

เอทโรโซมสำหรับระบบนำส่งยาทางผิวหนัง

ETHOSOMES FOR TRANSDERMAL DRUG DELIVERY SYSTEMS

บุญณดา ภูมิปฐมกุล และ ธนะเศรษฐ์ จ้าวศิริพัฒน์*

กลุ่มวิจัยและพัฒนานวัตกรรมสีเขียวทางเภสัชศาสตร์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม

*ติดต่อผู้พิมพ์ : ngawhirunpat_t@su.ac.th

BOONNADA PAMORNPATTHOMKUL AND TANASIT NGAWHIRUNPAT*

Pharmaceutical Development of Green Innovations Group (PDGIG),

Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University,
Sanamchandra Palace, Nakhon Pathom

*Corresponding Author: ngawhirunpat_t@su.ac.th

บทคัดย่อ

ระบบนำส่งยาทางผิวหนังเป็นระบบที่ใช้บริหารยาเข้าสู่ร่างกายหรือออกฤทธิ์เฉพาะที่บริเวณผิวหนัง แต่มีข้อจำกัดเกี่ยวกับการซึมผ่านของตัวยาเข้าสู่ผิวหนังโดยผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียมซึ่งส่งผลต่อชีวประสิทธิผลของตัวยาในการออกฤทธิ์รักษา ผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียมจึงเป็นปัญหาหลักที่ทำลายความสามารถในการนำส่งยาเข้าสู่ผิวหนัง มีการวิจัยหลากหลายวิธีเพื่อลดการขัดขวางของชั้นสตราตัมคอร์เนียม เช่น การใช้สารช่วยเพิ่มการซึมผ่านที่มีผลทางเคมีหรือทางกายภาพ มีรายงานการใช้ลิโพโซม นิโอโซม ทรานสเฟอร์โซม และเอทโรโซมในการเพิ่มการซึมผ่านของยาผ่านชั้นสตราตัมคอร์เนียม ปัจจุบันการใช้อนุภาคไขมันเพื่อนำส่งตัวยาผ่านผิวหนังกำลังได้รับความนิยม อย่างไรก็ตามการใช้ลิโพโซมแบบเดิมมีข้อจำกัดที่ไม่สามารถซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังชั้นลึกได้หรือผ่านได้ในปริมาณที่น้อย ไม่เพียงพอต่อการออกฤทธิ์รักษา ดังนั้นจึงมีการพัฒนาระบบเอทโรโซมขึ้นเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1997 โดย Touitou และคณะ เอทโรโซมเป็นระบบอนุภาคขนาดเล็กที่มีส่วนประกอบของฟอสโฟลิพิด น้ำ และเอทานอลในปริมาณสูง โครงสร้างของเอทโรโซมประกอบด้วยโมเลกุลของไขมันเรียงตัวซ้อนกันสองชั้นล้อมรอบด้วยชั้นน้ำ โดยชั้นในสุดเป็นชั้นน้ำที่มีส่วนผสมของเอทานอล เอทานอลในปริมาณที่สูงเป็นสารช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังส่งผลให้ตัวยาสามารถซึมผ่านเข้าไปในผิวหนังชั้นที่ลึกมากขึ้นได้ในช่วงไม่กี่ทศวรรษที่ผ่านมาเอทโรโซมได้รับความสนใจศึกษาเป็นอย่างมากเนื่องจากข้อดีต่าง ๆ อาทิเช่น การเพิ่มการซึมผ่านตัวยาในชั้นผิวหนังที่ลึกถึงชั้นหนังแท้ มีความสามารถในการกักเก็บปริมาณยาสูง และยังมีขนาดที่เล็กกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับระบบลิโพโซม นอกจากนี้ยังมีการนำเอทโรโซมไปประยุกต์ใช้เพื่อนำส่งยารักษาโรคผิวหนังต่าง ๆ เช่น โรคสะเก็ดเงิน โรคผื่นภูมิแพ้ผิวหนัง และโรคเชื้อราผิวหนัง เป็นต้น โดยในบทความนี้จะกล่าวถึงองค์ประกอบของเอทโรโซม กลไกการเพิ่มการซึมผ่านทางผิวหนัง วิธีการเตรียม การศึกษาคุณสมบัติของเอทโรโซม การศึกษาเปรียบเทียบระบบเอทโรโซมกับลิโพโซม รวมถึงการประยุกต์ใช้เอทโรโซมในแง่ของการนำส่งยาทางผิวหนัง

คำสำคัญ : เอทโรโซม, ลิโพโซม, ระบบนำส่งยาทางผิวหนัง, การซึมผ่านผิวหนัง

Abstract

Transdermal drug delivery system (TDDS) utilizes the skin as a route for drugs administration or localized delivery of drugs to the skin but the foremost barrier against drug permeability is the stratum corneum which therefore limits the therapeutic bioavailability of the drug. The skin function as a barrier, and the stratum corneum is a major challenge for the delivery of drugs via the skin. To overcome the stratum corneum barrier, various mechanisms have been investigated, including the use of chemical or physical enhancers. Liposomes, niosomes, transferosomes and ethosomes also have the potential to overcome the skin barrier and have been reported to enhance the permeability of drug through the stratum corneum barrier. The use of lipid vesicles in delivery systems for skin treatment has attracted increasing attention in recent years. However, it is generally agreed that classic liposomes are of little or no value as carriers for transdermal drug delivery because they do not penetrate deeply the skin, but rather remain confined to the upper layer of the stratum corneum, Therefore they were developed into ethosomes. Ethosomes were introduced for the first time by Touitou et al. in 1997. Ethosomal systems are small vesicular systems composed mainly of phospholipid, water, and high ethanol. The ethosome structure exhibits lipid bilayers, which enclose part of the surrounding water. The inner layer is a water-soluble compartment containing ethanol. As a penetration enhancer, a high concentration of ethanol can be used in the delivery of drugs into deep skin layers. In the last few decades, ethosomes have been intensively studied, because of the intrinsic advantages of ethosomes i.e. enhanced permeation of drug through deep skin for transdermal and dermal delivery, high drug entrapment efficiency, and smaller size compared to liposomes. In addition, applications of ethosomes have been reported to treatment various skin diseases such as psoriasis, squamous cell carcinoma, atopic dermatitis, and fungal skin infection. In this article, we described the structure of ethosomes the mechanism of ethosome penetration through the skin, methods of preparation ethosomes characterization of ethosomes, a comparative study of ethosomes with liposomes, and applications of ethosomes for drug delivery into the skin.

Keywords: ethosome, liposome, transdermal drug delivery system, skin permeation

บทนำ

ปัจจุบันนอกจากผลิตภัณฑ์รูปแบบทางการรับประทานที่ได้รับความนิยมแล้ว ยังมีรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่เข้ามามีบทบาทเพิ่มมากขึ้น และมีแนวโน้มได้รับความนิยมอย่างต่อเนื่อง คือ

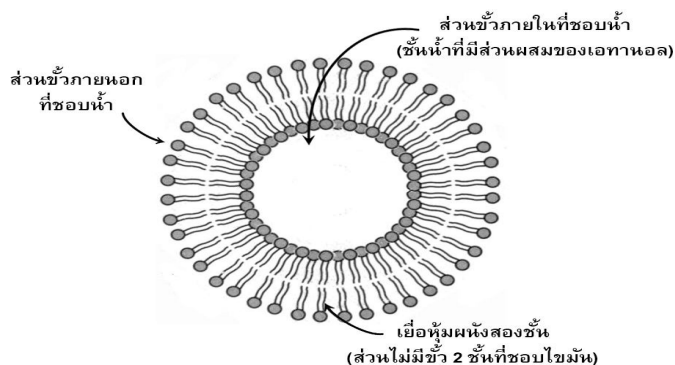
รูปแบบผลิตภัณฑ์ให้สารผ่านทางผิวหนัง เนื่องจากไม่เกิดปัญหาการดูดซึมลดลงจากผลของอาหารในทางเดินอาหาร รวมทั้งหลีกเลี่ยงการเกิด first-pass effect ที่ตับ ซึ่งจะช่วยลดการทำลายยาและส่งผลให้ยาออกฤทธิ์นานขึ้น

ส่งผลให้ลดปริมาณยาและ/หรือความถี่ในการบริหารยา นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มการยอมรับของผู้ป่วยอีกด้วย¹ ทั้งนี้ปัญหาสำคัญที่จำกัดการซึมผ่านของตัวยาเข้าสู่ชั้นผิวหนังที่ลึกหรือระบบไหลเวียนเลือดของร่างกาย คือ ผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม ซึ่งเป็นผิวหนังชั้นบนสุดประกอบไปด้วยเซลล์เคอราติโนไซต์ (keratinocytes) ซึ่งจะผลิตสารเคอราทิน (keratin) ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่ช่วยทำให้โครงสร้างผิวแข็งแรงและมีความยืดหยุ่นป้องกันสิ่งแปลกปลอมภายนอกไม่ให้เข้าสู่ร่างกายจึงขัดขวางการซึมผ่านของยาสู่ผิวหนังจึงเป็นสาเหตุสำคัญที่นักวิจัยต่างศึกษาค้นคว้าเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว³

เอทโซโซมคืออะไร

เอทโซโซม (Ethosomes) เป็นอนุภาคขนาดเล็กที่มีส่วนประกอบของฟอสโฟลิพิด (phospholipids) น้ำ และเอทานอลในปริมาณสูง (20-45%) ต่างจากลิโปโซมที่ไม่มีส่วนประกอบของเอทานอล มีการกล่าวถึงเอทโซโซมครั้งแรกในปี ค.ศ. 1997 โดย Touitou และคณะ² นักวิจัยทางเภสัชศาสตร์ชาวอิสราเอล เอทโซโซมได้รับการพัฒนามาจากลิโปโซม

เนื่องจากลิโปโซมมีข้อจำกัดที่ไม่สามารถนำส่งยาหรือสารเข้าสู่ผิวหนังในชั้นลึกได้ นักวิจัยจึงคิดค้นตัวพาที่สามารถนำส่งยาในชั้นผิวหนังที่ลึกขึ้น โดยเติมเอทานอลปริมาณสูงในการเตรียมลิโปโซม จึงเรียกว่าตัวพาดังกล่าว “เอทโซโซม”⁴ โครงสร้างของเอทโซโซมประกอบด้วยโมเลกุลของไขมันเรียงตัวซ้อนกันสองชั้นสลับกับชั้นน้ำ โดยมีส่วนหัวที่ละลายน้ำได้ดี และส่วนหางที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นฟอสโฟลิพิดจึงพยายามจัดเรียงตัวเพื่อซ่อนส่วนหางจากน้ำและหันส่วนหัวไปในด้านที่ต้องสัมผัสกับน้ำ เพื่อให้เกิดความเสถียรตามธรรมชาติ โดยชั้นในสุดเป็นชั้นน้ำที่มีส่วนผสมของเอทานอล ดังภาพ 1 การกักเก็บยาของเอทโซโซมอาศัยหลักการ “like dissolves like” คือ ตัวยาที่ชอบน้ำมันจะละลายในชั้นไขมัน ส่วนตัวยาที่ชอบน้ำจะละลายในชั้นน้ำ ส่งผลให้เพิ่มการนำส่งยาทั้งที่ชอบไขมันและน้ำได้ ส่วนเอทานอลที่มีปริมาณสูงขึ้นเป็นสารช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง (penetration enhancer) ส่งผลให้ตัวยาสามารถซึมผ่านเข้าไปในผิวหนังชั้นที่ลึกมากขึ้นได้^{4,5}



ภาพที่ 1 ลักษณะโครงสร้างเอทโซโซม⁶

เซลล์ต่าง ๆ ในร่างกายของมนุษย์มีเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อทำหน้าที่ปกป้องส่วนประกอบภายในเซลล์และเป็นทางผ่านเข้าออกของสารต่าง ๆ มีองค์ประกอบที่สำคัญ คือ โมเลกุลของไขมันฟอสโฟลิพิดจัดเรียงตัวเป็นสองชั้น (bilayer) คอเลสเตอรอล และโปรตีนที่แทรกอยู่ระหว่างชั้นไขมันฟอสโฟลิพิดซึ่งทำหน้าที่เปรียบเสมือนประตูทางเข้าออกของสารต่าง ๆ รวมทั้งรับสัญญาณระหว่างเซลล์ โดยทั้งลิพิดโชมและเอทโธโซมมีโครงสร้างคล้ายเยื่อหุ้มเซลล์ตามธรรมชาติของมนุษย์ที่ไม่มีโปรตีนประกอบอยู่ด้วย ดังนั้นเซลล์ของร่างกายจึงไม่ปฏิเสธตัวพาดังกล่าว เนื่องจากตัวพามีความคล้ายคลึงกับองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์มนุษย์ นอกจากนี้ตัวพาไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์จึงสามารถนำส่งยาทางผิวหนังด้วยการใช้ตัวพาได้อย่างเหมาะสม⁷ อย่างไรก็ตามเอทโธโซมมีข้อดีบางประการที่เหนือกว่าลิพิดโชม ได้แก่ ความสามารถของเอทโธโซมในการนำส่งตัวยาหรือสารเข้าสู่ผิวหนังได้รวดเร็วกว่า ปริมาณสูงกว่า และความลึกมากกว่าการนำส่งโดยใช้ลิพิดโชมแบบดั้งเดิม⁸⁻¹⁰

กลไกการซึมผ่านทางผิวหนังของเอทโธโซม

กลไกการซึมผ่านทางผิวหนังของเอทโธโซมยังไม่มีคำตอบชัดเจนแน่นอน แต่จากการศึกษาวิจัยต่าง ๆ สามารถสรุปกลไกการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของตัวยาหรือสารต่าง ๆ ได้ดังนี้

1. Ethanol effect

เกิดการแทรกตัวของเอทานอลในช่องว่างระหว่างเซลล์ของไขมัน โดยเอทานอลมีคุณสมบัติในการเป็นสารช่วยเพิ่มการซึมผ่านจากกลไกการเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวของไขมันและลดความหนาแน่นของชั้นไขมันของ

เยื่อหุ้มเซลล์ลง ทำให้ถุงเอทโธโซมสามารถซึมผ่านผิวหนังได้ง่ายขึ้น^{5,11}

2. Ethosome effect

กลไกนี้เกิดตามมาจากกลไก ethanol effect โดยเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวของไขมันทำให้เกิดช่องทางใหม่ เอทโธโซมซึ่งมีคุณสมบัติอ่อนนุ่มเนื่องจากมีส่วนประกอบของเอทานอลในปริมาณสูงและคุณสมบัติความมีขั้วส่งผลให้เอทโธโซมสามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างจึงแทรกตัวผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของผิวหนังที่มีขนาดเล็กกว่าขนาดอนุภาคของเอทโธโซมได้ ดังนั้นเอทโธโซมจึงแทรกผ่านช่องทางเปิดลงมา นอกจากนี้เอทานอลยังสามารถหลอมรวมตัวกับชั้นไขมันของผิวหนังทำให้เอทโธโซมสามารถซึมผ่านผิวหนังและปลดปล่อยตัวยาในชั้นผิวหนังที่ลึกได้ ดังภาพ 2^{5,11}

วิธีการเตรียมเอทโธโซม

การเตรียมเอทโธโซมสามารถเตรียมได้หลายวิธี แต่วิธีเตรียมที่ได้รับความนิยมมี 2 วิธี ได้แก่

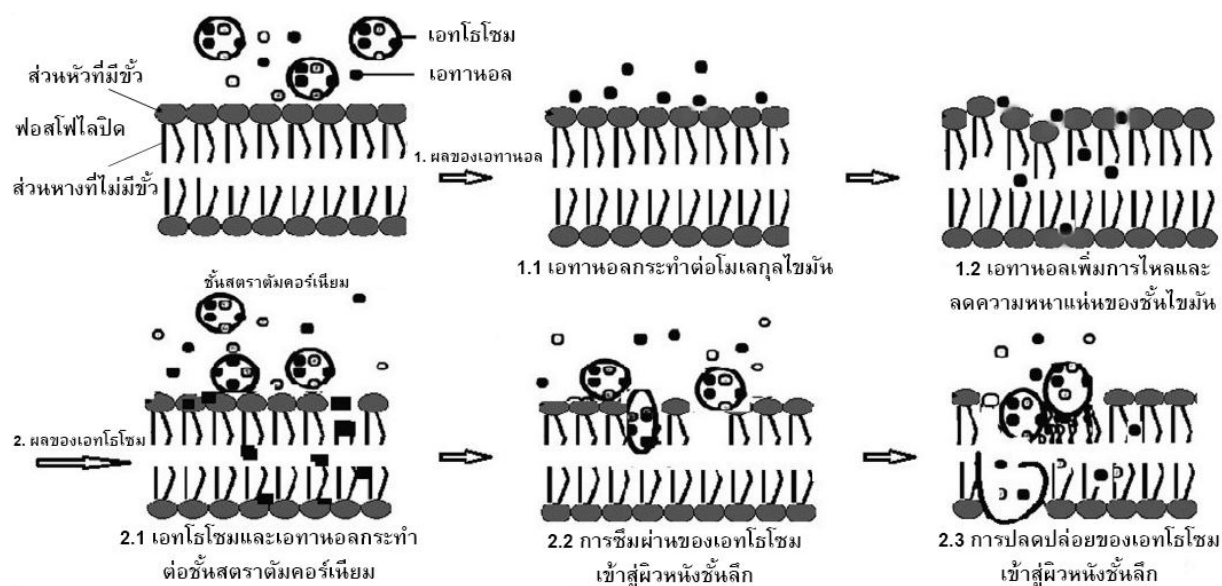
1. วิธีเตรียมโดยใช้ความเย็น (Cold Method)

วิธีนี้เป็นวิธีเตรียมที่ได้รับความนิยมและนำไปใช้เตรียมเอทโธโซมอย่างแพร่หลายสามารถเตรียมโดยละลายฟอสโฟลิพิด ยา และไขมันต่าง ๆ ในเอทานอลที่อุณหภูมิห้อง คนให้เข้ากัน เติมน้ำโพวิลีนไกลคอลขณะคนผสมให้ความร้อนสารผสมในอ่างน้ำร้อนจนสารผสมมีอุณหภูมิ 30°C ตั้งน้ำให้มีอุณหภูมิ 30°C ในภาชนะแยก เติมสารผสมลงในน้ำและคนผสม 5 นาที สามารถลดขนาดอนุภาคของเอทโธโซมได้โดยใช้กระบวนการ sonication หรือ extrusion หลังจากนั้นเก็บสารผสมที่ได้ในตู้เย็น^{11,12}

2. วิธีเตรียมโดยใช้ความร้อน (Hot Method)

สามารถเตรียมได้โดยกระจายฟอสโฟลิพิดในน้ำและแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 40°C จนกระทั่งได้เป็นคอลลอยด์ (เฟสน้ำ) ผสมเอทานอลและโพรพิลีนไกลคอลในภาชนะแยก ตั้งให้มีอุณหภูมิ 40°C (เฟสสารละลายอินทรีย์) เติม

เฟสสารละลายอินทรีย์ลงในเฟสน้ำ คนผสมให้เข้ากัน ละลายยาในน้ำหรือในเอทานอลขึ้นอยู่กับค่าการละลายของตัวยา ว่าละลายในสารละลายใดจึงเหมาะสม สามารถลดขนาดอนุภาคของเอทโรโซมได้โดยใช้กระบวนการ sonication หรือ extrusion^{11,12}



ภาพที่ 2 กลไกการซึมผ่านทางผิวหนังของเอทโรโซม¹¹

การศึกษาคุณสมบัติของเอทโรโซมสำหรับนำส่งยาทางผิวหนัง

ปัจจุบันมีการศึกษาคุณสมบัติของเอทโรโซมเพื่อการนำส่งยาทางผิวหนังอย่างแพร่หลาย โดยคุณสมบัติที่นักวิจัยให้ความสนใจและนิยมศึกษา ได้แก่

1. การศึกษาลักษณะภายในและภายนอกของอนุภาคเอทโรโซม (Visualization)

สามารถศึกษาได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งมี 2 ชนิด ได้แก่

1.1 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่งผ่าน (Transmission electron microscopy; TEM) ใช้ในการศึกษาโครงสร้างหรือรายละเอียดขององค์ประกอบภายในของอนุภาค โดยลำแสง

อิเล็กตรอนจะส่งผ่านอนุภาคหรือวัตถุตัวอย่างที่ศึกษา ซึ่งต้องมีลักษณะบางเป็นพิเศษทำให้ขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างที่ศึกษาก่อนข้างยุ่งยาก

1.2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy; SEM) ใช้ศึกษาลักษณะพื้นผิวของอนุภาคหรือผิวของตัวอย่างวัตถุที่นำมาศึกษา นอกจากนี้ยังสามารถศึกษาลักษณะรูปร่างภายนอกของวัตถุที่ศึกษาได้อีกด้วย โดยลำแสงอิเล็กตรอนจะส่องกราดไปบนผิวของวัตถุ ทำให้ได้ภาพซึ่งมีลักษณะเป็นภาพ 3 มิติ¹³

2. ขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโรโซม (Vesicle size, size distribution, and zeta potential)

ขนาดและการกระจายขนาดอนุภาคสามารถศึกษาได้โดยใช้เครื่องมือ Dynamic Light Scattering (DLS) ซึ่งเป็นเทคนิควัดการกระเจิงของแสง หรือที่เรียกว่า Photon correlation spectroscopy (PCS) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้วัดขนาดของสารตัวอย่างในระดับนาโนเมตรตั้งแต่ 0.005-5 ไมโครเมตร การเคลื่อนที่ของอนุภาคตลอดเวลาแบบบราวเนียนส่งผลกระทบต่อความเข้มของแสงที่กระเจิงจากอนุภาค อนุภาคขนาดใหญ่ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์การแพร่เคลื่อนที่ต่ำ (translational diffusion coefficient) ต่ำ จะเคลื่อนที่ช้ากว่าอนุภาคขนาดเล็ก หรืออาจกล่าวได้ว่าอนุภาคขนาดใหญ่เคลื่อนที่ช้า ทำให้เกิดการความถี่ในการกระเจิงขึ้น-ลงของแสงที่กระเจิงต่ำ และอนุภาคขนาดเล็กเคลื่อนที่ได้เร็ว มีความถี่ในการกระเจิงของแสงที่กระเจิงสูงกว่า ดังนั้น อัตราการเปลี่ยนแปลงของแสงที่กระเจิงจะช้ากว่าสัญญาณที่ได้จากการวัดความเข้มแสงในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ ของอนุภาคขนาดเล็กและความถี่ในการกระเจิงขึ้น-ลงของความเข้มแสงนี้จะถูกส่งไปยัง correlator โดยสารตัวอย่างต้องผ่านการเตรียมเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เจือจางอย่างเหมาะสม เนื่องจากมีผลต่อสัญญาณที่ได้ สำหรับค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคมีความสัมพันธ์กับประจุบนผิวของอนุภาค ซึ่งส่งผลต่อการตกตะกอนและการเกาะตัวกัน การศึกษาค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าอาศัยเทคนิคการวัดความเร็วในการเคลื่อนที่ของอนุภาคในของเหลวภายใต้สภาวะที่มีสนามไฟฟ้า โดยเมื่อ

ให้สนามไฟฟ้าเข้าไปในเซลล์ อนุภาคจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วตรงข้ามกับชนิดของประจุ โดยความเร็วในการเคลื่อนที่ของอนุภาคภายใต้สนามไฟฟ้า จะส่งผลต่อค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าที่วัดได้¹⁴

3. การศึกษาการกักเก็บยาหรือสารในอนุภาคเอทโรโซม (Entrapment measurement)

สามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้เทคนิคการหมุนเหวี่ยง (Ultracentrifugation) เพื่อเร่งอัตราการตกตะกอนของอนุภาคที่ไม่ละลายออกจากของเหลว หรือใช้แยกของเหลวหลาย ๆ ชนิดที่มีความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) ต่างกัน ออกจากกัน จากนั้นจึงวัดปริมาณยาทั้งในส่วนเหนือตะกอนและส่วนตะกอนเพื่อนำมาคำนวณหาปริมาณการกักเก็บยาต่อไป¹¹

4. การศึกษาปริมาณยาของอนุภาคเอทโรโซม (Drug content)

สามารถวิเคราะห์ปริมาณยาได้โดยใช้เครื่องมือ UV Spectrophotometer เป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารโดยใช้หลักการดูดกลืนแสงที่อยู่ในช่วงอัลตราไวโอเลต สารตัวอย่างจะดูดกลืนแสงบางส่วนไว้ แสงที่ไม่ถูกดูดกลืนจะผ่านออกมายังเครื่องวัดแสง (photomultiplier tube) ซึ่งจะทำการวัดปริมาณแสงที่ออกมา โดยการหักลบกับปริมาณของแสงก่อนดูดกลืน จากนั้นจึงทำการประมวลผลแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าความยาวคลื่นของสาร^{15,16}

5. การศึกษาแรงตึงผิวของตำรับเอทโรโซม (Surface tension measurement)

การวัดค่าแรงตึงผิวสามารถวัดได้จากอัตราส่วนของแรงที่กระทำต่อผิวของของเหลวต่อระยะทางของผิวของของเหลวที่ยืดออกเมื่อแรงกระทำ มีหน่วยเป็นแรงต่อระยะทาง มาตรฐาน

วัดแรงตึงผิว (Tensiometer) เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับวัดแรงตึงผิวมีหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น Du Nouy ring tensiometer, Du Nouy paddy tensiometer และ Wilhelmy Plate Tensiometer เป็นต้น^{15,17}

6. การศึกษาระดับยาหรือสารวาวแสงที่สามารถซึมผ่านเข้าไปในชั้นผิวหนัง (Skin permeation studies)

สามารถศึกษาได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล ชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน (Confocal laser scanning microscopy; CLSM) เป็นกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลที่ใช้สำหรับงานที่ต้องการภาพความละเอียดสูงและสามารถเลือกชั้นความลึกที่ต้องการเก็บภาพได้ตามความต้องการ ซึ่งคุณสมบัติหลักของกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน คือ มีความสามารถในการเก็บภาพเฉพาะบริเวณจุดโฟกัสโดยสามารถเลือกระดับความลึกได้ ซึ่งกระบวนการนี้เรียกว่า การตัดด้วยแสง (optical sectioning) การบันทึกภาพของกล้องชนิดนี้เป็นการเก็บสัญญาณแสงจากจุดโฟกัสที่ละจุด แล้วนำสัญญาณทั้งหมดมาสร้างเป็นภาพด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ ด้วยกระบวนการดังกล่าว ทำให้สามารถสร้างภาพ 3 มิติของวัตถุที่ซับซ้อนได้ ภาพที่ได้จะมีคุณภาพดีกว่าใช้กล้องทั่วไป เพราะภาพที่ได้จากระดับความลึกที่เราต้องการนั้นจะไม่ถูกซ้อนทับโดยภาพที่ระดับความลึกอื่น ในขณะที่ภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาจะเป็นภาพของแสงสะท้อนทั้งหมด จากทุกชั้นความลึกที่แสงสามารถทะลุผ่านลงไปได้^{11,18}

7. อุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะ (Transition temperature)

สามารถศึกษาได้โดยใช้เครื่องมือ Differential Scanning Calorimetry (DSC) เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ทดสอบวัสดุโดยการวัดค่าพลังงานความร้อนและอุณหภูมิของสารตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพหรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมี เช่น การหลอมเหลว การเปลี่ยนสถานะ เป็นต้น ตัวอย่างจะถูกวางบนจานอะลูมิเนียมที่อยู่ภายในเตาที่ควบคุมอุณหภูมิ โดยภายในเตาจะมีสารอ้างอิงซึ่งเป็นจานอะลูมิเนียมเปล่าเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับตัวอย่าง ภายใต้สภาวะเดียวกัน¹⁹

8. ความคงตัวของอนุภาค (Vesicular stability)

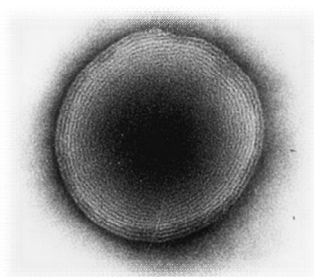
สามารถศึกษาได้โดยวัดขนาดของอนุภาคโดยใช้เครื่องมือ Dynamic Light Scattering (DLS) เมื่อเก็บตำรับไว้เป็นระยะเวลาสั้น ๆ หรือสภาวะเร่งต่าง ๆ จากนั้นจึงดูลักษณะภายในของอนุภาคเอทโรโซมอีกครั้ง ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่งผ่านเพื่อยืนยันผลความคงตัว¹¹

การศึกษาเปรียบเทียบเอทโรโซมกับลิโพโซมในการนำส่งยาทางผิวหนัง

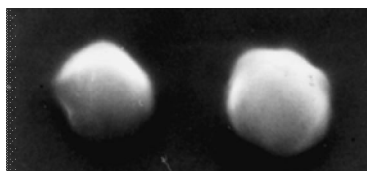
Touitou และคณะ¹² ได้เริ่มต้นศึกษาการใช้เอทานอลในปริมาณสูงเพื่อเตรียมเป็นเอทโรโซม เนื่องจากในอดีตเคยมีผู้ทดลองเติมเอทานอลในปริมาณต่ำแต่ไม่ประสบความสำเร็จด้วยคุณสมบัติของเอทานอลที่เป็นสารช่วยเพิ่มการซึมผ่าน จึงทำให้สามารถเพิ่มการซึมผ่านของสารผ่านผิวหนังได้เพิ่มขึ้น งานวิจัยชิ้นนี้ให้

ความสนใจศึกษาการทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ของระบบเอทโรโซม ได้แก่ การศึกษาลักษณะภายนอกและภายในของเอทโรโซม การศึกษาขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคเอทโรโซมเปรียบเทียบกับลิโพโซม การกักเก็บสารที่มีความเป็นขั้วต่าง ๆ กันในอนุภาคเอทโรโซมเปรียบเทียบกับลิโพโซม การเปลี่ยนแปลงสถานะอุณหภูมิ ความคงตัวของเอทโรโซม และความสามารถในการซึมผ่านของสารสัณฐานจำพวก Touitou และคณะ¹² ใช้เทคนิคการเตรียมเอทโรโซมแบบใช้ความเย็นดังที่ได้กล่าวมาแล้ว โดยละลาย Phospholipon® 90 กับสารวาวแสงในเอทานอล คนให้ละลายเข้ากัน เหนือที่เตรียมไว้ในอีกบีกเกอร์หนึ่งช้า ๆ ลงในสารผสม แล้วคนอย่างต่อเนื่อง เก็บเอทโรโซมที่ได้ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนการเตรียมลิโพโซม ใช้วิธี

mechanical dispersion เตรียมโดยละลาย Phospholipon® 90 กับสารวาวแสงในคลอโรฟอร์ม นำสารละลายที่ได้ไประเหยให้แห้งใน rotary evaporator จะได้เป็นชั้นฟิล์มของไขมันเกาะอยู่รอบฟลาสก์ จากนั้นนำไปเติมน้ำอีกครั้ง จะได้สารละลายของลิโพโซม สำหรับการศึกษาลักษณะภายในและภายนอกของถุงเอทโรโซม ศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่งผ่าน พบว่าอนุภาคเอทโรโซมประกอบด้วยผนังซ้อนกันหลายชั้นและแต่ละชั้นมีระยะห่างเท่า ๆ กัน ดังภาพที่ 3 ส่วนการศึกษาลักษณะภายนอกของเอทโรโซมสามารถศึกษาได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบลักษณะอนุภาคภายนอกของเอทโรโซมที่มีลักษณะเป็น 3 มิติ ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 3 ลักษณะโครงสร้างภายในของอนุภาคเอทโรโซม¹²



ภาพที่ 4 ลักษณะภายนอกของอนุภาคเอทโรโซม¹²

ต่อมาเป็นการศึกษาขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคเอทโรโซม โดยใช้เครื่องมือ Dynamic light scattering สำหรับเอทโรโซมพบว่ามีความหนาของอนุภาคที่เล็กกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดอนุภาคของลิโปโซม และเมื่อทำการศึกษาการกระจายขนาดอนุภาคของเอทโรโซม พบว่าเอทโรโซมมีการกระจายขนาดอนุภาคแคบ โดยเมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดคงที่และเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอทานอลที่ 20, 30, 40 และ 45% w/w พบว่าขนาดของอนุภาคลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอล ในขณะที่เมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นของเอทานอลคงที่ที่ 30 % และเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 4% w/w พบว่าขนาดของอนุภาคเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิด จากนั้นได้ทำการศึกษาศักยภาพในการกักเก็บยาของถุงอนุภาค โดยศึกษาจากความเข้มของสารวาวแสงที่มีความยาวคลื่นต่าง ๆ กัน ได้แก่ rhodamine red เป็นตัวแทนของยาที่ชอบไขมัน D-289 เป็นตัวแทนยาที่ชอบทั้งน้ำและไขมัน และ calceine เป็นตัวแทนของยาที่ชอบน้ำ ต่อการซึมผ่านผิวหนังเปรียบเทียบระหว่างอนุภาคเอทโรโซมกับลิโปโซม โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน พบว่าสำหรับสาร rhodamine red และ D-289 ในตำรับลิโปโซม สารวาวแสงไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปในส่วนแกนกลางอนุภาคได้ เข้าได้เพียงส่วนของชั้นไขมันรอบนอก แต่สำหรับอนุภาคเอทโรโซม สารวาวแสงทั้ง 2 ชนิด สามารถเข้าไปได้ทั้งในส่วนแกนกลางและชั้นไขมันรอบนอกของอนุภาค ส่วนสาร calceine ทั้งตำรับลิโปโซมและเอทโรโซม สารวาวแสงสามารถเข้าไปได้ทั้ง

ในส่วนแกนกลางและชั้นไขมันรอบนอกของอนุภาค นั้นแสดงว่าตำรับเอทโรโซมสามารถกักเก็บสารต้นแบบของยาได้ดีกว่าลิโปโซม

จากนั้นผู้วิจัยได้ทำการศึกษาสถานะการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิโดยใช้เครื่อง Differential scanning calorimeter พบว่าตำรับเอทโรโซมมีผลทำให้ชั้นไขมันมีการเปลี่ยนแปลงสภาพมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับลิโปโซม แสดงถึงชั้นไขมันเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ทำให้สารหรือตัวยาซึมผ่านได้ดีกว่าปกติ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความคงสภาพของตำรับเอทโรโซมจำนวน 3 รอบการผลิต ที่ระยะเวลา 1, 24, 30, 75, 105 และ 730 วัน พบว่าค่าเฉลี่ยและการกระจายขนาดของอนุภาคมีค่าคงที่ตลอด 2 ปี และเมื่อคุณลักษณะอนุภาคเพื่อยืนยันความคงตัวโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่งผ่าน พบว่าลักษณะอนุภาคไม่มีการเปลี่ยนแปลง จึงยืนยันได้ว่าอนุภาคยังคงมีความคงตัวตลอด 2 ปี สุดท้ายผู้วิจัยได้ศึกษาการซึมผ่านของสารวาวแสงที่ชอบไขมัน (rhodamine red) ผ่านผิวหนังที่มีความลึกต่าง ๆ เปรียบเทียบระหว่าง 3 สูตรตำรับ ได้แก่ ตำรับเอทโรโซม ประกอบด้วยฟอสโฟลิพิด 2% เอทานอล 30% และน้ำ ตำรับhydroalcoholic solution ประกอบด้วยเอทานอล 30% และน้ำ ตำรับลิโปโซม ประกอบด้วยฟอสโฟลิพิด 2% และน้ำ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลในการศึกษา ผลการศึกษาพบว่า ตำรับเอทโรโซมมีความเข้มของสารวาวแสง rhodamine red สูงกว่าตำรับhydroalcoholic solution และตำรับลิโปโซมอย่างมีนัยสำคัญ จากงานวิจัยได้แสดงให้เห็นว่าตำรับเอทโรโซมมีความสามารถในการเพิ่มการซึมผ่านของสารต้นแบบหรือตัวยาเข้าสู่ชั้น

ผิวหนังที่ลึกขึ้นได้ การศึกษาดังกล่าวเป็นตัวอย่างหนึ่งที่ช่วยยืนยันข้อดีของตำรับเอทโรโซมที่เหนือกว่าตำรับลิโพโซม ทั้งในด้านของขนาดอนุภาคที่เล็กกว่า ความสามารถในการกักเก็บยาที่ปริมาณสูงกว่า ส่งผลให้นำส่งสารต้นแบบได้ในผิวหนังชั้นที่ลึกมากกว่าและปริมาณสารสูงกว่าอีกด้วย

การประยุกต์ใช้เอทโรโซมสำหรับนำส่งยาทางผิวหนัง

1. การนำส่งยาสำหรับรักษาโรคสะเก็ดเงิน

โรคสะเก็ดเงินเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน แม้ไม่มีอันตรายถึงชีวิตแต่มีผลต่อสภาพทางสังคมและเศรษฐกิจของผู้ป่วย Fang และคณะ²⁰ ได้ทำการศึกษาผลของ 5-aminolevulinic acid (ALA) ในตำรับเอทโรโซมว่ามีประสิทธิภาพรักษาโรคสะเก็ดเงินในหนู โดย ALA เป็นยาที่ใช้รักษาโรคสะเก็ดเงินที่ได้รับการยอมรับ เนื่องจากไม่มีความเป็นพิษและการยอมรับการใช้ยาของผู้ป่วยดี แต่เนื่องจาก ALA มีความเป็นขี้สูง จึงมีข้อจำกัดในการซึมผ่านผิวหนัง Fang และคณะ²⁰ จึงทำการศึกษการซึมผ่าน ALA ผ่านผิวหนังเปรียบเทียบระหว่างตำรับเอทโรโซมที่มีตัวยา ALA กับกลุ่มควบคุมที่ประกอบด้วยสารละลาย ALA นอกจากนี้ยังศึกษาการฟื้นฟูสภาพของผิวหนังในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้ผิวหนังมีความผิดปกติคล้ายผิวหนังของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินเมื่อทำการศึกษาปริมาณของ ALA ที่สะสมในผิวหนังปกติและผิวหนังที่ถูกทำให้มีความผิดปกติ เปรียบเทียบกันระหว่างตำรับเอทโรโซมกับกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มควบคุมไม่มีผลเพิ่มการสะสมของยา ALA ทั้งในผิวหนังปกติและผิวหนังที่ผิดปกติ ในขณะที่

ตำรับเอทโรโซมมีผลเพิ่มการสะสมของยา ALA ทั้งในผิวหนังปกติและผิวหนังที่ผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าเอทโรโซมสามารถเพิ่มการสะสมของยาในผิวหนังที่ผิดปกติได้มากกว่าในผิวหนังปกติ ต่อมาผู้วิจัยทำการศึกษาความปลอดภัยของตำรับเอทโรโซม โดยดูจากการมีชีวิตอยู่ของเซลล์พบว่าตำรับเอทโรโซมไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงว่าตำรับเอทโรโซมมีความปลอดภัยต่อเซลล์ สุดท้ายผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาความสามารถในการฟื้นคืนสู่สภาพปกติของผิวหนังผิดปกติ โดยใช้ TNF- α เป็น indicator เนื่องจาก TNF- α และ cytokines ต่าง ๆ เป็นสาเหตุที่ทำให้ผิวหนังเกิดความผิดปกติหนาตัวขึ้นและเกิดการอักเสบ ดังนั้นหากระดับของ TNF- α ลดลงจะช่วยให้ผิวหนังฟื้นฟูลกลับสู่สภาพปกติได้ พบว่าตำรับเอทโรโซมมีระดับ TNF- α ลดลงถึง 20% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงถึงว่าเอทโรโซมสามารถทำให้ผิวหนังที่มีความผิดปกติสามารถฟื้นคืนสู่สภาพปกติได้ สรุปการศึกษาวิจัยครั้งนี้ทั้งในผิวหนังปกติและผิวหนังที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติพบว่าตำรับเอทโรโซมสามารถเพิ่มการซึมผ่านของ ALA และลดระดับของ TNF- α อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลาย ALA จึงสามารถพัฒนาตำรับต่อไปเพื่อรักษาโรคสะเก็ดเงินได้²¹

2. การนำส่งยาสำหรับรักษาโรคมะเร็งผิวหนัง

ปัจจุบันโรคมะเร็งเป็นโรคที่พบบ่อยทั่วโลก มีผลต่อชีวิตรวมถึงคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย การนำส่งตัวยาเข้าสู่ผิวหนังในปริมาณมากเพียงพอที่สามารถกำจัดเซลล์มะเร็งได้ จึงเป็น

สิ่งสำคัญ Paolino และคณะ²² ได้ศึกษาตำรับเอทโรโซมที่บรรจุตัวยา paclitaxel (Paclitaxel-loaded ethosomes[®]) เพื่อรักษา squamous cell carcinoma โดยใช้ human squamous cell carcinoma line ตัวยา paclitaxel เป็นยารักษามะเร็งในกลุ่ม taxanes ออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Paolino และคณะ²² ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์และการซึมผ่านของตัวยาในชั้นหนังแท้ที่ลึก พบว่าการทาตำรับ Paclitaxel-loaded ethosomes[®] บนผิวหนังสามารถเพิ่มการซึมผ่านของตัวยา paclitaxel ผ่านชั้นสตราตัมคอร์เนียมของผิวหนังมนุษย์ได้ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้อีกด้วย จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า ตำรับ Paclitaxel-loaded ethosomes[®] มีประสิทธิภาพในการรักษา squamous cell carcinoma ได้ โดยตำรับดังกล่าวได้รับการจดลิขสิทธิ์เป็นที่เรียบร้อยแล้ว

3. การนำส่งยาสำหรับรักษาโรคผื่นภูมิแพ้ผิวหนัง

โรคผื่นแพ้ผิวหนังเป็นโรคที่พบได้บ่อยมากติดอันดับ 1 ใน 10 ของโรคที่มีอุบัติการณ์บ่อยทั่วโลก พบว่าผู้ป่วยที่เป็นผื่นภูมิแพ้ผิวหนังมักกลับเป็นซ้ำบ่อย ๆ ดังนั้นการรักษาให้ผื่นหายโดยเร็วที่สุดจึงมีผลช่วยเพิ่มคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย Li และคณะ²³ ได้ทำการศึกษาคูณสมบัติของตำรับเอทโรโซมที่บรรจุตัวยา tacrolimus เพื่อรักษาโรคผื่นภูมิแพ้ผิวหนัง (atopic dermatitis) และศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดภูมิแพ้ในหนูเปรียบเทียบกับตำรับ tacrolimus ที่มีขายในท้องตลาด (Protopic[®]) ซึ่งมีปริมาณการซึมผ่านผิวหนังที่ต่ำ ผลการศึกษาพบว่าตำรับเอทโรโซม

แสดงขนาดอนุภาคที่เล็กกว่าและประสิทธิภาพในการกักเก็บยาที่สูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับตำรับลิโปโซม ส่วนปริมาณของ tacrolimus ในชั้นหนังกำพร้าภายหลังการให้ยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณสูงกว่าตำรับ Protopic[®] อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงถึงตำรับเอทโรโซมมีความสามารถซึมผ่านในชั้นผิวหนังที่ลึกได้ในปริมาณที่สูงกว่า ส่วนการทาตำรับเอทโรโซมที่บรรจุตัวยา tacrolimus ทางผิวหนังพบว่าสามารถลดการบวมของ BALB/c mice ได้มากที่สุด แสดงให้เห็นว่า ตำรับมีประสิทธิภาพในการกดปฏิกิริยาการเกิดภูมิแพ้ การศึกษานี้สรุปได้ว่า ระบบนำส่งเอทโรโซมที่บรรจุตัวยา tacrolimus เป็นตัวเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการนำส่งตัวยา tacrolimus เพื่อรักษาโรคผื่นภูมิแพ้ผิวหนัง

4. การนำส่งยาสำหรับรักษาโรคเชื้อราผิวหนัง

โรคเชื้อราผิวหนังมักใช้ระยะเวลาในการรักษาที่นาน และการใช้ยาโดยการรับประทานนั้น แม้จะมีประสิทธิภาพในการรักษา แต่ก็ยังมีผลทำให้ตับมีความผิดปกติได้มาก ดังนั้นการบริหารยาโดยการทาเข้าสู่ผิวหนังโดยตรง จะช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้ Maheshwari และคณะ²⁴ ได้ทำการประเมินและเปรียบเทียบตำรับเอทโรโซมและ ultradeformable liposomes (Transfersomes) ที่ประกอบด้วยตัวยา clotrimazole ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา โดย ultradeformable liposomes เป็นลิโปโซมที่ได้รับการพัฒนาเพื่อเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านผิวหนังโดยการเพิ่มสารลดแรงตึงผิวเป็นองค์ประกอบ เพื่อให้ผนังของอนุภาคมีความยืดหยุ่นมากยิ่งขึ้น สำหรับผลการศึกษาพบว่าตำรับเอทโรโซมมีความสามารถในการกักเก็บยาสูงกว่า ขนาดใหญ่กว่าเล็กน้อย และมีการกระจายขนาดต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับ

กับตำรับ ultradeformable liposomes และเมื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ โดยพิจารณาจาก zone of inhibition พบว่าตำรับเอทโรโซมสามารถยับยั้งเชื้อได้มากกว่าตำรับ ultradeformable liposomes และตำรับยาครีมต้านเชื้อราในท้องตลาด จากผลการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า ตำรับเอทโรโซมมีความเหมาะสมมากที่สุดในการนำมาใช้ต้านเชื้อราผิวหนัง เมื่อเปรียบเทียบกับตำรับลิโปโซมหรือรูปแบบยาครีม

สรุป

เอทโรโซมเป็นถุงอนุภาคไขมันชนิดหนึ่งที่ได้รับการพัฒนามาจากลิโปโซม โดยเติมเอทานอลในปริมาณสูง ด้วยคุณสมบัติของเอทานอลมีผลช่วยเพิ่มการซึมผ่านของสารหรือตัวยาในปริมาณที่สูงเพียงพอที่จะออกฤทธิ์ในการรักษาเข้าสู่ชั้นผิวหนังที่ลึกขึ้นถึงชั้นหนังแท้ ตำรับเอทโรโซมจึงเป็นระบบนำส่งยาทางเลือกระบบหนึ่งที่น่าสนใจและมีโอกาสพัฒนาเพื่อนำไปประยุกต์ใช้สำหรับนำส่งยาทางผิวหนังต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. อรัญญา มโนสร้อย. ลิโปโซมสำหรับยาผ่านทางผิวหนังและเครื่องสำอาง. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮ้าส์; 2550.
2. Touitou E, Alkabes M, Dayan N, Eliaz M. Ethosomes: novel vesicular carriers for enhanced skin delivery. *Pharm Res.* 1997;14:S305-6.
3. Naik A, Kalia YN, Guy RH. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *Pharm Sci Technol Today.* 2000;3(9):318-26.
4. Dayan N, Touitou E. Carriers for skin delivery of trihexyphenidyl HCl: ethosomes vs. liposomes. *Biomaterials.* 2000;21(18):1879-85.
5. Elsayed MM, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM. Deformable liposomes and ethosomes: Mechanism of enhanced skin delivery. *Int J Pharm.* 2006;322(1-2):60-6.
6. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry.* New York: W H Freeman and Company; 2012.
7. Godin B, Touitou E. Mechanism of bacitracin permeation enhancement through the skin and cellular membranes from an ethosomal carrier. *J Control Release.* 2004;94(2-3):365-79.
8. Asbill CS, El-Kattan AF, Michniak B. Enhancement of transdermal drug delivery: chemical and physical approaches. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2000;17(6):621-58.
9. Verma P, Pathak K. Therapeutic and cosmeceutical potential of ethosomes: An overview. *J Adv Pharm Technol Res.* 2010;1(3):274-82.
10. Touitou E, Godin B, Dayan N, Weiss C, Piliponsky A, Levi-Schaffer F. Intracellular delivery mediated by an ethosomal carrier. *Biomaterials.* 2001;22(22):3053-9.
11. Upadhyay N, Mandal S, Bhatia L, Shailesh S, Chauhan P. A Review on Ethosomes: An Emerging Approach for

- Drug Delivery through the Skin. RRS-Pharmaceutics. 2011;3(7):19-24.
12. Touitou E, Dayan N, Bergelson L, Godin B, Eliaz M. Ethosomes - novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *J Control Release*. 2000;65(3):403-18.
 13. Chescoe D, Goodhew PJ. The operation of transmission and scanning electron microscopes. New York: Oxford University Press; 1990.
 14. Washington C. Particle size analysis in pharmaceuticals and other industries: theory and practice. New York: Ellis Horwood; 1992.
 15. Jain H, Patel J, Joshi K, Patel P, Upadhyay UM. Ethosomes: a novel drug carrier. *Pharm Globale Int J Compr Pharm*. 2011;7(2):1-4.
 16. Clark BJ, Frost T, Russell MA. UV spectroscopy: techniques, instrumentation data handling. London: Chapman&Hall; 1993.
 17. Macosko CW. Rheology: principles, measurements, and applications. New York: VCH; 1994.
 18. Foscett JK, Grinstein S. Noninvasive techniques in cell biology. New York: Wiley-Liss; 1990.
 19. Bershtein VA, Egorov VM. Differential scanning calorimetry of polymers: physics, chemistry, analysis, technology. New York: Ellis Horwood; 1994.
 20. Fang YP, Huang YB, Wu PC, Tsai YH. Topical delivery of 5-aminolevulinic acid-encapsulated ethosomes in a hyperproliferative skin animal model using the CLSM technique to evaluate the penetration behavior. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009;73(3):391-8.
 21. Traub M, Marshall K. Psoriasis - pathophysiology, conventional, and alternative approaches to treatment. *Altern Med Rev*. 2007;12(4):319-30.
 22. Paolino D, Celia C, Trapasso E, Cilurzo F, Fresta M. Paclitaxel-loaded ethosomes[®]: potential treatment of squamous cell carcinoma, a malignant transformation of actinic keratoses. *Eur J Pharm Biopharm*. 2012;81(1):102-12.
 23. Li G, Fan Y, Fan C, Li X, Wang X, Li M, et al. Tacrolimus-loaded ethosomes: physicochemical characterization and in vivo evaluation. *Eur J Pharm Biopharm*. 2012;82(1):49-57.
 24. Maheshwari RG, Tekade RK, Sharma PA, Darwhekar G, Tyagi A, Patel RP, et al. Ethosomes and ultradeformable liposomes for transdermal delivery of clotrimazole: A comparative assessment. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2012;20(2):161-70.