

LIPOSOMY JAKO NOŚNIKI SUBSTANCJI AKTYWNYCH PRZENOSZONYCH W GŁĄB SKÓRY

URSZULA GOIK^{1*}, IZABELA ZAŁĘSKA-ŻYŁKA², AGATA PIETRZYCKA³

¹ WYDZIAŁ TECHNOLOGII ŻYWNOŚCI,
UNIwersytet Rolniczy w Krakowie,
UL. BALICKA 122, 31-149 KRAKÓW

² MAŁOPOLSKA WYŻSZA SZKOŁA IM. JÓZEFA DIETLA W KRAKOWIE,
WYDZIAŁ NAUK O ZDROWIU,
UL. RYNEK GŁÓWNY 34, 31-010 KRAKÓW

³ ZAKŁAD CYTOBIOLOGII, KATEDRA FARMAKOBIOLOGII,
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY COLLEGIUM MEDICUM,
UNIwersytet Jagielloński,
UL. MEDYCZNA 9, 30-688 KRAKÓW

*E-MAIL: U.GOIK@UR.KRAKOW.PL

Streszczenie

Od bardzo dawna skóra jest miejscem aplikacji kosmetyków i leków dermatologicznych. Obecnie można zauważyć coraz większe zainteresowanie preparatami aplikowanymi na skórę w celu leczenia, czy uzyskania dobrego efektu kosmetycznego. Działanie leków podawanych na powierzchnię skóry nie ogranicza się tylko do jej obszarów, ale dzięki wchłanianiu substancji leczniczych przez nią lek może dotrzeć do głębiej położonych tkanek lub do krwiobiegu. Podobnie preparaty kosmetyczne mogą działać w obrębie warstw naskórka jak również skóry właściwej oraz przedostawać się do krwiobiegu. Liposomy są to pęcherzyki, które otoczone są podwójną warstwą lipidową. Powstają one samoistnie z fosfolipidów w środowisku wodnym i są wypełnione niewielką ilością roztworu wodnego, z którego powstają. Posiadają wiele pozytywnych właściwości na przykład: mogą przenosić zarówno wodę jak i rozpuszczalne w lipidach leki, mogą zawierać mikro i makro molekuly, zapewniają długotrwałe uwalnianie i ukierunkowane dostarczanie leku oraz docelowe dostarczenie leku w środowisku nieprzyjawnym, stabilizują biodegradowalne leki i związki aktywne zapewniając ochronę przed utlenianiem, poprawiają stabilizację protein i mogą być aplikowane do organizmu poprzez wiele dróg dostarczania. Liposomy znalazły swoje zastosowanie w wielu dziedzinach, takich jak biotechnologia, mikrobiologia oraz w przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym i spożywczym. Ponadto osiągnięcia nanomedycyny są przełomowe w przenoszeniu leków, a wszechstronność liposomów spowodowała wzrost ich użycia w wielu dziedzinach medycyny, takich jak diagnoza i terapia.

Słowa kluczowe: liposomy, stratum corneum, dyfuzja przezskórna

[Inżynieria Biomateriałów 130 (2015) 27-39]

LIPOSOMES AS CARRIERS FOR THE DELIVERY OF ACTIVE SUBSTANCES TO THE SKIN

27

URSZULA GOIK^{1*}, IZABELA ZAŁĘSKA-ŻYŁKA², AGATA PIETRZYCKA³

¹ FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY,
UNIVERSITY OF AGRICULTURE IN KRAKOW
UL. BALICKA 122, 31-149 KRAKOW, POLAND

² FACULTY OF HEALTH SCIENCES,
JOZEF DIETL MALOPOLSKA HIGHER SCHOOL IN KRAKOW, POLAND
UL. RYNEK GŁÓWNY 34, 31-010 KRAKÓW, POLAND

³ CYTOBIOLOGY DEPARTMENT OF PHARMACOBIOLOGY CHAIR,
MEDICAL COLLEGE OF JAGIELLONIAN UNIVERSITY,
UL. MEDYCZNA 9, 30-688 KRAKOW, POLAND

*E-MAIL: U.GOIK@UR.KRAKOW.PL

Abstract

Since ancient times cosmetics and dermatological medicines have been applied to the skin. Presently growing interest in topical administration in order to achieve therapeutic or good cosmetic effects can be noticed. Effectiveness of medicines topically applied is not limited only to the skin, but due to the absorption of medical substances, the drug can reach subdermal tissues or circulatory system. Similarly, active substances in cosmetic can act both within epidermis and dermis layers, and can enter the bloodstream. Liposomes are vesicles which are surrounded by a lipid bilayer. They are created spontaneously from phospholipids in aqueous environment and they are filled with a small amount of aqueous solution of hydrophilic active substances. Incorporation of micro and macro molecules in liposomes provides stabilization, constant release during the time unit and targeted drug delivery in hostile environment. Biodegradable drugs protected from oxidation improve protein stabilization and can be administered through various routes. Liposomes are used in numerous applications, including cosmetics and biotechnology, microbiology, and also pharmaceutical and food industry. Moreover, nanomedicine developments are crucial for carrying drugs, and liposomes versatility leads to increase in their application in medical fields, like diagnosis and therapy.

Keywords: liposome, stratum corneum, transdermal diffusion

[Engineering of Biomaterials 130 (2015) 27-39]

Introduction

Skin as an application area of cosmetic and therapy preparations

The skin, essentially its outermost layer (*stratum corneum*), protects underlying tissue from dehydration, mechanical and chemical stress, viral, bacterial and fungal infections, and UV radiation. The skin is the largest organ of the human body, with the area of up to 2 m², weight of up to 20 kg, and thickness varying from 1 mm to 4 mm, depending on the age and place. It is composed of three layers (subcutaneous tissue, dermis and epidermis) and appendages of skin (hair follicles, sweat and sebaceous glands).

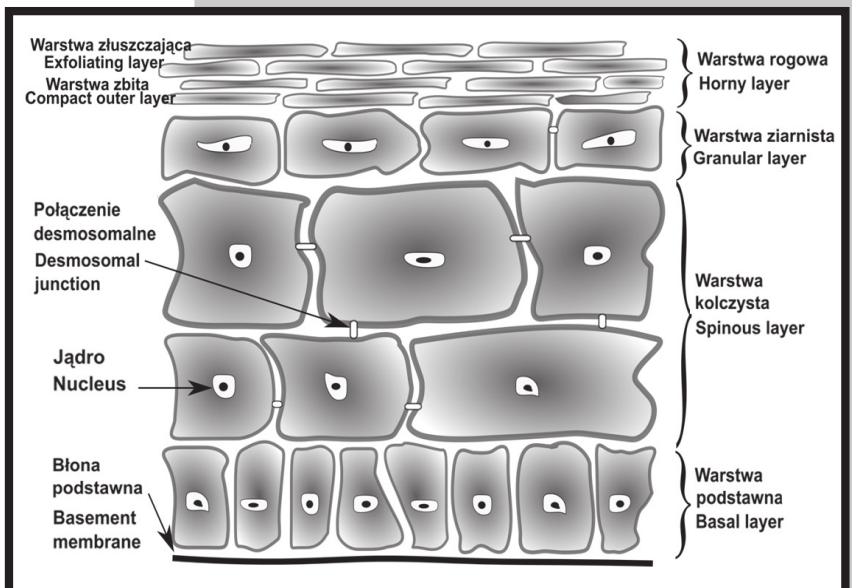
Skóra jako miejsce aplikacyjne preparatów kosmetycznych i leczniczych

Skóra, a przede wszystkim zewnętrzna warstwa zrogowaciała (*stratum corneum*) chroni przed nadmierną utratą wody z organizmu, urazami mechanicznymi, zakażeniem wirusami, bakteriami i grzybami, nadmiernym działaniem UV oraz zapobiega wnikaniu związków chemicznych ze środowiska. Skóra jest największym narządem ludzkiego ciała, którego powierzchnia dochodzi do 2 m², a masa do 20 kg. Grubość, w zależności od wieku i miejsca występowania, wynosi od 1-4 mm. Zbudowana jest z trzech warstw (tkanki podskórnej, skóry właściwej i naskórka) oraz przydatków skórnych (mieszków włosowych, gruczołów potowych i łojowych). Pełni wiele ważnych funkcji, łącząc ciało człowieka ze środowiskiem zewnętrznym, a jednocześnie izolując je od niego. Wnikanie wody, czy niskocząsteczkowych substancji hydrofilowych przez skórę jest powolne i utrudnione lecz możliwe. Wzrost ciężaru cząsteczkowego substancji polarnych uniemożliwia ich przenikanie. Znacznie mniej odporna natomiast jest skóra na działanie związków lipofilnych, które dobrze wnikają i dyfundują do skóry właściwej. W skórze właściwej możemy wyróżnić dwie warstwy brodawkową (*stratum papillare*) i siateczkową (*stratum reticulare*). Głównymi elementami wchodzącymi w skład skóry właściwej są fibroblasty (komórki tkanki łącznej, które wytwarzają białka fibrylarne - kolagen i elastynę), makrofagi, komórki tłuszczowe, limfocyty oraz liczne naczynia krwionośne i zakończenia nerwowe. Białka fibrylarne oraz komórki skóry właściwej są osadzone w bardzo uwodnionej macierzy zewnątrzkomórkowej, w skład której wchodzi glikozaminoglikany (GAG). Glikozaminoglikany, do których zaliczane są między innymi siarczan chondroityny i kwas hialuronowy (HA) należą do polianionów. Makrocząsteczki te posiadają właściwości hydrofilne i mają zdolność tworzenia wiązań wodorowych z hydroksylizyną i hydroksyproliną supheliksi kolagenu. Głównie HA odgrywa kluczową rolę w stabilizowaniu kolagenu i jest czynnikiem utrzymującym wodę w skórze właściwej. Na stopień hydratacji wpływa wysoki ładunek ujemny cząsteczki GAG. Kwas hialuronowy ma zdolność wiązania wody w ilości stukrotnie przekraczającej jego ciężar, a uwodniona cząsteczka HA jest około 75 000 razy większa od cząsteczki kolagenu o tej samej masie cząsteczkowej. Tak wysoka zdolność hydratacji w skórze właściwej jest niezbędna dla transportu substancji czynnych (witaminy C, A, D), składu chemicznego substancji podstawowej i ma odzwierciedlenie w procesach fizjologicznych w otaczających komórkach. Wysoka zdolność wiązania wody utrzymuje prawidłową elastyczność i sprężystość skóry [1-4].

Naskórek jest wielowarstwowym nabłonkiem odnawiającym się w sposób ciągły, a jego wierzchnie warstwy ulegają keratynizacji (RYS. 1). Grubość jego wynosi od 0,3-1,5 mm w zależności od występowania na ciele. Naskórek nie ma naczyń krwionośnych oraz zakończeń nerwowych, ale jego głębsze warstwy są zanurzone w płynie zewnątrzkomórkowym skóry właściwej, skąd dyfundują do niego tlen i składniki odżywcze. Naskórek obejmuje obszar martwy, całkowicie skeratynizowany, do którego należy warstwa rogowa (*stratum corneum*) oraz żywy gdzie znajduje się warstwa ziarnista (*stratum granulosum*), warstwa kolczysta (*stratum spinosum*) oraz warstwa podstawna (*stratum basale*) [1-6].

Skin performs numerous, important functions, connecting the body with the outer environment and isolating it from the one at the same time. Penetration of water or low-density hydrophilic substances through skin is slow and hindered, but possible. The increase of polar substances' molecular weight makes it impossible for them to penetrate the skin. However, skin is definitely less resistant to lipophilic compounds which penetrate and diffuse dermis well. Dermis is formed by two layers: papillary layer (*stratum papillare*) and reticular layer (*stratum reticulare*). The main cells found in dermis are fibroblasts (cells of connective tissue which produce fibrous proteins – collagen and elastin), macrophages, mast cells, lymphocytes; in skin numerous blood vessels and nerve endings are present as well. Fibrous proteins and cells of dermis are fixed in an aqueous gel matrix made of glycosaminoglycans (GAG). The glycosaminoglycans, i.e., hyaluronic acid (HA) and chondroitin sulphate, are polyanions. These macromolecules have hydrophilic properties and are capable of forming hydrogen bonds with hydroxylysine and hydroxyproline collagen suphelix. Mainly HA plays a key role in stabilizing the collagen and maintain stable concentration of water in the dermis.

The high negative charge of GAG molecules effects on the degree of skin hydration. Hyaluronic acid has the capacity to bind water in an amount greater than one hundred times its molecular weight. The hydrated HA molecule is about 75 000 times greater than the collagen molecules with the same molecular weight. Such a high hydration capacity in the dermis is essential for the transport of active substances (vitamins C, A, D), the chemical composition of the basic and it reflects in the physiological processes in the surrounding cells. The high water binding capacity maintains proper flexibility and elasticity of the skin [1-4]. The epidermis is a multilayer epithelium regenerating itself in a continuous way, and its outermost layers undergoing a process of keratinisation (FIG. 1). Its thickness is 0.3-1.5 mm, depending on the region of skin being considered. There are no blood vessels or ends nerve fibres in the epidermis, but its deeper layers are bathed in interstitial fluid of the dermis which delivers oxygen and nutrients. The epidermis consists of dead, completely keratinised area (*stratum corneum*) and living area, where granular layer (*stratum granulosum*), spinous layer (*stratum spinosum*) and basal layer (*stratum basale*) are found [1-6].



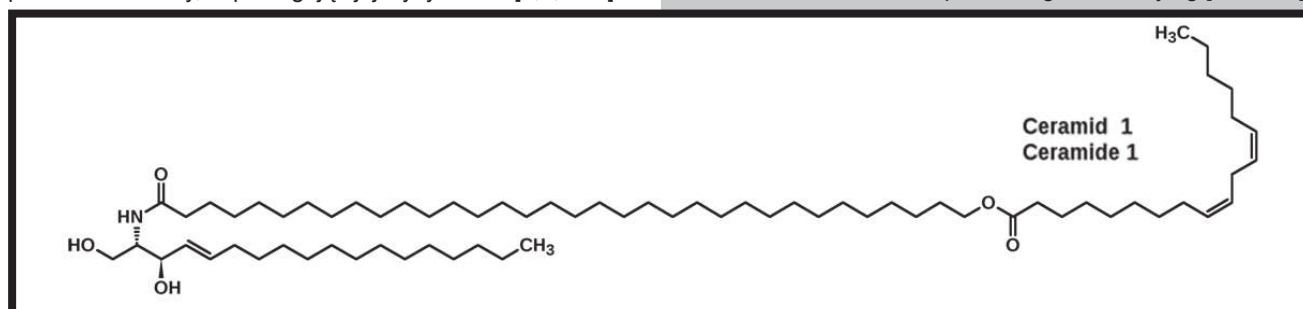
RYS. 1. Komórki naskórka człowieka.
FIG. 1. Cells in human epidermis.

Warstwa rogowa jako podstawowa bariera

Warstwa rogowa naskórka stanowi podstawową barierę, która wnosi ograniczenia w sterowaniu wewnątrz i na zewnątrz ruchem substancji chemicznych. Składa się z 15-20 warstw ostro spłaszczonych, metabolicznie nieaktywnych, wielokątnych komórek o grubości około 10 μm oraz zawartości suchej masy o gęstości 1,3-1,4 g/cm^3 [5]. Wyróżniamy w jej obrębie obszar warstwy zbitej (*stratum compactum*) i warstwy złuszczonej (*stratum disjunctum*). Warstwa rogowa zbudowana jest z korneocytów (posiadających rdzeń i białkowo-lipidową otoczkę zwaną kopertą korneocyty) i lipidowego cementu międzykomórkowego o budowie ciekłokrystalicznej. Cement międzykomórkowy składa się z ułożonych naprzemiennie warstw lipidów (głównie ceramidów, steroli, wolnych kwasów tłuszczowych i węglowodorów) oraz warstewek wody. Lipidy cementu międzykomórkowego powstają w procesach rozwoju i keratynizacji komórek naskórka. W prawidłowo zbudowanej warstwie rogowej występują one w określonych ilościach niezbędnych dla utrzymania ciekłokrystalicznej struktury cementu. Za prawidłową budowę cementu odpowiada ceramid 1 (RYS. 2) zawierający kwas linolowy. Jego obecność warunkuje spójność całej struktury. Cement międzykomórkowy jest znaczącą barierą dla wody, zmniejsza jej dyfuzję z żywych warstw naskórka do powierzchni skóry, zapobiegając jej wysychaniu [1,2,8-10].

Stratum corneum as a basic barrier

The stratum corneum of the epidermis constitutes a basic barrier which limits the exchange of chemical substances between the cytosol and the external cell environment. Stratum corneum consists of 15 to 20 layers of flattened, polygonal and metabolically inactive cells, about 10 μm thick, with a content of dry matter of density of 1.3 -1.4 g/cm^3 [5]. Stratum corneum comprises a compact outer layer (*stratum compactum*) and an exfoliating layer (*stratum disjunctum*). The layer is composed of corneocytes (with a core and protein-lipid aureole, called a corneocyte envelope) and a lipid intercellular cement with a liquid crystal structure. The intercellular cement is composed of layers of lipids, organised alternatively (mainly ceramides, sterols, free fatty acids and hydrocarbons) and thin layers of water. Lipids of intercellular cement are created as a result of the epidermis development and keratinisation processes. In a properly structured stratum corneum lipids are present in defined amounts and are indispensable for maintaining liquid crystal structure of the cement. Ceramide 1 (FIG. 2), containing linoleic acid, remains responsible for the adjust structure of the cement. Its presence conditions cohesion of the whole structure. The intercellular cement is a significant barrier for water; it diminishes its diffusion from the living epidermis layers to the surface of the skin, preventing it from drying [1,2,8-10].



RYS. 2. Molekularna struktura ceramidu 1.
FIG. 2. Molecular structure of ceramide 1.

Korneocyty w *stratum compactum* są połączone korneodesmosomami, które po przejściu do *stratum disjunctum* ulegają degradacji, co daje początek eksfoliacji. Rdzeń korneocytów zbudowany jest z keratyny, filagryny, wody oraz higroskopijnych substancji niskocząsteczkowych wchodzących w skład naturalnego czynnika nawilżającego (Natural Moisturizing Factor, NMF). Korneocyty są utrzymywane razem poprzez wyspecjalizowane struktury zwane korneodesmosomami, które zbudowane są z glikoprotein z rodziny kadheryny głównie z desmoglein i desmoglein [6].

Corneocytes in *stratum compactum* are connected by corneodesmosomes which after reaching *stratum disjunctum* undergo degradation, which starts exfoliation. The corneocytes' core is made of keratin, filaggrin, water and hygroscopic low density substances, being a part of natural moisturizing factor (NMF). Corneocytes are kept together through highly specialised structures called corneodesmosomes which are made of glycoprotein of the cadherin family, mainly of desmoglein and desmoglein [6].

Mechanizm wchłaniania substancji leczniczych przez skórę

Po aplikacji na powierzchnię skóry substancja aktywna zawarta w kosmetykach lub lekach dyfunduje do zrogowiałego naskórka z rezerwuaru (proces uwalniania). Dalej substancja czynna przenika do głębszych warstw naskórka (proces penetracji) i skóry właściwej, a następnie jest wchłaniana (proces absorpcji) do naczyń krwionośnych, skąd ulega dystrybucji do tkanek. Szybkość, z jaką substancja lecznicza dyfunduje do miejsca przeznaczenia w dużej mierze zależy od warstwy rogowej, która stawia największą barierę podczas wchłaniania przez skórę. Zdolność przenikania substancji aktywnej przez warstwę zrogowiałą zależy od jej grubości, a ta z kolei od miejsca występowania na ciele. Ogólnie, cieńsza i bardziej przepuszczalna warstwa rogowa występuje od wewnętrznej strony ciała, a grubsza i trudniej przepuszczalna zewnętrznie. Pierwsze preparaty transdermalne były stosowane za uchem.

Mechanism of penetration of medicinal substances through the skin

After skin application, the active substance included in cosmetics and medicines diffuses to the cornified epidermis (release process). Afterwards, it penetrates to deeper layers of epidermis (permeation process) and dermis, and finally it is absorbed by blood vessels. The speed at which the medicinal substance diffuses to the area of destination to a great degree depends on the stratum corneum which offers greatest diffusivity resistance during transdermal permeation. Power of penetration from the cornified epidermis is varied depending on the area of the body. Generally, the inner parts of the body are permeable to a greater extent than the outer ones. The first transdermal preparations were applied in the areas behind the ear.

Wchłanianie zależy również od rodzaju substancji aktywnej/ leczniczej oraz substancji pomocniczych. Substancje aktywne zawarte w kosmetykach i lekach mogą wnikać przez naskórek poprzez przydatki skórne, (gruczoły potowe, łojowe oraz mieszki włosowe) oraz warstwę rogową naskórka, a ich transport do głębszych warstw może odbywać się drogą intercelularną (pomiędzy komórkami naskórka, przez lipidy cementu międzykomórkowego) oraz drogą transcelularną (poprzez komórki naskórka – korneocyty) (RYS. 3).

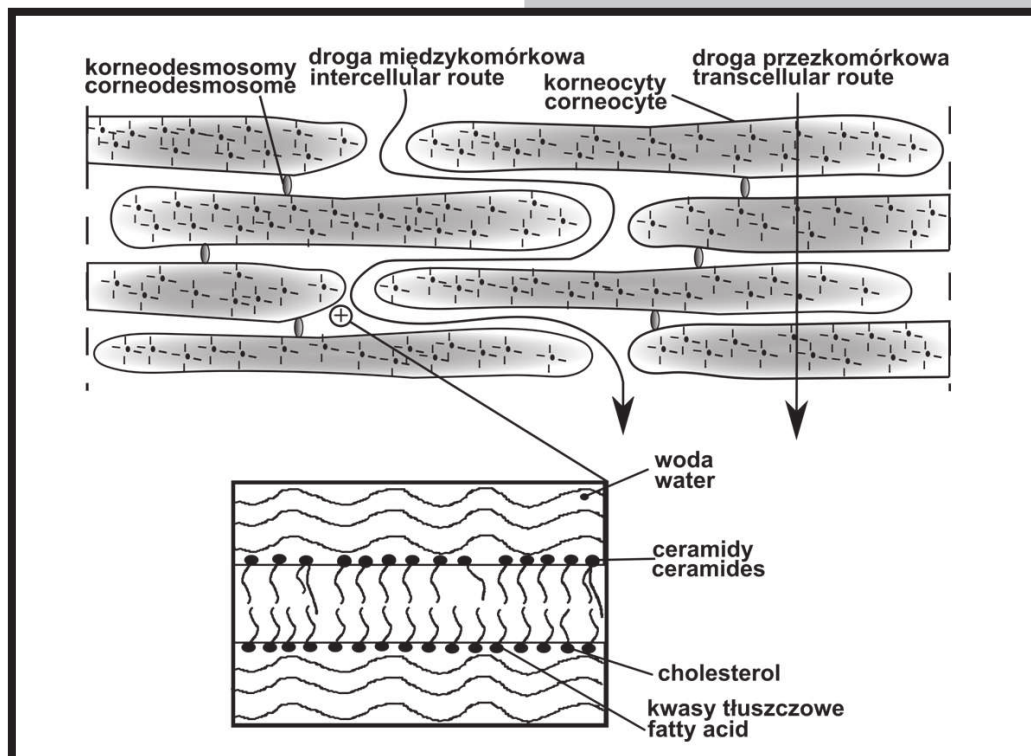
Najczęściej wchłanianie substancji aktywnej z kosmetyku, czy leku odbywa się na drodze dyfuzji biernej i poprzez transport aktywny. Dyfuzja bierna prowadzi głównie przez cement międzykomórkowy, który składa się w przewadze z obszarów lipofilnych. Proces zachodzi zgodnie z gradientem stężeń i nie wymaga nakładu energii. Przejście cząsteczek zależy jedynie od sił fizycznych (dyfuzji, osmozy i ich energii kinetycznej). W procesie dyfuzji biernej barierę naskórkową mogą pokonywać jedynie substancje o masie cząsteczkowej nie większej niż 3 kDa, apolarne i o charakterze lipofilnym [1]. Transport cząsteczek poprzez dyfuzję czynną (transport aktywny), wymaga dostarczenia energii. W transporcie tym wykorzystywane są nośniki, które mają powinowactwo do przenoszonej substancji aktywnej. Energia potrzebna do aktywacji nośnika jest wytwarzana w procesach utleniania lub rozpadu ATP. Substancja aktywna docierając do odpowiedniego miejsca musi przejść kilka etapów po aplikacji preparatu na skórę [11,12]:

- partycja związku pomiędzy podłoże o różnej lipofilności oraz warstwę rogową naskórka,
- dyfuzja związku przez warstwę rogową naskórka,
- partycja związku pomiędzy lipofilną warstwę rogową naskórka, a hydrofilną głębsze warstwy naskórka,
- dyfuzja związku przez kolejne warstwy naskórka oraz skóry właściwej,
- wchłanianie związku do krwi przez ściany naczyń włosowatych.

The penetration is also dependant on the kind of medicinal substance and additives. Active substances included in cosmetics and medicines can penetrate through appendages of skin (hair follicles, sweat and sebaceous glands) and stratum corneum of epidermis. Transport of active substances can occur through an intercellular route (between cells of epidermis, through lipids of intercellular cement) or through transcellular route (through cells of epidermis – corneocytes) (FIG. 3).

Most penetration of an active substance from a cosmetic or medicine takes place by passive diffusion or active transport. Passive diffusion takes place mainly in intercellular cement which to a great extent consists of lipophilic areas. The process does not require delivering energy, it occurs by way of equalising concentration. Particles penetrate according to the concentration gradient, which is dependant exclusively on physical phenomena (diffusion, osmosis and their kinetic energy). In passive diffusion process only substances of molecular weight lower than 3 kDa can overcome the epidermis barrier [1]. Transport of molecules in active diffusion (active transport) requires energy. Carriers which are capable of carrying an active substance are employed here. The energy needed to activate the carrier is created in oxidative phosphorylation in mitochondria or ATP disintegration. After topical administration, on its way to destination, the active substance has to go through a number of stages [11,12]:

- partition of the compound between *vehiculum* of varied lipophilicity and stratum corneum of epidermis,
- diffusion of the compound through stratum corneum of epidermis,
- partition of the compound between lipophilic stratum corneum of epidermis and hydrophilic deeper layers of epidermis,
- diffusion of the compound through subsequent layers of epidermis and dermis,
- penetration of the compound to the bloodstream through walls of capillaries.



RYS. 3. Drogi przenikania przez stratum corneum.

FIG. 3. Penetration pathways into and through the stratum corneum.

Liposomy jako naturalne nośniki substancji kosmetycznych i leczniczych

Duża część fosfolipidów, w środowisku wodnym tworzy spontaniczne, podwójne warstwy fosfolipidowe. Do takich struktur należą liposomy (pęcherzyki fosfolipidowe, pęcherzyki Banghama), będące zamkniętymi kulistymi strukturami błonowymi. Liposomami określa się pęcherzykowate struktury o wielkości od 0,01-1 μm , które otoczone są dwu-warstwą lipidową. Powstają one samoistnie z fosfolipidów w środowisku wodnym i są wypełnione niewielką ilością roztworu wodnego, z którego powstają. Standardowe liposomy zbudowane są z obojętnych i anionowych lipidów, większość zawiera lecytynę (fosfatydylocholinę), fosfatydyloetanolaminę (PE), sfingomielinę, fosfatydyloserynę, fosfatydyloglicerol (PG) i fosfatydyloinozytol (PI) [14]. Dzięki takiej budowie pęcherzyki mogą zawierać leki o różnej lipofilności, działające miejscowo i systemowo. W warunkach *in vivo* małe liposomy (<100 nm) trudniej opsonizują niż większe. Klinicznie przydatne okazały się liposomy o rozmiarach 50-200 nm. Wykazano, iż tracą one mniej leku i nie ulegają fagocytozie. Duże liposomy mają z kolei tendencję do przedłużonego uwalniania substancji rozpuszczalnych w wodzie [15,16].

Lecytyna

Lecytyna (fosfolipid) to główny surowiec, z którego wytwarzane są liposomy. Należy do ważnych przedstawicieli naturalnych związków powierzchniowo czynnych, zaliczana jest do emulgatorów emulsji typu woda w oleju W/O. Bogatym źródłem lecytyny są żółtka jaj, nasiona soi, rzepak, słonecznik. Otrzymuje się ją przez oczyszczenie „szlamu lecytynowego” w procesie utwardzania olejów. Surowiec ten posiada wiele ważnych właściwości m.in. natłuszcza, uelastycznia skórę, zmiękcza naskórek i ułatwia przenikanie składników aktywnych zawartych w emulsjach kosmetycznych, znany jest z działania antyalergicznego. Lecytyna w organizmie człowieka jest obecna w każdej komórce ciała, przede wszystkim jako składnik błon komórkowych. Fosfolipid ten opóźnia procesy starzenia, wspomaga wykorzystanie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, podnosi sprawność krążenia krwi [17, 18].

Lecytyna jest brązową substancją o lepkiej konsystencji. Stanowi mieszaninę polarnych i niepolarnych lipidów, przy czym niepolarne stanowią ponad 60% masy mieszaniny. Przed wykorzystaniem lecytyny do celów kosmetycznych poddaje się ją rafinacji. Spośród najbardziej znanych fosfolipidów można wymienić kilka połączeń różniących się ugrupowaniem związanym z resztą kwasu fosforowego (RYS. 4).

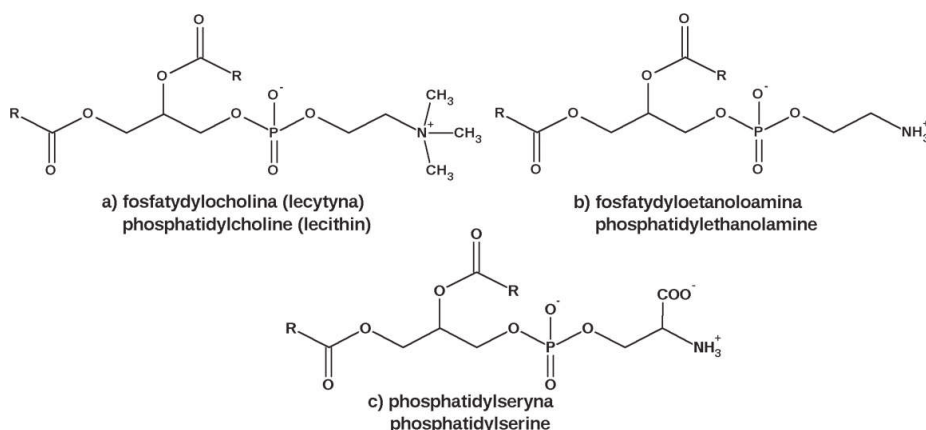
Liposomes as natural carriers of cosmetic and medicinal substances

In aqueous environment a large part of phospholipids create spontaneous, double phospholipid layers. Liposomes (phospholipid vesicles, Bangham's vesicles), being spherical membrane structures belong to phospholipids. Vesicle structures of 0.01-1 μm , surrounded by a lipid double-layer are referred to as liposomes. They are created spontaneously from phospholipids in aqueous environment and they are filled with a small amount of aqueous solution that they are formed from. Standard liposomes consist of inert and anion lipids, most of them include lecithin (phosphatidylcholine), phosphatidylethanolamine (PE), sphingomyelin, phosphatidylserine, phosphatidylglycerol (PG) and phosphatidylinositol (PI) [14]. Due to such a structure the vesicles can absorb medicines of various lipophilicity, acting locally and systemically. In *in vivo* conditions small liposomes (<100 nm) do not opsonise as easily as the larger ones do. Liposomes of 50-200 nm turned out to be more clinically useful. It was demonstrated that they lose smaller amounts of medicine and do not undergo phagocytosis. On the other hand, large liposomes tend to release water-soluble substances in an extended period [15,16].

Lecithin

Lecithin (phospholipid) is the main raw material from which liposomes are made. Lecithin belongs to important representatives of natural surfactants and it is classified as water-in-oil (W/O) emulsifiers. Egg yolks, soybeans, rapeseed and sunflower are rich sources of lecithin. It is extracted through "lecithin sludge" purification in the process of oils hardening. The raw material has numerous important properties: it makes the skin more elastic, softens epidermis and facilitates penetration of active components included in cosmetic emulsions. Furthermore, it is known to have anti-allergic properties. Lecithin is present in every cell of human body, mainly as a component of cell membranes. The phospholipid slows down processes of ageing, supports utilisation of vitamins soluble in fats and increases blood circulation efficiency [17, 18].

Lecithin is a yellow-brownish substance of sticky consistency. It is a mixture of polar and non-polar lipids, while the non-polar ones constitute over 60% of the mixture weight. Before being used in cosmetic purposes it is refined. Among the best known phospholipids a few combinations can be mentioned, differing in formations bonded with the rest of phosphoric acid (FIG. 4).

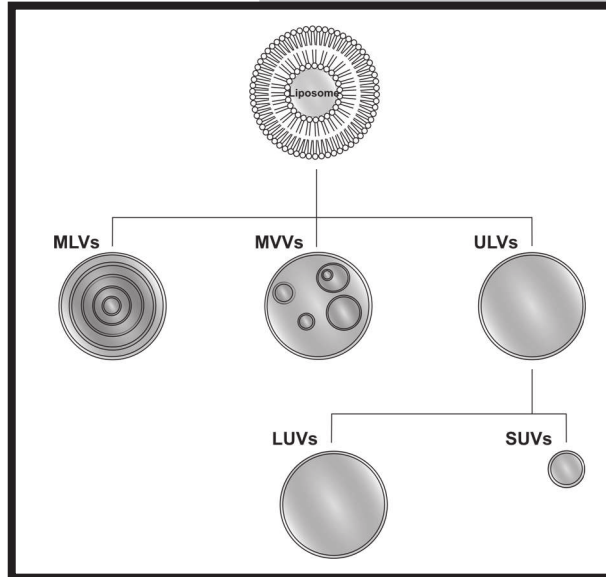


RYS. 4. Struktury: a) fosfatydylocholina (lecytyna), b) fosfatydyloetanolamina, c) fosfatydylseryna.
FIG. 4. Structures: a) phosphatidylcholine (lecithin), b) phosphatidylethanolamine, c) phosphatidylserine.

Podział liposomów

Liposomy można podzielić pod względem rozmiaru, ilości warstw otoczki i sposobu wykonania na grupy (RYS. 5):

- Liposomy wielowarstwowe (multilamellar vesicles, MLVs) - rozmiar: 0,4-10 μm .
- Liposomy jednowarstwowe (unilamellar vesicles, UVs) - rozmiar: 0,01-1 μm ,
 - duże liposomy jednowarstwowe (large unilamellar vesicles, LUVs) - rozmiar: 0,05-1 μm ,
 - małe liposomy jednowarstwowe (small unilamellar vesicles, SUVs) - rozmiar: 0,02-0,03 μm .
- Wielopęcherzykowe liposomy (multivesicular vesicles, MVVs) - rozmiar: > 1 μm .
- Pęcherzyki ogromne (giant unilamellar vesicles, GUV) o wielkości powyżej - rozmiar: > 1 μm .



RYS. 5. Podział liposomów.
FIG. 5. Classification of liposomes.

Classification of liposomes

Liposomes can be divided in groups on the basis of their size, number of envelope layers and production method:

- Multilamellar vesicles, MLVs – size: 0.4-10 μm ,
- Unilamellar vesicles, UVs - size: 0.01-1 μm ,
- Small unilamellar vesicles, SUVs - size: 0.02-0.03 μm ,
- Large unilamellar vesicles, LUVs - size: 0.05-1 μm ,
- Multivesicular vesicles, MVVs - size: > 1 μm ,
- Giant unilamellar vesicles, GUV - size above - size: > 1 μm . (FIG. 5)

Metody wytwarzania liposomów

Znanych jest wiele metod wytwarzania liposomów, które wymieniono poniżej, a ważniejsze omówiono.

1. Hydratacja lipidów w obecności rozpuszczalnika

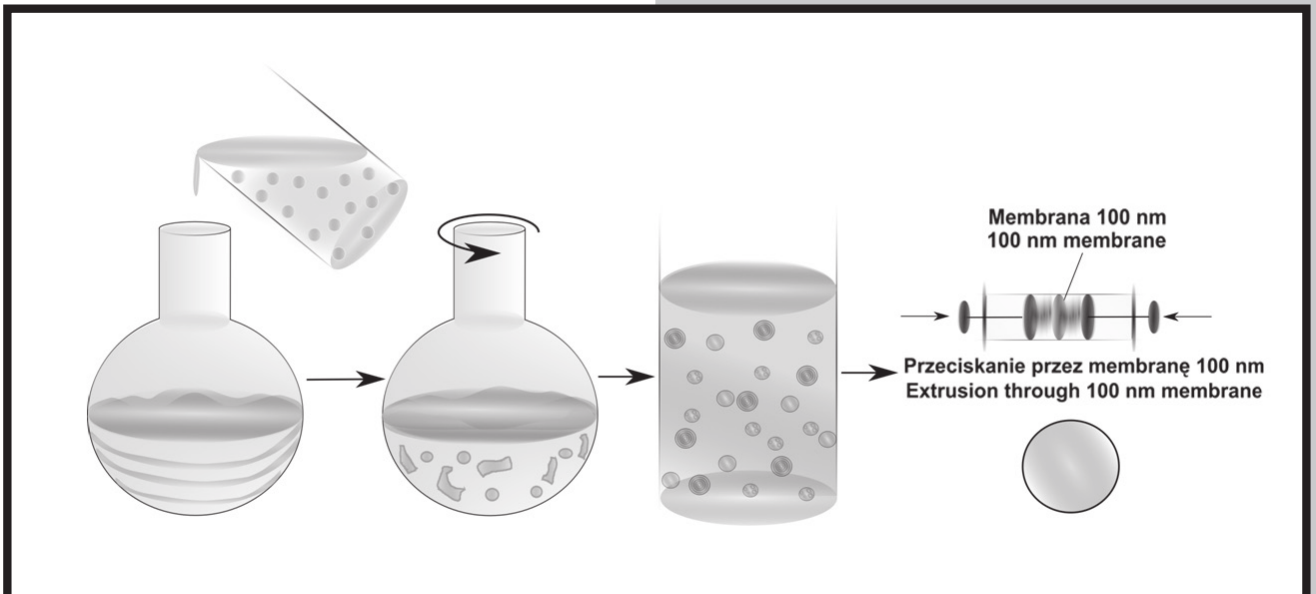
Metoda hydratacji lipidów w obecności rozpuszczalnika jest metodą konwencjonalną. Do tego celu wykorzystuje się kolbę okrągłodenną, w której lipidy rozpuszczane są w rozpuszczalniku organicznym. Następnie suszone są w próżni w celu usunięcia pozostałości rozpuszczalnika organicznego, w wyniku czego na ściankach kolby osadza się cienki film lipidowy. Wysuszony film jest wówczas hydratowany w fazie wodnej, co powoduje wytworzenie heterogenicznej mieszaniny MLVs, MVVs i kilku LUVs. Ten proces jest przedstawiony schematycznie na RYS. 6. Taka heterogeniczna mieszanina liposomowa zaraz po wytworzeniu może być wyciskana poprzez membrany o znanej wielkości porów w celu wyprodukowania LUVs lub poddana sonikacji do produkcji SUVs [15,16,19].

Liposome preparation methods

Among the numerous production methods of liposomes only the most important are discussed below.

1. Hydration of lipids in the presence of solvent

The method of lipids hydration in the presence of solvent is a conventional one. In this method a round-bottom flask is used, where lipids are dissolved in organic solvent. Then they are dried in vacuum in order to remove residues of organic solvent, which results in a thin lipid film being deposited on the flask's walls. The desiccated film is then hydrated in aqueous phase, which causes creation of heterogenic mixture of MLVs, MVVs and a few LUVs. The process is diagrammatically presented in the FIG. 6. Right after preparation such heterogenic liposome mixture can be squeezed out through membranes with known pore diameter in order to produce LUVs or subjected to sonication in order to produce SUVs [15,16,19].



RYS. 6. Hydratacja suchego lipidu.
FIG. 6. Hydration of dry lipid.

2. Ultrasonikacja

Metoda wykorzystująca ultradźwięki wykorzystywana jest do wytwarzania jednorodnych rozproszonych małych pęcherzyków SUV-y, które mogą zwiększyć penetrację tkanek. Najpierw poddaje się sonikacji w atmosfera azotu lub argonu przygotowane wcześniej MLVs, wykorzystując dezintegratory zanurzeniowe lub wannowe. W wyniku niszczenia MLVs powstają SUV o średnicy w zakresie od 15-50 nm [20,21]. Wadami tej metody jest m.in. utlenianie wiązań nienasyconych w łańcuchach kwasu tłuszczowego fosfolipidów i hydroliza do lizofosfolipidów i wolnych kwasów. Inną wadą jest, denaturacja lub inaktywacja niektórych termicznie substancji (na przykład, DNA, białka, itp.) w celu ich zamknięcia [16].

3. Prasa Frencha

Prasa Frencha służy do wytwarzania małych liposomów SUVs przez rozbijanie dużych MLV siłami ścinania. W tym celu zawieszina przeciskana jest przez pojedynczy otwór wykorzystując wysokie ciśnienie [21].

4. Metoda wstrzykiwania rozpuszczalników

a) wstrzykiwanie roztworu etanolowego lub roztworu eterowego.

Wstrzykiwanie etanolowego roztworu rozpuszczonych lipidów do szybko mieszanej fazy wodnej zobrazowano na RYS. 7.

5. Usunięcie detergentu

W metodzie tzw. usuwania detergentów, w których lipid rozpuszcza się w roztworze detergentu o wysokiej wartości krytycznego stężenia miceli. Następnie usuwa się detergent poprzez np. dializę. Ta metoda laboratoryjna nie jest wykorzystywana na skalę przemysłowej produkcji liposomów. Jednak na rynku pojawiły się ekstrudery liposomowe o pojemności ~800 ml.

6. Odparowanie techniką faz odwróconych

Metoda ta polega na gwałtownym wstrzyknięciu roztworu wodnego do rozpuszczalnika organicznego, który zawiera rozpuszczone lipidy z równoczesnym działaniem ultradźwięków prowadzącym do formowania się kropelek wody w rozpuszczalniku organicznym (emulsja w/o). Otrzymana emulsja jest suszona w rotacyjnej wyparce do wytworzenia się półstałego żelu. Następnie uformowany żel poddawany jest intensywnemu mieszaniu mechanicznemu w celu zainicjowania odwrócenia się faz z w/o do dyspersji o/w. Podczas mieszania niektóre krople wody zapadają się formując fazę zewnętrzną, podczas gdy pozostała część tworzy uwieziony wodny film. Duże jednorodne pęcherzyki (średnicy 0,1-1 μm) są tworzone podczas tego procesu. Wytwarzanie liposomów za pomocą tej metody wykorzystuje się do zamykania makromolekuł np. jak RNA, enzymy bez straty ich aktywności [16].

7. Przeciskanie przez pory pod wysokim ciśnieniem

Metoda przetłaczania pod wysokim ciśnieniem daje jednorodne SUV. W metodzie tej przygotowaną zawieszinę MLVs wielokrotnie przepuszcza się przez poliwęglanowe membrany o bardzo małych średnicach porów (0,8-1,0 μm) pod wysokim ciśnieniem (najczęściej ciśnienie od 5-10,5 MPa). Wybierając filtry z odpowiednią wielkością porów możemy wytwarzać dowolne średnice pęcherzyków liposomowych. Dzięki tej metodzie otrzymujemy ujednorodnione i małe wielkości liposomów.

8. Metoda zamrażania-rozmrażania

W naczyniach z mieszaniną oziębiającą jak ciekły azot, czy suchy lód umieszcza się zawieszinę liposomów, która zostaje szybko zamrożona. Następnie po całkowitym zamrożeniu umieszcza się ją w łaźni wodnej o temperaturze ~60°C.

2. Ultrasonication

The method, in which ultrasonic waves are used, is applied to prepare homogeneously distributed SUVs vesicles which can increase penetration of tissues. Previously prepared MLVs undergo sonication in nitrogen or argon atmosphere with the application of immersion or tank disintegrators. As a result of MLVs destruction, SUVs of 15-50 nm in diameter are created [20,21]. The disadvantages of this method include oxidation of unsaturated bonds in the fatty acid chains and hydrolysis of phospholipids to lysophospholipids and free acids. Another disadvantage is, denaturation or inactivation of some thermally labile substances (e.g., DNA, proteins, etc.) enclosed in liposomes [16].

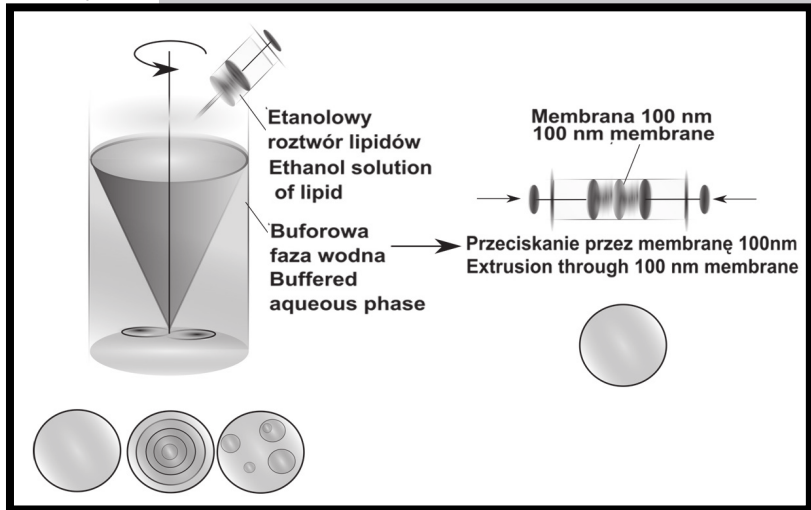
3. French press

French press is used to prepare SUV small liposomes through breaking large MLVs with shearing forces. The suspension is pushed through a single opening with the application of high pressure [21].

4. Method of solvents injection

Methods of solvent injection include injection ethanolic solution or injection ether solution.

Injecting ethanol solution of dissolved lipids into quickly stirred aqueous phase has been shown in FIG. 7.



RYS. 7. Wstrzykiwanie etanolowego roztworu rozpuszczonych lipidów.

FIG. 7. Injecting ethanolic solution of dissolved lipids.

5. Detergent removal

In this method the detergent, in which lipid is dissolved in detergent solution of high value of critical micelle concentration (CMC), is removed in the process of, e.g. dialysis. The laboratory method is not applied on commercial scale of liposomes production. However, liposome extruders of ~800 ml capacity have been present on the market for some time now.

6. Inverted phases of evaporation

The method consists in intense injection of aqueous solution into organic solvent containing lipids with simultaneous application of ultrasounds leading to formation of water droplets in the organic solvent (w/o emulsion). The obtained emulsion is dried in a rotary evaporator until semi-solid gel is created. Then the formed gel undergoes intense mechanical stirring in order to initiate inversion of phases with w/o to o/w dispersion. During mixing some water drops subside forming outer phase, while the remaining part creates bonded aqueous film. Large homogenous vesicles (of 0.1-1 μm in diameter) are created during the process. Preparing liposomes with the application of the described method is used to close macromolecules, as RNA and enzymes, without losing their activity [16].

Zamrażanie i rozmrażanie powtarza się kilkakrotnie obserwując zawiesinę liposomów. Metoda ta umożliwia zwiększenie objętości roztworu zamykanego w liposomie, zmniejszenie liczby warstw oraz uzyskanie liposomów LUV [15].

9. Mikrofluidyzacja

Metoda fluidyzacji to metoda odpowiadająca produkcji na skalę przemysłową. Zaletą mikrofluidyzacji jest wytwarzanie liposomów bez konieczności wprowadzania rozpuszczalników organicznych do rozpuszczenia lipidów. Proces ten jest wykorzystywany w technologii żywności i kosmetyce. Zagęszczona dyspersja lipid/woda jest wprowadzana do mikrofluidyzera, który następnie pompuje pod wysokim ciśnieniem poprzez filtry o wielkości porów od 1-5 μm . Następnie ciecz jest przeciskana przez dwa mikrokanały, a następnie zderza się z dużą prędkością. Ciecz zbierana na końcu jest ponownie zwracana do czasu otrzymania dyspersji wyglądającej na homogeniczną z liposomami o jednakowej wielkości. Technika mikrofluidyzacji wytwarza jednowarstwowe pęcherzyki o średnicach od 50-1000 nm. Wielkość wytwarzanych liposomów podczas procesu jest kontrolowana zmianą ciśnienia np. im mniejsze ciśnienie tym większe pęcherzyki liposomów [16].

Promotory przenikania

Liposomy zbudowane z fosfolipidów są zbyt duże i za mało elastyczne, aby mogły dobrze penetrować i przenikać warstwę rogową. Najczęściej absorbowane są przez *stratum corneum*, gdzie w górnych jej warstwach następuje fuzja lipidowej otoczki i uwolnienie substancji aktywnej, która następnie swobodnie dyfunduje do głębszych warstw. Problem ze stosowaniem liposomów wiąże się z niestabilnością ze względu na podatność ich na utlenianie i rozpad liposomowej struktury. W tym celu należy optymalizować warunki ich przechowywania i przenikania wprowadzając związki chelatujące oraz przeciwutleniające jak np.: witaminy A, E, likopen, karotenoidy. Substancja aktywna z liposomu może zostać uwolniona na kilka sposobów np. po przez włączenie do błony komórkowej miejsca docelowego lub na zasadzie fagocytozy - czyli wchłonięcia do wnętrza komórki. Powierzchnię liposomów można modyfikować przez pokrycie jej różnymi polimerami [22,23,24]. Ponadto stosuje się szereg modyfikacji liposomów zwiększając ich elastyczność i trwałość. Do struktury liposomów wprowadza się prócz fosfolipidów surfaktanty np. polisorbate 80 oraz wiele innych, często syntetycznych cząsteczek. Takimi zmodyfikowanymi układami w celu poprawy przenikania związków aktywnych są: transferosomy, etosomy, polimerosomy, niosomy, katesomy, itp. [25] Lipidowa otoczka liposomów może pełnić także rolę promotora wchłaniania wpływając na właściwości warstwy rogowej zwiększając jej przepuszczalność poprzez zmiany w strukturze cementu międzykomórkowego. Prócz liposomów stosuje się wiele różnych modyfikacji warstwy rogowej stosując promotory przejścia, które mają na celu poprawić jej przepuszczalność dla składników aktywnych. Takie promotory sorpcji powinny być nietoksyczne, szybko przenikać do warstwy rogowej skóry, wywoływać odwracalne zmiany w przepuszczalności *stratum corneum*, nieaktywne farmakologicznie oraz niedrażniące i nieuczulające. Ważną cechą charakteryzującą bezpieczny promotor sorpcji jest jego odwracalne działanie, tak aby po aplikacji preparatu przywrócona została bariera warstwy rogowej.

Promotorami sorpcji bardzo często są małowielkościowe alkohole, glikole, nienasycone kwasy tłuszczowe, terpeny, substancje powierzchniowo czynne itp. Mogą one działać w różny sposób:

- zaburzać uporządkowany układ ciekłokrystaliczny cementu międzykomórkowego,

7. Pushing through pores under high pressure

The method of pushing through under high pressure gives homogenous SUVs. A prepared MLV suspension is repeatedly passed through polycarbonate membranes with very small pores diameters (0.8-1.0 μm) under high pressure (most often 5-10.5 MPa). Selecting filters with adequate pores size it is possible to produce arbitrary diameters of liposome vesicles. The method allows obtaining homogenous and small sizes of liposomes.

8. Frozen and Thawed – FAT method

Suspension of liposomes is placed in containers with freezing mixture, as liquid nitrogen or dry ice, where it is quickly frozen. Then, after being completely frozen, it is placed in aqueous bath of the temperature of $\sim 60^{\circ}\text{C}$. Cycles of freezing and thawing are repeated several times while the liposome suspension is observed. FAT method allows to increase the volume of suspension enclosed in liposome, decrease the number of layers and obtain LUV liposomes [15].

9. Microfluidisation

The method of fluidisation is a method used in production on a commercial scale. One of the advantages of microfluidisation is a possibility of liposomes production without the need of introducing organic solvents to dissolve lipids. The process is used in food technology and cosmetics. Condensed lipid/water dispersion is inserted to micro-diffuser, where it is pumped under high pressure through filters with pores of 1-5 μm in diameter. Then the liquid is pushed through two micro-channels, and collided at high speed. The liquid finally collected is returned again in order to obtain dispersion, looking like homogenous with identical size liposomes. The microfluidisation technology allows to obtain unilamellar vesicles of 50-1,000 nm in diameter. The size of liposomes produced in the process is controlled with changes in pressure, e.g. the lower pressure the larger liposomes vesicles [16].

Penetration activators

Liposomes made of phospholipids are too small and not elastic enough to penetrate the *stratum corneum* well. Most often, they are absorbed by *stratum corneum*, where, in its upper layers, fusion of lipid envelope and release of active substance take place. Then the active substance freely diffuses to deeper layers. The problem with applying liposomes is connected with their instability due to their susceptibility to oxidation and disintegration of liposomes structure. In order to avoid that, storing and penetration conditions must be optimised by introducing chelating agents and antioxidants, as vitamins A and E, lycopene or carotenoids. The active substance from liposome can be released in various ways: through inclusion to cell membrane of the target area, or in phagocytosis, that is engulfing into the cell's interior. Liposome surface can be modified by covering it with various polymers [22,23,24]. Moreover, numerous liposomes modifications are used to enhance their elasticity and durability. Apart from phospholipids, surfactants, e.g. polysorbate 80 and many other, often synthetic particles are introduced into liposomes structure. Such modified structures improving active substances penetration include: transferosomes, ethosomes, polymersomes, niosomes, katesomes, etc. [25]. Liposomes lipid envelope can also perform a role of an absorption activator, influencing on the properties of *stratum corneum* and increasing its permeability through changing the structure of intercellular cement. Apart from liposomes, numerous other modifications of *stratum corneum* are used by applying transfer activators, which aim is to enhance the layer's permeability for active components.

- zwiększać płynność lub rozpuszczać lipidy cementu międzykomórkowego,
- zmieniać hydratację grup polarnych lipidów [26].

Zastosowanie liposomów

Liposomy znalazły swoje zastosowanie w wielu dziedzinach nauki i gałęziach przemysłu takich jak biotechnologia, mikrobiologia, przemysł kosmetyczny, farmaceutyczny, spożywczy. Ponadto stosuje się je w wielu dziedzinach medycyny, takich jak diagnoza czy terapia. Zastosowanie ich pozwala na ochronę i stabilizację zamykanych w nich składników oraz wprowadzania składników niekompatybilnych. Liposomy jako ważne nośniki leków charakteryzują się niską toksycznością i biokompatybilnością, są szeroko używane w formułach farmaceutycznych [27-29].

Posiadają wiele pozytywnych właściwości na przykład: mogą przenosić zarówno wodę jak i rozpuszczalne w lipidach leki, mogą zawierać mikro i makro molekuly, zapewniają długotrwałe uwalnianie i ukierunkowane dostarczanie leku oraz docelowe dostarczenie leku w środowisku nieprzyjaznym, stabilizują biodegradowalne leki i związki aktywne zapewniając ochronę przed utlenianiem, poprawiają stabilizację protein i mogą być aplikowane do organizmu poprzez wiele dróg dostarczania. Liposomy posiadają 3 podstawowe wady: niską stabilność, wolne uwalnianie leku i bardzo dużą akumulację liposomu w wątrobie i śledzionie [29-31]. Ponadto posiadają także niekorzystne właściwości, takie jak: małą rozpuszczalność, krótki okres półtrwania, problem z docelowym dostarczeniem leku do różnych tkanek ze względu na ich duży rozmiar, fosfolipidy ulegają utlenianiu, szybkie wychwytywanie przez komórki RES, wysokie koszty produkcji i możliwość występowania reakcji alergicznych na składniki liposomalne. Substancja aktywna z liposomu może zostać uwolniona na różne sposoby: poprzez włączenie do błony komórkowej miejsca docelowego lub na zasadzie fagocytozy (wchłonięcia do wnętrza komórki). Powierzchnię liposomów można modyfikować, co może wydłużać okres półtrwania oraz zapobiegać reakcjom z innymi związkami. Do liposomów przyłącza się również ligandy specyficzne dla poszczególnych komórek. Mogą to być białka oddziałujące z odpowiednim receptorem, co powoduje, że lek może wiązać się tylko z określonym miejscem docelowym warunkującym określony efekt biologiczny.

W kosmologii

Pierwszy produkt kosmetyczny z zastosowaniem liposomów pojawił się na rynku w 1986 roku, był to krem przeciwstarzeniowy opracowany przez firmę Dior [25]. Powodem stosowania liposomów w kosmetyce jest ich łatwość przygotowania i możliwość poprawy absorpcji składników aktywnych przez skórę. Tworzenie liposomów umożliwia wprowadzenie niemal dowolnych substancji czynnych. Do najczęściej transportowanych substancji przez liposomy w preparatach kosmetycznych należą witaminy: A, B, C, E, kolagen, elastyna, pantenol, aminokwasy, kwas hialuronowy, tyrozyna, kofeina, ekstrakty roślinne (miłorząb japoński, aloes, kielki pszenicy), koenzym Q10, ATP itp. Dzięki tej metodzie możliwe jest kontrolowane, stopniowe uwalnianie, które wykorzystywane jest w preparatach o przedłużonym działaniu. Do produktów kosmetycznych zawierających liposomy możemy zaliczyć kosmetyki pielęgnacyjne, regeneracyjne, przeciwzmarszczkowe, preparaty samoopalające, płyny do twarzy itp. [32]. Najczęściej liposomy stosowane są w układach wodnych, jednak można spotkać struktury polimerowe (mikrosfery) w preparatach bezwodnych takich jak pomadki, czy dezodoranty.

Such sorption activators should be nontoxic, quickly penetrate stratum corneum of the skin, cause reversible changes in stratum corneum's permeability, pharmacologically inactive and inoffensive and should not cause allergies. Very often sorption activators are low-molecular alcohols, glycols, non-saturated fatty acids, terpenes, surface active surfactant, etc. They may act in various ways:

- disturb orderly liquid crystal system of intercellular cement,
- increase liquidity or dissolve lipids of intercellular cement
- change hydration of lipids' polar groups [26].

Application of liposomes

Liposomes are widely used in many fields of science and industry, biotechnology, microbiology, pharmaceutical, food and cosmetic industry, to name a few. In medicine, diagnosis and therapy are also the fields where liposomes have found application. They enable to protect and stabilise components enclosed in them, and introduce incompatible elements. Liposomes, as important carriers of medicines, that are characterised with low toxicity and biocompatibility, are widely used in pharmaceutical formulas [27-29]. Liposomes have many positive advantages for example: they can carry both water and lipid soluble drugs, and can incorporate micro and macro molecules. Furthermore, phospholipids provide stabilization and sustained release and targeted drug delivery or site specific drug delivery in hostile environment, biodegradable drugs can be stabilized from oxidation. They improve protein stabilization and can be administered through various routes. Liposomes have three basic disadvantages: low stability, slow release of medicine and very high accumulation of liposome in liver and spleen [29-31]. Additionally, liposomes have problem with targeting to various tissues due to their large size, phospholipids undergoes oxidation, quick uptake by cells of R.E.S, high production costs. Allergic reactions may occur to liposomal constituents. Active substance from liposome can be released in various ways: through inclusion in cell membrane of the target area, or by way of phagocytosis (vesicular internalization of solids). The surface of liposomes can be modified, which can result in extending the period of half-life and preventing reactions with other compounds. Ligands specific for individual cells can also be bound to liposomes. They may be proteins reacting with a relative receptor, which makes a medicine combine only with a definite target area, giving a desired biological effect.

In cosmetics

The first cosmetic product with liposomes was introduced to the market in 1986, and it was an anti-ageing cream developed by Dior company [21]. The main reason why liposomes are used in cosmetics is the ease of their preparation and possibility to increase absorption of active components by the skin. Vitamins A, B, C, E, collagen, elastin, panthenol, amino acids, hyaluronic acid, tyrosine, caffeine, vegetable extracts (ginkgo, aloe, wheat germ), Q10 coenzyme, ATP, and other are substances in cosmetic preparations, most often carried by liposomes. Owing to this method, a controlled, gradual release is possible, which is applied in long-acting preparations. Cosmetic products containing liposomes are functional, regeneration and anti-wrinkle cosmetics, sunless tanning preparations, face lotions, etc. [32]. Liposomes are most frequently used in hydrous arrangements, but polymer structures (micro-spheres) can be encountered in anhydrous preparations such as lipsticks or deodorants. They have been elaborated in order to provide aromatic compounds, herbs and vitamins [23].

Zostały one opracowane w celu dostarczania związków zapachowych, ziół i witamin [23]. Fosfatydylocholina, to jeden z głównych składników liposomów, jest stosowany w produktach do pielęgnacji skóry i szamponach z powodu właściwości zmiękczających i kondycjonujących. W pracy przeprowadzono badania z enzymem YeastCuZnSOD [33] w postaci liposomowej, który otrzymano z drożdży. Drożdże wcześniej zostały poddane fermentacji w pożywce bogatej w cząsteczki miedzi i cynku. Wykazano *in vitro*, że otrzymany produkt ma doskonałą aktywność przeciwutleniającą, lepszą niż większość popularnych antyoksydantów stosowanych w kosmetyce np.: takich jak tokoferol i polifenole [33]. W pracy [34] omówiono wprowadzenie resweratrolu do liposomów w alginianie. Wzrost stężenia alginianu lub lepkości powoduje wzrost rozmiaru mikrokulek i efektywności enkapsulacji. Badany układ charakteryzował się przedłużonym czasem uwalniania resweratrolu gdzie szybkość dyfuzji zależała od stężenia macierzy alginianu. Mikrokulki liposomu-w-alginianie mogą być wykorzystane do ochrony i przedłużonego w czasie uwalniania naturalnych antyoksydantów [34]. W pracy [35] opisano liposomy bazujące na sfingomielinie, które następnie aplikowano do warstwy podstawnej oraz warstwy rogowej. Zasugerowano, że ten typ liposomów może mieć wpływ na efekt nawilżania oraz funkcje barierowe stratum corneum.

W dermatologii i medycynie

Liposomy stosowane jako czynniki transportujące leki niosą za sobą pewne ograniczenia. Wynikają one przede wszystkim z nietrwałości liposomów, których dystrybucja ograniczana jest przez układ siateczkowo-śródbłonkowy śledziony - RES (Reticulo-Endothelia System), który je rozpoznaje i usuwa z układu krążenia [36,37]. Ich efektywność jest również związana z wyciekaniem, skutkującym uwalnianiem leku do krwiobiegu oraz trudności z pokonywaniem bariery krew-tkanka [38]. Dlatego wprowadzono bardziej trwałe formy liposomów używając np. syntetycznego polimeru – hydrofilowego poliglikolu etylenowego (PEG) [29,31]. Oplaszczając PEG liposomy, uzyskano ciche, niewidoczne liposomy. Liposomy ciche nie są rozpoznawane przez układ RES, co pozwoliło wydłużyć czas ich krążenia i uwalniania substancji aktywnej do krwiobiegu. Ich wadą jednak jest wolne uwalnianie substancji czynnej, prowadzące do niskiej bioaktywności i uodpornienia komórek rakowych na lek. Ułożenie przestrzenne głównych grup PEG stanowi zatem barierę ochronną liposomu, zapobiegając jego interakcjom ze składnikami krwi oraz układem RES [39]. Wykorzystanie tak zmodyfikowanych liposomów zaowocowało wprowadzeniem liposomowej formy doksorubicyny powlekaanej poliglikolem etylenowym PEG-DOX (Pegylated Doxorubicin) w zastosowaniach leczenia nowotworów [40].

Wciąż trwają badania nad modyfikacjami pęcherzyków liposomowych w zależności od ich przeznaczenia i sposobu dostarczenia leku. Wielu badaczy [41-43] proponuje w celu poprawy biodostępności leku, zastosowanie liposomów polimerowych o wysokiej czułości pH. Takie nośniki wrażliwe na zmianę pH mogą przenieść lek do cytoplazmy, ponieważ chronią zawartość uwięzioną w cytozolu od środowiska zewnątrzkomórkowego. Liposomy tego typu mogą stać się zatem cennymi, bezpiecznymi i skutecznymi czynnikami w immunoterapii nowotworowej [42]. W pracy [43] dla liposomów pH-wrażliwych wyposażonych w pH czuły aktywator zaproponowano termin filposomy. Układy dostarczania leków na bazie liposomów posiadają duży potencjał w terapii nowotworowej. Ważna jest kontrolowana i ogólnoustrojowa metoda dostarczania liposomów do komórek nowotworowych. Na przykład sprzężenie liposomów kationowych, zawierających distearylo-glicerylo-difosfoetanolaminę (DSPE) z polietylenoiminą (PEI) poprawiło dostęp leku do komórek nowotworowych.

Phosphatidylcholine is one of the chief components of liposomes and is used in skin care products and shampoos, owing to its softening and conditioning properties. In the course of the study the analyses were carried out with the Yeast CuZnSOD [33] enzyme in the form of liposomes, which was obtained from yeast. The yeast was earlier subjected to fermentation in the culture medium rich with copper and zinc rich particles. It was demonstrated *in vitro* that obtained product has excellent antioxidant properties, better than that of most of popular antioxidants used in cosmetic industry, e.g.: tocopherol and polyphenols [33]. The study [34] discusses the introduction of resveratrol into the liposomes in alginate. The increase in alginate concentration or viscosity causes the increase in microspheres sizes and the effectiveness of encapsulation. The arrangement under study was characterized by the prolonged resveratrol release time, where the diffusion rate was dependent on the concentration of alginate matrix. The liposomes microspheres in alginate can be used for the protection and prolonged release of natural antioxidants [34]. The study contains [35] a description based on sphingomyelins which were then applied to the germinative layer and corneous layer. It was suggested that this type of liposomes can influence the moisturizing effect and skin barrier function of the stratum corneum (*corneous layer*).

In dermatology and medicine

Liposomes applied as carriers of medicines have some limitations. Firstly, they follow from impermanence of liposomes, whose distribution is limited by the reticular-endothelial system (RES) which recognises them and eliminates from the blood circulation system [36,37]. Their effectiveness is also connected with discharging drug to blood circulation system and problems with overcoming the blood-tissue barrier [38]. That is why more durable forms of liposomes were introduced, e.g. synthetic polymer – hydrophilic polyethylene glycol (PEG) [29,31]. Through coating liposomes with PEG, quiet and invisible (stealth) liposomes were obtained, invisible for the RES system, which enabled to increase the time of their circulation and release active substances to the blood circulation system. However, their disadvantage is slow release of active substance, which leads to low bioactivity and immunization of cancer cells. Special organisation of main PEG groups constitutes liposome's protective barrier, preventing its interactions with blood components and the RES system [39]. The utilisation of liposomes modified in this way resulted in PEG-DOX (pegylated doxorubicin), liposome form of doxorubicin coated with polyethanol glycol, in treatment of tumour [40].

Research on modifications of liposome vesicles, depending on their purpose and way of medicine delivery, is on its way. Numerous researchers [41-43], in order to improve medicine's bio-accessibility, suggest application of polymer liposomes with high pH sensitivity. Such carriers, sensitive to pH changes, can transport drug to cytoplasm, as they protect the content enclosed in cytosol from the influence of extracellular environment. Thus, liposomes of this kind may become valuable, safe and efficient agents in tumour immunotherapy [42]. In the article [43] a term filposomes has been suggested for pH-sensitive liposomes equipped with pH-sensitive activator. Systems of drug delivery with the application of liposomes are widely discussed, as they show huge potential in tumour therapy. A controlled and systemic method of liposomes delivery to tumour cells is important. An example can be given that linking cation liposomes, containing distearyl-sn-glycero-diphosphoethanolamine (DSPE) with polyethylenimine (PEI) improved access of medicine to tumour cells. Intracellular absorption of DSPE-PEI liposomes by tumour cells was higher than the absorption in the case of DSPE liposomes.

Wewnątrzkomórkowa absorpcja liposomów DSPE-PEI przez komórki nowotworu była wyższa niż w przypadku liposomów DSPE. Zatem liposomy DSPE-PEI są interesujące jako nośniki leków skutecznie zwiększających absorpcję i wewnątrzkomórkową lokalizację przeciwnowotworowych leków w tkance nowotworowej przez wstrzyknięcie ich do nowotworu [44].

W dermatologii liposomy stosuje się głównie ze względu na ich właściwości terapeutyczne, gdzie mogą być wykorzystane jako nośniki zarówno hydrofilowych jak i lipofilnych terapeutyków ze względu na ich charakter amfifilowy. Wykorzystywane są jako nośniki leków między innymi w leczeniu atopowego zapalenia skóry, trądziku, łuszczycy, bielactwa, rybiej łuski, przy wypadaniu włosów oraz raka skóry. Liposomy mogą stabilizować niestabilne leki poprzez ich kapsułkowanie, zwiększając możliwości penetracji związków nieprzenikających przez skórę. Pomagają również w zmniejszeniu podrażnień skóry poprzez regulowane uwalnianie leków oraz uwodnienie naskórka. Mogą służyć również do docelowego przenoszenia leków do struktur łojowych, czyli wspomagać leczenie chorób związanych z zaburzeniami mieszków włosowych i gruczołów łojowych [45]. Retinol i hydrochinon są stosowane w leczeniu odbarwień skórnych, jednak wprowadzenie ich razem do preparatu powoduje utlenienie retinolu. Zastosowanie liposomów w takich preparatach umożliwia oddzielenie związków i otrzymanie stabilnego preparatu. Znajdują również zastosowanie w leczeniu atopowego zapalenia skóry AZS. Mutacja genu filagryny wpływa na zaburzenia funkcji i struktury naskórkowej u pacjentów chorych na AZS. Zaburzenia te doprowadzają między innymi do zmniejszenia ilości białka niezbędnego w utrzymaniu prawidłowego kształtu korneocytów i zmiany organizacji blaszek lipidowych. W pracy [45,46] stwierdzono, że po aplikacji liposomów zwiększyło się wydzielanie ciał lamelarnych (lamellar bodies), co prowadziło do poprawy stanu skóry. Ze względu na podobieństwo zachodzące pomiędzy strukturą liposomów i warstwy lipidowej w warstwie rogowej skóry, liposomy wiążą się z keratyną warstwy rogowej naskórka, tworząc cienki film okluzyjny. Prowadzi to do zmniejszenia przetranskórkowej utraty wody (trans-epidermal water loss) oraz przenikania substancji drażniących i alergogennych [45-47].

Leki pierwszej i drugiej linii (jak np. nadtlenuk benzoilu (BPO), tretynoina, adapalen, klindamycyna) stosowane do leczenia trądziku powodują wiele skutków ubocznych, co prowadzi do niepowodzenia w leczeniu skórnych zmian chorobowych. Zamknięcie leku przeciwtrądzikowego w liposomach umożliwia dostarczenie leku w większym stężeniu w miejscu jego aplikacji [45]. W pracy [48] porównano zastosowanie liposomu z 1% roztworem klindamycyny z samym 1% roztworem klindamycyny w leczeniu trądziku. Lek przenoszony przez liposomy wykazał lepsze działanie oraz brak skutków ubocznych. W literaturze [49] opisano porównanie preparatu liposomowego z 0,01% tretynoiną (liposomal tretinoin 0,01%) z ogólnie dostępnymi w handlu żelami zawierającymi tretynoinę. Badania wykazały 1,5-krotne wzmocnienie skuteczności leku z liposomami oraz zmniejszenie efektów ubocznych związanych z terapią tretynoiną.

Analogi witaminy D takie jak kalcypotriol, kalcytriol i takalcitol mają działanie przeciwłuszczycowe ze względu na zwalczanie zapaleń i szybkiego namnażania się komórek naskórka. Autorzy w pracy [50] sugerują, że stosując preparaty liposomowe, stężenie witaminy D₃ może być zmniejszone w porównaniu z obecnie dostępnymi preparatami handlowymi bez pogorszenia efektu terapeutycznego, jednocześnie zmniejszając efekty uboczne (podrażnienie skóry) oraz ogólnoustrojowe.

Thus DSPE-PEI liposomes are interesting as carriers of drugs effective for increasing absorption and intracellular localisation of anti-tumour medicines in tumour tissue through injecting into the tumour [44].

In dermatology liposomes are mainly applied due to their therapeutic properties, where they can be used as the carriers of both hydrophilic and lipophilic therapeutics, due to their amphiphilic nature. They are used as the carriers of drugs, among others in the treatment of atopic dermatitis, acne, psoriasis, albinism, ichthyosis, or in hair fall and skin cancer. Liposomes can neutralize unstable medicines through their capsulation, increasing the possibilities of the penetration of the compounds that do not permeate the skin. They also help to reduce skin irritation by the controlled release of medicines and cuticle hydration. They can be used for the target transportation of medicines into the sebaceous structures, that is support the treatment of illnesses related to hair follicles and sebaceous glands disorders. Retinol and hydroquinone are used in treatment of skin discolorations, but if they are introduced to the preparation together, they cause oxidation of retinol. Application of liposomes in such preparations enables to separate the compounds and provides a stable preparation. They are also applied in the treatment of atopic dermatitis. The filaggrin gene mutation influences the disorders of the cuticle functions and structure in patients suffering from atopic dermatitis. Those disorders lead, among others, to the reduction of albumin indispensable in maintaining the correct shape of corneocytes and changes in the organization of lipid laminae. The authors [45,46] find in the study that after applying liposomes the lamellar bodies secretion has increased, which led to the improvement of the skin condition. Due to the similarity between the liposomes structure and the lipid layer in the corneous layer of the skin the liposomes bond with the keratin of the corneous layer of the skin, forming a fine occlusive film. This leads to the reduction of the trans-epidermal water loss and the permeation of irritating and allergenic substances [45-47].

The medicines of the first and second line (such as, for instance: benzoyl peroxide (BPO), tretinoin, adapalene, clindamycin), used in the treatment of acne, cause numerous side effects, which lead to failure of the treatment of skin lesions. Enclosing the anti-acne medicine in liposomes enables the provision of a drug higher concentration in the place of its application [45]. The study [48] compares the application of liposome with 1%-solution of clindamycin with a single 1%-solution of clindamycin in the treatment of acne. The medicine carried by liposomes demonstrated a better result and lack of side effects. The literature [49] also describes a comparison of liposomal tretinoin 0.01% with gels containing tretinoin, generally available on the market. The studies have demonstrated the 1.5-fold improvement of the effectiveness of the medicine with liposomes and the reduction of side effects related to the therapy with tretinoin.

The analogues of vitamin D, such as calcipotriol, calcitriol and tacalcitol, have anti-psoriatic effect due to the fact that they fight inflammations and fast cuticle cell proliferation. The authors of the study [50] suggest that by using liposomal preparations the concentration of vitamin D₃ can be reduced in comparison to the preparations now available on the market without any detriment to their therapeutic effect, at the same time reducing side effects (skin irritation) and systemic effects. Dithranol is a medicine used externally in the treatment of psoriasis. The treatment with Dithranol is highly effective in fighting psoriasis, and at the same time it is troublesome for patients due to its irritating and colouring effects on the skin. Enclosing Dithranol in liposome bubbles enhances its availability in the cuticle, which enables the reduction of the dose and side effects dependent on the dose.

Ditranol to lek stosowany zewnętrznie w leczeniu łuszczycy. Terapia ditranolem daje wysoką skuteczność w walce z łuszczycą będąc równocześnie uciążliwą dla chorego ze względu na działanie drażniące i barwiące. Uwężenie ditranolu w pęcherzykach liposomów wspomaga jego biodostępność w naskórku, co umożliwia zmniejszenie dawki i zależnych od dawki działań niepożądanych. Liposomy znalazły również zastosowanie w leczeniu schorzeń płuc do podawania leków drogą wyziewną w celu uzyskania przedłużonego ich działania [51,52]. Droga oddechowa jest wykorzystywana do dostarczania makromolekuł takich jak proteiny, peptydy, szczepionki, DNA oraz w terapii genowej. Nanoosiłki fosfolipidowe są bardzo atrakcyjnymi układami przenoszenia leku w inhalacji aerozolowej. Liposomy ochraniają się przed atakiem systemu immunologicznego płuc poprzez modyfikacje ich powierzchni przy pomocy np. poliglikolu etylenowego PEG zwiększając mukopenetrację poprzez PEGylację i utrzymując uwalnianie leku dla kontrolowanego jego dostarczenia. Muralidharan et al. [52] podają zalety stosowania nanoprzENOsiłków fosfolipidowych PEG i terapeutyków PEG w aerozolach do podawania donosowo lub drogą wziewną. Liposomy stały się również przedmiotem badań w medycynie diagnostycznej, mogą być stosowane jako środki kontrastujące w obrazowaniu komórkowym i nowotworowym [53]. W tym celu zmodyfikowano paramagnetyczne nanocząsteczki liposomowe w bimodalne neutralne nanocząsteczki obrazujące do zastosowania *in vivo*. Doniesienia literatury fachowej przedstawiają farmakokinetyczne i farmakodynamiczne modele, które są kluczowe w fizycznym, biochemicznym i fizjologicznym procesie rozprowadzania leków onkologicznych przez preparaty liposomowe. Modele te przetwarzają zaobserwowane dane w współczynniki określające ogólną przeciwnowotworową odpowiedź i w pewnych przypadkach przewidują warunki do optymalizowania kombinacji chemioterapii, które zawierają nanocząsteczkowe nośniki leków [54].

Interesujące wydaje się wykorzystanie preparatów liposomowych bazujących na fullerenach używanych w terapii i obrazowaniu molekularnym [55]. Medycyna fullerenowa jest nową i szybko rozwijającą się dziedziną. Fullereny posiadają wiele właściwości, które można wykorzystać włączając w to właściwości przeciwutleniające, zapobieganie starzeniu, fotodynamiczne terapie przeciwzapalne, rozprowadzanie leku oraz środki kontrastujące w rezonansie magnetycznym.

Podsumowanie

Liposomy jako nośniki związków aktywnych znalazły zastosowanie w przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym, spożywczym oraz pręŜnie bada się je w różnych dziedzinach medycyny. Przede wszystkim badania liposomów skupiają się wokół wprowadzania i ukierunkowanego dostarczania leków przeciwnowotworowych, przeciwgrzybiczych, przeciwzapalnych, dostarczanie leków genowych, środków znieczulających, w leczeniu chorób płuc i chorób skóry.

Liposomy nie są jednak idealnymi układami i posiadają wiele wad między innymi niską stabilność, wolne uwalnianie leku i bardzo duŜą akumulację liposomów w wątrobie i śledzionie. W tym celu stosuje się wiele modyfikacji pęcherzyków fosfolipidowych aby poprawić ich stabilność, odporność oraz zapewnić odpowiednie kontrolowane i ukierunkowane uwalnianie leku. Ponadto liposomy znajdują również zastosowanie jako środki kontrastujące w obrazowaniu komórkowym. Liposomy i ich modyfikacje są wciąż obiecującymi układami dla medycyny, przemysłu kosmetycznego.

Liposomes are also used in treatment of lung diseases, to be administered by inhalation in order to obtain extended effectiveness of the drug [51,52]. Respiratory tract is used to deliver macromolecules, such as proteins, peptides, vaccines, DNA and in gene therapy. Phospholipid nanocarriers are extremely attractive systems of carrying drug in aerosol inhalation. Liposomes are protected against attacks of the lungs' immune system due to modification of their surface, with the aid of, e.g. PEG polyethylene glycol, increasing mucopenetration through PEGylation and maintaining releasing drug for controlled delivery. Muralidharan P et al. [52] list advantages of application of PEG phospholipid nanocarriers and PEG drugs in intranasal administered aerosols or by inhalation. Liposomes have also become the subject of study in diagnostic medicine, as they can be used as contrast medium in cellular and tumour imaging [53]. In order to achieve this, paramagnetic liposome nanoparticles were modified to bi-modal, neutral imaging nanoparticles to be used *in vivo*. Literature reports pharmacokinetic and pharmacodynamic models, fundamental in physical, biochemical and physiological process of distribution of oncologic drugs by liposome preparations. Those models process observed data into coefficients determining general anti-tumour response, and in some cases foresee conditions to optimise chemotherapy combinations which contain nanoparticle drug carriers [54].

Utilisation of liposome preparations relying on fullerenes used in therapy and molecular imaging seems interesting [55]. Fullerene medicine is a new and quickly developing domain. Fullerenes have numerous properties to be taken advantage of, including antioxidant and anti-ageing properties, photodynamic anti-inflammatory therapies, distributing drugs and contrast medium in magnetic resonance.

Summary

Liposomes as carriers of active compounds have found application in cosmetics, pharmaceutical and food industry, and undergo large-scale tests in various fields of medicine. First of all, liposomes tests are concentrated on the introduction and directed delivery of anti-tumour drugs, antifungals, anti-inflammatory drugs, delivery of gene medicines, anaesthetics, in lungs and skin diseases treatment.

However, liposomes are not ideal systems and have numerous drawbacks, among other things low stability, slow release of medicine and very high accumulation of liposome in liver and spleen. In order to improve their stability and resistance, and ensure proper release of medicine, various modifications of phospholipid vesicles are used. Moreover, liposomes can also be used as contrast media in cell imaging. Liposomes and their modifications are still promising systems for medicine, cosmetic and food industries.

Piśmiennictwo

References

- [1] Arct J., Pytkowska K.: Budowa i fizjologia skóry. *Wiadomości Polskiego Towarzystwa Kosmetologów* 5 (2002) 3-10.
- [2] Arct J., Pytkowska K.: Nawilżanie i surowce nawilżające. *Wiadomości Polskiego Towarzystwa Kosmetologów* 6 (2002) 2-8.
- [3] Daroszewski J., Rybka J., Gamian A.: Glikozaminoglikany w patogenezie i diagnostyce ośmiopatii Gravesa (Glycosaminoglycans in the pathogenesis and diagnostics of Graves's ophthalmopathy). *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 60 (2006) 370-378.
- [4] Salbach J., Rachner T.D., Rauner M., Hempel U., Andereg U., Franz S., Simon J-Ch., Hofbauer L.C.: Regenerative potential of glycosaminoglycans for skin and bone. *Journal of Molecular Medicine* 90 (2012) 625-635.

- [5] Arda O., Göksügür N., Tüzün Y.: Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in Dermatology* 32 (2014) 3-13.
- [6] Machado M., Hadgraft J. Lane M.E.: Assessment of the variation of skin barrier function with anatomic site, age, gender and ethnicity. *International Journal of Cosmetic Science* 32 (2010) 397-409.
- [7] Bouwstra J.A., Gooris G.S.: The Lipid Organisation in Human Stratum Corneum and Model Systems. *The Open Dermatology Journal* 4 (2010) 10-13.
- [8] Rawlings A.V., Scott I.R., Harding C.R., Bowser P.A.: Stratum Corneum Moisturization at the Molecular Level. *The Journal of investigative dermatology* 103 (5) (1994) 731-740.
- [9] Rabionet M., Gorgas L., Sandhoff R.: Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1841 (2014) 422-434.
- [10] Bouwstra J.A., Honeywell-Nguyen P.L., Gooris G.S., Ponec M.: Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progress in Lipid Research* 42 (2003) 1-36.
- [11] Starzyk E., Arct J.: Lipofilowość i absorpcja przez naskórkową w kosmetyce. *Wiadomości Polskiego Towarzystwa Kosmetologów* 6 (2003) 12-17.
- [12] Malinowska M., Sikora S., Ogonowski J.: Transport przez naskórkową aktywnych składników kosmetycznych. *Wiadomości chemiczne* 67 (2013) 321-344.
- [13] Shashi P., Anroop N., Vipin S., Neelam S.: Skin kinetics and dermal clearance. *International Research Journal of Pharmacy* 3(8) (2012) 14-21.
- [14] Couto A., Fernandes R., Cordeiro M.N.S., Reis S.S., Ribeiro R.T., Pessoa A.M.: Dermic diffusion and stratum corneum: A state of the art review of mathematical models. *Journal of Controlled Release* 177 (2014) 74-83.
- [15] Kozubek A.: Wstęp do technologii liposomowej. Wrocław 2004
- [16] Sivasankar M., Katyayan T.: Liposomes – the future of formulations. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry* 1(2) (2011) 259-267.
- [17] Kulawik A., Tal-Figiel B., Warżel M.: Lecytyna i jej rola w farmaceutycznych emulsjach suchych. *Inżynieria i Aparatura Chemiczna* 50 (5) (2011) 62-63.
- [18] Raut S., Bhadoriya S.S., Uplanchiwar V., Mishra V., Gahane A., Jain S.K.: Lecithin organogel: A unique micellar system for the delivery of bioactive agents in the treatment of skin aging. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2(1) (2012) 8-15.
- [19] Schlossman M.L.: *The Chemistry and Manufacture of Cosmetics* (2009).
- [20] Huang, C.: Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry* 8 (1969) 344-352.
- [21] Patil Y.P., Jadhav S.: Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids* 177 (2014) 8-18.
- [22] Szymański P., Markowicz M., Mikiciuk-Olasik E.: Zastosowanie nanotechnologii w medycynie i farmacji. *LAB* 17 (2012) 51-56.
- [23] Lasic D.D.: Novel Applications of Liposomes. *Trends Biotechnol* 16 (1998) 307-321.
- [24] Lautenschlager H.: *Liposomes, Handbook of Cosmetic Science and Technology*, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, (2006).
- [25] Arora N., Agarwal S., Murthy R.S.R.: Latest Technology Advances in Cosmeceuticals. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* 4(3) (2012) 168-182.
- [26] Arct J., Chełkowska M.: Czy możliwe jest przewidywanie zdolności wnikania w skórę aktywnych składników produktów kosmetycznych? *Wiadomości Polskiego Towarzystwa Kosmetologów* 6 (2002) 2-8. 4 (2001) 37.
- [27] Torchilin V.P.: Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery* 4 (2005) 145-160.
- [28] Allen T.M., Cullis P.R.: Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* 303 (2004) 1818-1822.
- [29] Drummond D.C., Meyer O., Hong K., Kirpotin D.B., Papahadjopoulos D.: Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacological Reviews* 51 (1999) 691-743.
- [30] Papahadjopoulos D., Allen T.M., Gabizon A., Mayhew E., Matthey K., Huang S.K., et al.: Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(24) (1991) 11460-11464.
- [31] Molineux G.: Pegylation: engineering improved pharmaceuticals for enhanced therapy. *Cancer Treatment Reviews* 28 (2002) 13-6.
- [32] Bartosiewicz D., Kozubek A.: Liposomy w dermatologii i kosmetyce. *Lek w Polsce* 18(7) (2008) 85-92.
- [33] Lods M., Dres C., Johnson C., Scholz D.B., Brooks G.J.: The future of enzymes in cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science* 22 (2000) 85-94.
- [34] Isailović B., Djordjević V., Nedović V., Bugarski B.: Liposome-in-alginate systems for encapsulation of natural antioxidants. *Inside Food Symposium 2013 Leuven, Belgium*.
- [35] Tokudome Y., Uchida R., Yokote T., Todo H., Hada N., Kon T., Yasuda J., et al.: Effect of topically applied sphingomyelin-based liposomes on the ceramide level in the three dimensional cultured human skin model. *Journal of Liposome Research* 20 (2010) 49-54.
- [36] Park J.W., Benz C.C., Martin F.J.: Future directions of liposome- and immunoliposome-based cancer therapeutics. *Semin. Oncol.* 31 (2004) 196-205.
- [37] Allen T.M., Martin F.J.: Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines. *Semin. Oncol.* 31 (2004) 5-15.
- [38] Hwang K.J., Padki M.M., Chow D.D., Essien H.E., L Al J.Y., Beaumier P.L.: Uptake of small liposomes by non-reticuloendothelial tissues. *Biochimica et Biophysica Acta* 901 (1987) 88-96.
- [39] Gabizon A., Martin F.: Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumours. *Drugs* 54 (1997) 15-21.
- [40] Kik K., Lwow F., Szmigiero L.: Polimerowe i oligomerowe nośniki doksorubicyny. *Polimery w Medycynie* 37 (2007) 47-55.
- [41] Yi-Ting Ch., Chun-Liang L.: PH-Responsive polymer-liposomes for intracellular drug delivery and tumor extracellular matrix switched-on targeted cancer therapy. *Biomaterials* 35 (2014) 5414-5424.
- [42] Yuba E., Tajima N., Yoshizaki Y., Harada A., Hayashi H., Kono K.: Dextran derivative-based pH-sensitive liposomes for cancer immunotherapy. *Biomaterials* 35 (2014) 3091-3101.
- [43] Samoshina N.M., Liu X., Brazdova B., Franz A.H., Samoshin V.V., Guo X.: Filiposomes: pH-Sensitive Liposomes Containing a trans-2-morpholinocyclohexanol-Based Lipid That Performs a Conformational Flip and Triggers an Instant Cargo Release in Acidic Medium. *Pharmaceutics* 3 (2011) 379-405.
- [44] Han H.D., Byeon Y., Jeon H.N., Shin B.Ch.: Enhanced localization of anticancer drug in tumor tissue using polyethylenimine-conjugated cationic liposomes. *Nanoscale Research Letters* 9 (2014) 209.
- [45] Leeuw J., Vijlder H.C., Bjerring P., Neumann Ham.: Liposomes in dermatology today. *Jeadv* 23 (2009) 505-516.
- [46] Fartach M.: Epidermal barrier in disorders of the skin. *Microscopy Research and Technique* 38 (1997) 361-371.
- [47] Fartach M., Bassukas I.D., Diepgen T.L.: Disturbed extruding mechanism of lamellar bodies in dry non-eczematous skin of atopsics. *British Journal of Dermatology* 127 (1992) 221-227.
- [48] Honzak L., Sentjurs M.: Development of liposome encapsulated clindamycin for treatment of acne vulgaris. *Eur J Physiol* 400 (2000) 44-45.
- [49] Patel V.B., Misra A.N., Marfatia Y.S.: Topical liposomal gel of tretinoin for the treatment of acne: research and clinical implications. *Pharm Dev Technol* 5 (2000) 455-464.
- [50] Körbel J.N., Sebök B., Kerényi M., Mahrle G.: Enhancement of the anti-keratotic potency of calcitriol and tacalcitol in liposomal preparations in the mouse tail test. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14 (2001) 291-295.
- [51] Karolewicz B., Pluta J.: Nowe rozwiązania w technologii leków wziewnych. *Farm Pol*, 65(11) (2009) 812-820.
- [52] Muralidharan P., Mallory E., Malapit M., Hayes Jr. D., Mansour H.M.: Inhalable PEGylated Phospholipid Nanocarriers and PEGylated Therapeutics for Respiratory Delivery as Aerosolized Colloidal Dispersions and Dry Powder Inhalers. *Pharmaceutics* 6 (2014) 333-353.
- [53] Kamaly N., Miller A.D.: Paramagnetic Liposome Nanoparticles for Cellular and Tumour Imaging. *International Journal of Molecular Sciences* 11 (2010) 1759-1776.
- [54] Ait-Oudhia S., Mager D.E., Straubinger R.M.: Application of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Analysis to the Development of Liposomal Formulations for Oncology. *Pharmaceutics* 6 (2014) 137-174.
- [55] Zhou Z.: Liposome Formulation of Fullerene-Based Molecular Diagnostic and Therapeutic Agents. *Pharmaceutics* 5 (2013) 525-541.