Thesis Title Transfollicular Delivery Systems of Fatty Acids from Natural Sources Entrapped in Nanovesicles for Anti-hair Loss

Author Ms. Warintorn Ruksiriwanich

Degree Doctor of Philosophy (Pharmacy)

Thesis Advisory Committee
Prof. Dr. Aranya Manosroi — Advisor
Prof. Dr. Jiradej Manosroi — Co-advisor
Prof. Dr. Masahiko Abe — Co-advisor

ABSTRACT

This study aimed to develop transfollicular delivery systems for fatty acids from natural sources entrapped in nanovesicles for anti-hair loss. The bioactive compounds and biological activities (antioxidative, tyrosinase inhibition, cell proliferation activity on aged normal human skin fibroblasts) of the extracts from bran of *Oryza sativa* by the two extraction methods including ethanolic maceration and supercritical carbon dioxide fluid technique ($scCO_2$), were investigated. The crude extract prepared by $scCO_2$ gave lower yields, but higher unsaturated fatty acid and total phenolic contents than those from the ethanolic maceration. Moreover, the crude extract from both methods did not only show no significant difference of biological activities, but also gave no cytotoxicity to the aged human skin fibroblasts. The crude extracts from the three edible plants including *O. sativa*, *C. tinctorius* and *S. bicolor* prepared by the $scCO_2$ method which showed high unsaturated fatty acids contents and biological activities , were selected from ten edible plants to prepare the semi-purified fractions. Fraction No.3 of the *O. sativa* crude extract (OSF3) gave the highest content of unsaturated fatty acids, high biological activities and the highest 5α-reductase (type 1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

inhibition on DU-145 prostate cancer cell line. Blank neutral niosomes (Tween 61/Cholesterol at molar ratio 1:1) from chloroform film method and $scCO_2$ were developed and loaded with the bran of *O. sativa* crude extract as a model. The maximum loading of the extracts in niosomes from both methods was 0.25 % w/v. The physical characteristics including the vesicular size, morphology, phase transition temperature and the membrane microviscosity of the niosomes entrapped and not entrapped with the crude extracts prepared by $scCO_2$ technique were not significant different from those by the chloroform film method. The morphology of all niosomes were in unilamellar structure investigated by TEM with the average particle size of 60.34 ± 30.91 nm with the phase transition (gel-liquid) temperature at about 80°C. The $scCO_2$ method appeared to be a suitable alternative technique for the preparation of niosomes entrapped with the extract because of not only its environmental friendly, but also its less step requirement as well. Blank cationic niosomes with the composition at 20 mM of Tween61 mixed with cholesterol and cationic surfactants (CTAB, CPC, SA, BZKC, BZT and DDAB) at 1:1:0.05, 1:1:0.25 and 1:1:0.5 molar ratios were prepared by $scCO_2$ method. The best physical stability (size and zeta potential) and low toxicity on human skin fibroblast of the three blank niosomes including blank cationic niosomes [Tween 61/ cholesterol/ cationic surfactants (CTAB, BZKC) at 1:1:0.5 molar ratios] and the neutral blank niosomes (Tween 61/cholesterol at 1:1 molar ratio) were selected to investigate by loading with the OSF3. The CTAB niosomes at 1:1:0.5 molar ratio loaded with OSF3 were the best formulation when kept for 3 months at 4 ± 2, 27 ± 2 and 45 ± 2°C, respectively , since it gave the white dispersion with no layer separation or color change with the particle size of about 160 nm and the zeta potential values of about 55 mV after stored for 3 months. The OSF3 was loaded in CTAB cationic niosomes at 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0% (w/v). The niosomal sizes were slightly increased from 120 to 220 nm and the zeta potential value of the blank niosomes was decreased from 80 mV to the range of 40-60 mV after loaded with various concentrations of OSF3. Both FF-TEM and SAXS analysis of all niosomal formulations showed the uni-lamellar niosomes. The transitions temperature (Tc) of the niosomes significant increased from 75 to 80°C when loaded with 0.1 and 0.5% OSF3. Moreover, the blank cationic niosomes gave the highest microviscosity indicating the most rigid membrane at 25 °C and followed

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

by 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0% OSF3 niosomes, respectively. The gel incorporated with 2.0% OSF3 loaded in CTAB cationic niosomes (gel OSF3 niosomes) was developed. The gel OSF3 niosomes, OSF3 niosomes, gel OSF3 and OSF3 solution were investigated for physicochemical characteristics and transfollicular penetration through porcine skin using follicular closing technique by Franz diffusion cells. Gel OSF3 niosomes demonstrated physicochemical stability with the zeta potential values of -36.28 mV and the total unsaturated fatty acid contents of more than 84 % after stored at 25 °C for 3 months. Although the gel OSF3 niosome gave less transfollicular penetration of the unsaturated fatty acids into the receiver compartment than the OSF3 niosomes, it was a more convenient system for topical use because of the superior occlusion effect that will be beneficial for the saturation of the unsaturated fatty acids (the key bioactive compounds for 5α-reductase inhibition) in the skin with less risk of systemic effects than the OSF3 niosomes. Various formulations containing 2.0% (w/v) of OSF3 (OSF3 solution, OSF3 niosomes, gel OSF3 niosomes) were investigated for skin toxicity and *in vivo* hair growth promoting activity in C57BL/6 mice model. Gel OSF3 niosomes exhibited similar anagen induction to OSF3 niosomes in C57BL/6 mice. But, OSF3 niosomes showed slightly higher skin toxicity both *in vitro* on human skin fibroblasts and *in vivo* on rabbit skin. Gel OSF3 niosomes exhibited higher *in vivo* hair growth promotion activity with the hair growth score and the mean hair length at day 21st of sample application than the standard dutasteride of 1.50 and 1.92 times, respectively. Furthermore, from the histological analysis, all formulations containing OSF3 including gel OSF3 niosomes induced the hair follicle to differentiate from telogen to anagen phase. Therefore, this study has suggested that the gel containing 2.0% w/v OSF3 loaded in cationic niosomes (gel OSF3 niosomes) was the best formulation for transfollicular delivery systems of fatty acids from natural sources entrapped in nanovesicles for anti-hair loss because of its non-toxicity, high hair growth score, long hair length and producing anagen induction in hair follicles.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ระบบนำส่งผ่านรูขุมขนของกรดไขมันจากธรรมชาติที่เก็บกักในถุงขนาดนาโนเพื่อป้องกันผมร่วง

ผู้เขียน นางสาว วรินทร รักษ์ศิริวณิช

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ. ดร. อรัญญา มโนสร้อย	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ศ. ดร. จีรเดช มโนสร้อย	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ศ. ดร. มาซาฮิโกะ อาเบ้	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาระบบนำส่งผ่านรูขุมขนของกรดไขมันจากธรรมชาติที่เก็บกักในถุงขนาดนาโนเพื่อป้องกันผมร่วง โดยศึกษาเปรียบเทียบสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพ (ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนส และฤทธิ์กระตุ้นการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์) ของสารสกัดหยาบจากรำข้าว (*Oryza sativa*) ที่ได้จากการสกัด 2 วิธีคือ วิธีการหมักในเอธานอล และวิธีซุปเปอร์คริติคัลคาร์บอนไดออกไซด์ฟลูอิด พบว่า สารสกัดหยาบจากรำข้าวโดยวิธีซุปเปอร์คริติคัลคาร์บอนไดออกไซด์ฟลูอิด มีเปอร์เซ็นต์ผลผลิตน้อยกว่าแต่มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว และกรดฟีนอลิกมากกว่าสารสกัดจากวิธีการหมักในเอธานอล นอกจากนี้ สารสกัดหยาบจากรำข้าว จากทั้ง 2 วิธีมีฤทธิ์ทางชีวภาพ และความไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ได้เลือกสารสกัดหยาบจากรำข้าว (*O. sativa*) สารสกัดหยาบจากดอกคำฝอย (*Carthamus tinctorius*) และ สารสกัดหยาบจากข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) ที่เตรียมจากวิธีซุปเปอร์คริติคัลคาร์บอนไดออกไซด์ฟลูอิด ไปเตรียมสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ จากสารสกัดจากพืชทั้งหมด 10 ชนิดเนื่องจากมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว และมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง พบว่า สารสกัดกึ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บริสุทธิ์แฟรคชั่นที่ 3 จากสารสกัดหยาบจากรำข้าว (OSF3) มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงที่สุด ฤทธิ์ทางชีวภาพสูง และมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ 5-อัลฟ่า รีดักเตส (ชนิดที่ 1) สูงที่สุดในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (DU-145) นีโอโซมเปล่าที่เตรียมจากทวีน 61 คอเลสเตอรอล ในอัตราส่วนโมล่าร์ 1:1 จึงถูกเตรียมขึ้นเพื่อใช้เป็นแบบจำลอง ทดสอบการเก็บกักสารสกัดหยาบจากรำข้าว พบว่านีโอโซมเปล่าดังกล่าวสามารถเก็บกักสารสกัดหยาบจากรำข้าวได้มากที่สุด 0.25 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อเตรียมด้วยวิธีดั้งเดิมการระเหยแห้งคลอโรฟอร์มจนเป็นฟิล์ม และวิธีซุปเปอร์คริติคัลคาร์บอนไดออกไซด์ฟลูอิด พบว่าสมบัติทางกายภาพ (ขนาดอนุภาค ลักษณะของอนุภาค อุณหภูมิที่มีการเปลี่ยนแปลงวัฏภาค และ ค่าความยืดหยุ่นของผนังนีโอโซม) ของนีโอโซมที่เตรียมจากทั้งสองวิธี ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยนีโอโซมทุกสูตรมีผนังชั้นเดียว โดยมีขนาดประมาณ 60.34 ± 30.91 นาโนเมตร และมีอุณหภูมิที่มีการเปลี่ยนแปลงวัฏภาค ประมาณ 80 องศาเซลเซียส จึงเลือกวิธีซุปเปอร์คริติคัลคาร์บอนไดออกไซด์ฟลูอิด เพื่อใช้เตรียมนีโอโซมเปล่าประจุบวกจากทวีน61 คอเลสเตอรอล และ สารลดแรงตึงผิวประจุบวก (CTAB, CPC, SA, BZKC, BZT และ DDAB) ที่อัตราส่วนโมล่าร์ 1:1:0.05, 1:1:0.25 และ 1:1:0.5 พบว่า นีโอโซมเปล่าสูตรทวีน61 คอเลสเตอรอล และ สารลดแรงตึงผิวประจุบวก (CTAB และ BZKC) ที่อัตราส่วนโมล่าร์ 1:1:0.5 และนีโอโซมเปล่าจากทวีน61 คอเลสเตอรอล ที่อัตราส่วนโมล่าร์ 1:1 มีความคงตัวทางกายภาพ (ขนาดอนุภาค ค่าศักย์ซีต้า) ดีที่สุด และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ต่ำ จึงนำนีโอโซมทั้ง 3 สูตรมาเก็บกัก OSF3 และศึกษาความคงตัวที่ 4 ± 2, 27 ± 2 และ 45 ± 2 องศาเซลเซียส พบว่า นีโอโซมสูตรทวีน61 คอเลสเตอรอล และ สารลดแรงตึงผิวประจุบวกเซทิลไตรเมทิล แอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB) ที่อัตราส่วนโมล่าร์ 1:1:0.5 เก็บกัก OSF3 มีความคงตัวมากที่สุด โดยไม่มีการแยกชั้นหรือการเปลี่ยนแปลงสี และมีขนาดอนุภาคประมาณ 160 นาโนเมตร และค่าศักย์ซีต้าประมาณ 55 มิลลิโวลท์ เมื่อเก็บไว้ที่ 3 อุณหภูมิเป็นเวลา 3 เดือน จึงเก็บกัก OSF3 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0% โดยน้ำหนัก ต่อปริมาตร ในนีโอโซมสูตรดังกล่าว พบว่า ขนาดของอนุภาคนีโอโซมใหญ่ขึ้นจากประมาณ 120 เป็น 200 นาโนเมตร ค่าศักย์ซีต้าเพิ่มขึ้นจากประมาณ 80 เป็น 40-60 มิลลิโวลท์ เมื่อเก็บกัก OSF3 ในนีโอโซมเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม นีโอโซมที่เก็บกัก OSF3 ทุกสูตรตำรับ มีผนังชั้นเดียวเมื่อวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านโดยใช้สารตัวอย่างที่แช่แข็ง (FF-TEM) และเครื่องมือวัดการกระเจิงของรังสีเอ็กซ์มุมเล็ก(SAXS) และนีโอโซมที่เก็บกัก OSF3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่ 0.1 และ 0.5% มีอุณหภูมิที่มีการเปลี่ยนแปลงวัฏภาคเพิ่มขึ้นจากประมาณ 75 เป็น 80 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ที่ 25 องศาเซลเซียส นีโอโซมเปล่าประจุบวกมีความแข็งแรงของผนังนีโอโซมมากที่สุดรองลงมาคือ นีโอโซมประจุบวกที่เก็บกัก 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0% ตามลำดับ เจลที่มี OSF3 เก็บกักในนีโอโซมประจุบวก (CTAB) จึงถูกพัฒนาขึ้น และศึกษาความคงตัวและการซึมผ่านทางรูขุมขนในหนังหมู เปรียบเทียบกับ นีโอโซมที่เก็บกัก OSF3 เจลที่มี OSF3ที่ไม่ได้เก็บกัก และสารละลาย OSF3 พบว่า เจลที่มี OSF3 เก็บกักในนีโอโซมมีความคงตัวดี โดยมีค่าศักย์ซีต้าเท่ากับ -36.28 มิลลิโวลท์ และมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวเหลือในตำรับมากกว่า 84% หลังจากเก็บไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน แม้ว่า เจลที่มี OSF3 เก็บกักในนีโอโซมสามารถซึมผ่านทางรูขุมขนลงไปในส่วนรีซีฟเวอร์ได้น้อยกว่านีโอโซมที่เก็บกัก OSF3 แต่ เจลที่มี OSF3 เก็บกักในนีโอโซมสะดวกในการใช้ทางผิวหนัง และสามารถทำให้กรดไขมันไม่อิ่มตัว (สามารถยับยั้งเอนไซม์ 5-อัลฟ่า รีดักเตส ที่เป็นสาเหตุสำคัญของอาการผมร่วง) มีความเข้มข้นที่ผิวหนังมากขึ้น และลดความเป็นพิษจากการซึมเข้าไปในกระแสโลหิตได้ดีกว่านีโอโซมที่เก็บกัก OSF3 จากนั้นมีการศึกษาความเป็นพิษต่อผิวหนัง และฤทธิ์กระตุ้นผมงอกในหนูดำ C57BL/6 ของเจลที่มี OSF3 เก็บกักในนีโอโซม นีโอโซมที่เก็บกัก OSF3 และสารละลาย OSF3 พบว่า เจลที่มี OSF3 เก็บกักในนีโอโซมสามารถเหนี่ยวนำการเปลี่ยนวงจรการเจริญของเส้นขนให้อยู่ในระยะเจริญได้เหมือนกับนีโอโซมที่เก็บกัก OSF3 แต่นีโอโซมที่เก็บกัก OSF3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลอง และบนผิวหนังกระต่ายมากกว่ารูปแบบเจล นอกจากนี้ เจลที่มี OSF3 เก็บกักในนีโอโซมมีคะแนนการกระตุ้นให้ขนงอก และมีความยาวของเส้นขนมากกว่าสารมาตรฐานดูแทสเทอไรด์ ประมาณ 1.50 และ 1.92 เท่าตามลำดับ จากการศึกษาทางพยาธิสภาพของเซลล์ที่ผิวหนังของหนูดำ พบว่าทุกตำรับที่มีส่วนประกอบเป็น OSF3 สามารถเหนี่ยวนำให้รากขนที่อยู่ในระยะพักเปลี่ยนเป็นระยะเจริญได้ ดังนั้นเจลที่มี OSF3 เก็บกักในนีโอโซมเป็นสูตรที่ดีที่สุดเพื่อนำส่งกรดไขมันจากสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากรำข้าวที่เก็บกักในถุงขนาดนาโนผ่านรูขุมขนของเพื่อป้องกันผมร่วง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved