RSC Adv. 2016, 6, 80924-80933.
415. Mercadé-Prieto R., Pan X., Fernández-González A., Zhang Z., Bakalis S. *Quantification of Microcapsules Deposited in Cotton Fabrics Before and After Abrasion Using Fluorescence Microscopy*. Ind. Eng. Chem. Res. 2012, 51, 16741-16749.
416. Ghayempour S., Montazer M. *Micro/Nanoencapsulation of Essential Oils and Fragrances: Focus on Perfumed, Antimicrobial, Mosquito-Repellent and Medical Textiles*. J. Microencapsul. 2016, 33, 497-510.
417. Jo Y.K., Heo S.J., Peredo A.P., Mauck R.L., Dodge G.R., Lee D. *Stretch-Responsive Adhesive Microcapsules for Strain-Regulated Antibiotic Release from Fabric Wound Dressings*. Biomater. Sci. 2021, 9, 5136-5143.
418. Volmajer Valh, J., Peršin Z., Vončina B., Vrezner K., Tušek L., Fras Zemljič L. *Microencapsulation of Cannabidiol in Liposomes as Coating for Cellulose for Potential Advanced Sanitary Material*. Coatings, 2021, 11, 3.
419. Wijesirigunawardana P.B., Perera B.G.K. *Development of a Cotton Smart Textile with Medicinal Properties Using Lime Oil Microcapsules*. Acta Chim. Slov. 2018, 65, 150-159.

420. Beşen B.S., Balcı O., Güneşoğlu C., Orhan M., Somuncuoğlu E.İ., Tatlı İ.İ. *Obtaining Medical Textiles Including Microcapsules of the Ozonated Vegetable Oils*. *Fibers Polym.* 2017, 18, 1079-1090.
421. Mendes S., Catarino A., Zille A., Fernandes N., Bezerra F.M. *Vehiculation of Methyl Salicylate from Microcapsules Supported on Textile Matrix*. *Materials*, 2021, 14, 1087.
422. Stan M.S., Chirila L., Popescu A., Radulescu D.M., Radulescu D.E., Dinischiotu A. *Essential oil microcapsules immobilized on textiles and certain induced effects*. *Materials*, 2019, 12, 2029.
423. Cheng S.Y., Yuen M.C.W., Kan C.W., Cheuk K.K.L., Chui C.H., Lam K.H. *Cosmetic Textiles with Biological Benefits: Gelatin Microcapsules Containing Vitamin C*. *Int. J. Mol. Med.* 2009, 24, 411-419.
424. Azizi N., Chevalier Y., Majdoub M. *Isosorbide-Based Microcapsules for Cosmeo-Textiles*. *Ind. Crops Prod.* 2014, 52, 150-157.
425. Kim M., Song M.H. *High Performing Facial Skin Problem Diagnosis with Enhanced Mask R-CNN and Super Resolution GAN*. *Appl. Sci.* 2023, 13(2), 989.
426. Massella D., Ancona A., Garino N., Cauda V., Guan J., Salaun F., Barresi A.A., Ferri A. *Preparation of bio-functional textiles by surface functionalization of cellulose fabrics with caffeine loaded nanoparticles*. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* 2018, 460, 012044.
427. Zimniewska M., Pawlaczyk M., Krucińska I., Frydrych I., Mikołajczak P., Schmidt-Przewoźna K., Komisarczyk A., Herczyńska L., Romanowska B. *The influence of natural functional clothing on some biophysical parameters of the skin*. *Text. Res. J.* 2019, 89(8),1381-1393.

SPIS RYSUNKÓW

Rys. 1 Metody formowania włókien chemicznych [24]	22
Rys. 2 Schemat budowy skóry człowieka (zaadaptowano z [38])	26
Rys. 3 Schemat budowy naskórka ludzkiej skóry (zaadaptowano z [38])	27
Rys. 4 Schemat procesu biernej dyfuzji substancji aktywnej przez skórę [51]	30
Rys. 5 Schemat dróg przenikania substancji aktywnych do skóry (zaadaptowano z [38])	31
Rys. 6 Zależność przenikania związków przez powłokę skórną od ich liofilowości (zaadaptowano z [51])	33
Rys. 7 Proces deacetylacji chityny do chitozanu [70]	36
Rys. 8 Epimery budujące liniowy i anionowy łańcuch kopolimeru (kwasu alginowego) [90]	38
Rys. 9 Struktura różnych nanocząstek lipidowych [110]	44
Rys. 10 Podział nanonośników polimerowych w oparciu o ich strukturę [110]	45
Rys. 11 Budowa miceli polimerowej [143]	46
Rys. 12 Struktura dendrymeru [152]	48
Rys. 13 Dwa główne typy nanocząstek polimerowych: nanosfera (układ zbiornikowy) i nanokapsuła (układ matrycowy) zawierające lek [169]	49
Rys. 14 Schemat otrzymywania ChNP - metoda żelowania jonowego [229]	55
Rys. 15 a) Mikrosfera polimerowa, b) mikrokapsułka polimerowa (zaadaptowano z [256])	60
Rys. 17 Schemat komory dyfuzyjnej Franza (zaadoptowano z [298])	73
Rys. 18 Schemat aparatu łopatkowego z dyskiem nośnym (zaadoptowano z [303])	74
Rys. 19 Schemat urządzenia do oceny transportu przezskórnego metodą PAMPA [313]	76
Rys. 20 Schemat strippingu (zrywania przyklejonej taśmy z wierzchnią warstwą <i>stratum corneum</i>) [286]	77
Rys. 21 Konwersja MTT do formazanu przy udziale enzymów mitochondrialnych	80
Rys. 22 Schemat ideowy otrzymywania ChNP i Ch(GB)NP	84
Rys. 23 Schemat ideowy otrzymywania Al(Ch(GB)NP i Al(GB)	85
Rys. 24 Schemat ideowy otrzymywania Et(Ch(GB)NP i Et(GB)	85
Rys. 25 Schemat ideowy wyznaczania MIC (minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii i drożdży)	90

Rys. 26 Schemat ideowy badania przenikania nanocząstek oraz ekstraktu z <i>Ginkgo biloba</i> z przygotowanych tekstyliów funkcjonalnych z zastosowaniem specjalnych pojemników z solą fizjologiczną: a) widok horyzontalny, b) widok z góry	92
Rys. 27 Obrazy SEM Ch(GB)NP, A – przy powiększeniu 12000x i B – przy powiększeniu 120000x	93
Rys. 28 Zależność intensywności od wielkości nanocząstek w badanej próbce Ch(GB)NP, (a) – bez wstępnej sonikacji, (b) – po 10-minutowej wstępnej sonikacji	94
Rys. 29 Widmo UV-VIS z wyznaczonym charakterystycznym pikiem dla rutyny	95
Rys. 30 Krzywa wzorcowa dla ekstraktu z liści zielonych <i>Ginkgo biloba</i>	95
Rys. 31 Szybkość uwalniania ekstraktu <i>Ginkgo biloba</i> z Ch(GB)NP w wodzie – pH 7,0 (A) oraz w soli fizjologicznej – pH 5,8 (B)	96
Rys. 32 Zdjęcia SEM Al(Ch(GB)NP przy powiększeniu 1500x (A) i 20000x (B)	97
Rys. 33 Szybkość uwalniania ekstraktu <i>Ginkgo biloba</i> z Al(GB) w wodzie (A) i soli fizjologicznej (B)	98
Rys. 34 Szybkość uwalniania ekstraktu <i>Ginkgo biloba</i> z Al(Ch(GB)NP) w wodzie (A) i soli fizjologicznej (B)	98
Rys. 35 Zdjęcia SEM Et(GB) przy powiększeniu 1000x (A), 2000x (B) i 4000x (C)	99
Rys. 36 Zdjęcia SEM Et(Ch(GB)NP) przy powiększeniu 1000x (A) i 4000x (B)	100
Rys. 37 Szybkość uwalniania ekstraktu <i>Ginkgo biloba</i> z Et(GB) w wodzie (A) i soli fizjologicznej (B)	100
Rys. 38 Szybkość uwalniania ekstraktu <i>Ginkgo biloba</i> z Et(Ch(GB)NP) w wodzie (A) i soli fizjologicznej (B)	101
Rys. 39 Widma FTIR-ATR dla czystego proszku chitozanu (A), GBE (B) i Ch(GB)NP (C)	103
Rys. 40 Wpływ GBE, ChNP i Ch(GB)NP na żywotność komórek HGF-1 (A), PEA1 (B), i HeLa (C) (określoną w teście MTT po 24h); wartości przedstawiają średnie ± odchylenie standardowe jako procent (%) kontroli.....	105
Rys. 41 Minimalne stężenie GBE, ChNP i Ch(GB)NP hamujące wzrost drobnoustrojów (<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus enteritidis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	106
Rys. 42 Obrazy z mikroskopu optycznego przedstawiające powierzchnię funkcjonalnej dzianiny bawełnianej z immobilizowanymi mikrokapsułami etylocelulozowymi z GBE,	

pow. 400x (A) i powierzchnię funkcjonalnej dzianiny bawełnianej z immobilizowanymi mikrokapsułami etylocelulozowymi z Ch(GB)NP, pow. 600x (B)	107
Rys. 43 Rozkład wielkości Ch(GB)NP w przeliczeniu na objętość badanego medium soli fizjologicznej, w której był umieszczony szczelnie zamknięty rękaw dializacyjny w określonej ilości zliofilizowanych nanocząstek	108
Rys. 44 Rozkład wielkości Ch(GB)NP w przeliczeniu na objętość badanego medium soli fizjologicznej, w której był umieszczony szczelnie zamknięty rękaw dializacyjny w określonej ilości mikrokapsuł z zamkniętymi Ch(GB)NP.	108
Rys. 45 Rozkład wielkości nanocząstek i mikrokapsułek w przeliczeniu na objętość badanego medium soli fizjologicznej, w której był umieszczony szczelnie zamknięty rękaw dializacyjny z próbką funkcjonalnej dzianiny bawełnianej z immobilizowanymi mikrokapsułami etylocelulozowymi z Ch(GB)NP	109
Rys. 46 Rozkład wielkości nanocząstek i mikrokapsułek w przeliczeniu na objętość badanego medium soli fizjologicznej, nad którą była umieszczona folia dializacyjna z próbką funkcjonalnej dzianiny bawełnianej z immobilizowanymi mikrokapsułami etylocelulozowymi z Ch(GB)NP	110
Rys. 47 Widmo FTIR-ATR dla Ch(GB)NP z wykonaną dekonwolucją dla pików przy liczbie falowej 1024 i 1064 cm ⁻¹	112

SPIS TABEL

Tabela 1 Naturalne i syntetyczne bazy włókniste do wytworzenia biotekstyliów [27,29]	23
Tabela 2 Skład chemiczny ekstraktu z suszu liści <i>Ginkgo biloba</i> – EGb 761 [105]	42
Tabela 3 Grupy nanocząstek lipidowych – charakterystyka, zalety i wady.....	43
Tabela 4 Klasyfikacja oraz przykłady membran wykorzystywanych w IVRT [301, 308]	75
Tabela 5 Wielkość cząstek i wskaźnik polidispersyjności Ch(GB)NP (niepoddanych i poddanych sonikacji przez 5 i 10 minut)	93
Tabela 6 Modele matematyczne i wartości współczynników regresji (R^2) uwalniania ekstraktu z miłorzębu japońskiego z Ch(GB)NP do obu mediów badawczych (woda i sól fizjologiczna)	113