Streszczenie w języku polskim

Trądzik pospolity (*Acne vulgaris*) jest jedną z najczęstszych chorób skóry wieku młodzieńczego, dotykającą ponad 85% młodych osób. Skuteczność preparatów przeciwtrądzikowych w leczeniu miejscowym jest ograniczona m.in. z powodu narastającej antybiotykooporności oraz trudności w dostarczaniu substancji czynnych do jednostki włosowo-łojowej. Nowe, bezpieczne i odpowiednio skomponowane formulacje do stosowania miejscowego, mogą skutecznie wspomóc oczyszczanie gruczołów łojowych, zmniejszać ryzyko nawrotów choroby oraz wspierać równowagę mikrobioty.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie oraz kompleksowa ocena właściwości fizykochemicznych i aktywności przeciwdrobnoustrojowej wybranych antybiotyków tetracyklinowych w hydrożelowych układach dermatologicznych, zaprojektowanych z myślą o oddziaływaniu na modelowy łój skórny. Oceniono wpływ komponentów formulacji, takich jak alkoholoaminy i etanol na stabilność chlorowodorków tetracykliny i chlorotetracykliny – alternatywnych antybiotyków w miejscowej terapii trądziku pospolitego. Analizowano skuteczność przeciwdrobnoustrojową opracowanych hydrożeli wobec szczepów charakterystycznych dla mikrobioty skóry z trądzikiem. Zbadano interakcję składników formulacji z modelowym sebum w kontekście mechanizmu wspierającego leczenie dermatoz łojotokowych. Podjęto próbę wzbogacenia układów o substancję bioaktywną – diglicynian azeloilu potasu (azeloglicyna), w celu zwiększenia ich potencjału terapeutycznego poprzez komplementarne działanie przeciwtrądzikowe. Celem tych badań było pogłębienie wiedzy na temat wykorzystania tetracyklin w miejscowej terapii trądziku oraz stworzenie stabilnych, skutecznych i bezpiecznych preparatów dermatologicznych o wszechstronnym działaniu.

W pierwszej publikacji skupiono się na opracowaniu postaci leku do terapii miejscowej zapewniającej tetracyklinie odpowiednią stabilność. Trwałość związku oceniano metodą HPLC, porównując jej stabilność w roztworach wodnych i formulacjach hydrożelowych przechowywanych przez 63 dni w zmiennych warunkach środowiskowych. Najkorzystniejszy profil stabilności uzyskano w hydrożelu przechowywanym w niskiej temperaturze bez dostępu światła —stężenie leku pozostawało tam na poziomie zbliżonym do początkowego przez cały okres badań. W roztworach wodnych antybiotyk ulegał szybkiej degradacji i po dwóch miesiącach jego zawartość spadała poniżej 50% wartości wyjściowej. Zastosowanie anionowego polimeru zdecydowanie poprawiło stabilność tetracykliny. Wyniki badań potwierdziły, że degradację tetracykliny można skutecznie kontrolować

zarówno na etapie projektowania formulacji, jak i podczas jej przechowywania. Odpowiednie pH preparatu, zastosowanie opakowań chroniących przed światłem oraz przechowywanie w niskich temperaturach znacząco wydłuża trwałość antybiotyku zawartego w hydrożelu.

Celem badań przedstawionych w drugiej publikacji cyklu, była ocena wpływu etanolu na stabilność chemiczną tetracykliny oraz na właściwości fizykochemiczne opracowanych układów. Etanol, może wspomagać biodostępność substancji czynnych i ich penetrację w głąb skóry, w tym do mieszków włosowych, co jest istotne z punktu widzenia skuteczności leczenia zmian trądzikowych. Analiza HPLC wykazała, że formulacje bez etanolu, jak również te z jego zawartością do 25%, zachowały wysoką stabilność leku. W preparatach zawierających 50% etanolu zaobserwowano znaczną degradację tetracykliny oraz wzrost stężenia epimeru 4-ETC, co wskazuje na intensywną epimeryzację związku macierzystego w warunkach wysokiego stężenia etanolu. Analiza właściwości fizykochemicznych wykazała, że wysoka zawartość etanolu zauważalnie wpływała również na lepkość formulacji. Preparaty zawierające od 0% do 25% etanolu charakteryzowały się porównywalnymi właściwościami reologicznymi. W przypadku formulacji z 50% zawartością etanolu odnotowano znaczne obniżenie lepkości, co może wpływać negatywnie na komfort aplikacji. Wszystkie badane układy wykazywały wysoką aktywność w redukcji biofilmu *Cutibacterium acnes*, niezależnie od zawartości etanolu. Przeprowadzone badania wskazują, że formulacje zawierające do 25% etanolu stanowią kompromis pomiędzy poprawą penetracji a zachowaniem stabilności tetracykliny oraz odpowiednich właściwości reologicznych. Taki skład może zapewniać nie tylko skuteczność terapeutyczną, ale również bezpieczeństwo i wygodę stosowania preparatu dermatologicznego.

W ostatnich latach rośnie zainteresowanie składnikami aktywnymi wspomagającymi pielęgnację skóry trądzikowej. Jednym z nich jest diglicynian azeloilu potasu (azeloglicyna) — pochodna kwasu azelainowego o działaniu przeciwbakteryjnym, przeciwzapalnym i seboregulującym. Wprowadzono ją do opracowywanych formulacji jako składnik wspierający i uzupełniający działanie antybiotyków. Równolegle, rozszerzając zakres miejscowej antybiotykoterapii, do badań włączono chlorotetracyklinę wykorzystywaną w leczeniu miejscowym bakteryjnych ropnych zakażeń skóry. Wyniki tych badań zaprezentowano w trzeciej publikacji cyklu. Zakres przeprowadzonych badań obejmował analizę właściwości fizykochemicznych opracowanych hydrożeli, ze szczególnym uwzględnieniem stabilności antybiotyków w zmiennym pH. Dodatkowo oceniono zdolność preparatów do oczyszczania modelowego mieszka włosowego oraz ich aktywność wobec biofilmu *Staphylococcus aureus*, rozwijającego się m.in. na powierzchni modelowego sebum.

Tetracyklina charakteryzowała się wysoką trwałością, szczególnie w środowisku lekko kwasowym i obojętnym. Odmienny profil stabilności wykazała chlorotetracyklina, której stężenie obniżało się wyraźnie już w pierwszym dniu badania, zwłaszcza w zasadowym pH. Obecność azeloglicyny obniżała lepkość wszystkich wariantów formulacji a jej zastosowanie korzystnie wpłynęło na reakcję preparatów z sebum, sprzyjając tworzeniu głębszej warstwy produktów zmydlania. W modelu biofilmu na sztucznym sebum wykazano, że obecność azeloglicyny zwiększała zdolność hydrożeli do redukcji biofilmu *S. aureus*, czego nie obserwowano w prostych testach dyfuzyjnych. Wszystkie badane formulacje wykazały wysoką biozgodność w modelu *in vivo* wykorzystującym larwy *Galleria mellonella*. Ten wynik ma kluczowe znaczenie z perspektywy bezpieczeństwa potencjalnego zastosowania opracowanych żeli w leczeniu dermatologicznym, minimalizując ryzyko wystąpienia niepożądanych reakcji skórnych i stanowiąc solidną podstawę do dalszego rozwoju oraz wdrożenia tych formulacji w praktyce klinicznej. Analiza widm FTIR próbek po przygotowaniu oraz po 33 dniach przechowywania potwierdziła wysoką stabilność matrycy polimerowej, nie wykazując zmian w jej strukturze.

Przedstawione w ramach niniejszej rozprawy badania dowiodły, iż optymalizacja parametrów formulacyjnych, takich jak pH, dobór substancji pomocniczych a także warunki przechowywania, są kluczowe dla zapewnienia stabilności farmaceutycznej oraz skuteczności terapeutycznej antybiotyków w preparatach hydrożelowych. Obecność etanolu oraz diglicynianu azeloilu potasu w odpowiednio dobranych stężeniach, nie wpływała negatywnie na trwałość tetracykliny ani na właściwości fizykochemiczne układów hydrożelowych, jednocześnie zwiększając ich zdolność do oczyszczania modelu mieszka włosowego z sebum oraz wzmacniając aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec biofilmów *C. acnes* oraz *S. aureus*. Ocena bezpieczeństwa biologicznego, przeprowadzona na modelu larw *G. mellonella*, potwierdziła brak toksyczności formulacji a analizy strukturalne matrycy polimerowej wykazały ich wysoką stabilność oraz brak zauważalnych zmian w czasie przechowywania, co dodatkowo potwierdza trwałość fizykochemiczną układów.

Uzyskane wyniki stanowią solidną podstawę do kontynuacji prac badawczych, obejmujących szczegółowe analizy *in vitro* i *ex vivo* w zakresie przenikania substancji czynnych przez skórę, cytotoksyczności na ludzkich liniach komórkowych oraz oceny długoterminowej stabilności preparatów. Rozwój tych badań jest niezbędny dla dalszego doskonalenia i klinicznego wdrożenia opracowanych hydrożelowych formulacji dermatologicznych przeznaczonych do miejscowego leczenia trądziku pospolitego.

Streszczenie w języku angielskim

Acne vulgaris is one of the most common skin diseases during adolescence, affecting over 85% of young people. The efficacy of topical acne treatments is limited by increasing antibiotic resistance and difficulty delivering active ingredients to the hair and sebaceous unit. New topical preparations that are appropriately formulated and safe can effectively clear the sebaceous glands, reduce the risk of recurrence, and balance the microbiota.

This dissertation aimed to develop and comprehensively evaluate the physicochemical properties and antimicrobial activity of selected tetracycline antibiotics in dermatological hydrogel systems designed to interact with model skin sebum. The effect of formulation components, such as alcoholamines and ethanol, on the stability of tetracycline and chlortetracycline—alternative antibiotics used in the topical treatment of acne vulgaris—was assessed. The antimicrobial efficacy of the developed hydrogels against acne-specific strains of the skin microbiota was analyzed. Additionally, the interactions of formulation components with model sebum were investigated to support the treatment of seborrheic dermatoses. The systems were enriched with the bioactive substance potassium azeloyl diglycinate (azeloglycine) to increase their therapeutic potential through complementary anti-acne activity. This research aimed to expand knowledge of the use of tetracyclines in topical acne therapy and develop stable, effective, and safe dermatological formulations with comprehensive action.

The first publication focused on the development of a topical formulation of the drug that provides adequate stability of tetracycline. The stability of the compound was assessed by HPLC, comparing its stability in aqueous solutions and hydrogel formulations stored for 63 days under different environmental conditions. The most favourable stability profile was obtained in the hydrogel stored at low temperature without access to light - the drug concentration there remained close to the initial level throughout the study period. In aqueous solutions, the antibiotic degraded rapidly and after two months, its content fell below 50% of the initial value. The use of an anionic polymer definitely improved the stability of tetracycline. The results obtained confirmed that tetracycline degradation can be effectively controlled both at the formulation design stage and during storage. The appropriate pH of the formulation, the use of light-protective packaging and storage at low temperatures significantly extended the shelf life of the antibiotic contained in the hydrogel.

The second publication in the series aimed to evaluate the effect of ethanol on the chemical stability of tetracycline and the physicochemical properties of the developed

systems. Ethanol can increase the bioavailability and penetration of active substances into the skin and hair follicles, which is important for effectively treating acne lesions. HPLC analysis showed that formulations without ethanol, as well as those containing up to 25% ethanol, maintained high drug stability. However, in formulations containing 50% ethanol, significant tetracycline degradation and increased 4-ETC epimer concentration were observed, indicating intensive epimerization of the parent compound under high ethanol concentration conditions. Analysis of the physicochemical properties revealed that high ethanol content notably affects formulation viscosity. Formulations containing 0% to 25% ethanol exhibited similar rheological properties. Formulations with 50% ethanol showed significantly reduced viscosity, which could negatively impact application comfort. All tested systems exhibited high activity in reducing *Cutibacterium acnes* biofilms, regardless of the ethanol content. Studies indicate that formulations containing up to 25% ethanol represent a compromise between improving penetration and maintaining tetracycline stability and appropriate rheological properties. Such a formulation can ensure not only therapeutic efficacy, but also the safety and convenience of the dermatological preparation.

In recent years, there has been an increased interest in active ingredients to support acne skin care. One of these is potassium azeloyl diglycinate (azeloglycine), a derivative of azelaic acid with antibacterial, anti-inflammatory and seboregulatory effects. It has been included in formulations as a supportive and complementary ingredient to antibiotics. In parallel, extending topical antibiotic therapy, chlortetracycline, used in the topical treatment of bacterial purulent skin infections, was included in the study. The results of these studies are presented in the third publication in the series. The scope of the research carried out included an analysis of the physicochemical properties of the developed hydrogels, with a particular focus on the stability of the antibiotics at varying pH. In addition, the ability of the formulations to clear model hair follicles and their activity against the *Staphylococcus aureus* biofilm developing on the surface of model sebum, among others, were assessed.

Tetracycline showed high stability, especially in slightly acidic and neutral environments. Chlortetracycline showed a different stability profile, with its concentration decreasing markedly already on the first day of testing, especially at alkaline pH. The presence of azeloglycine reduced the viscosity of all formulation variants, and its use positively affected the reaction of formulations with sebum, promoting the formation of a deeper layer of saponification products. In the biofilm model on artificial sebum, it was shown that the presence of azeloglycine increased the ability of hydrogels to reduce *S. aureus* biofilm, which was not observed in simple diffusion tests. All tested formulations showed high

biocompatibility in an in vivo model using *Galleria mellonella* larvae. This result is crucial for the safety of the potential use of the developed gels in dermatological treatment, minimizing the risk of adverse skin reactions and providing a solid basis for further development and implementation of these formulations in clinical practice. FTIR spectra analysis of the samples after preparation and after 33 days of storage confirmed the high stability of the polymer matrix, showing no changes in its structure.

The studies presented in this dissertation proved that optimizing formulation parameters such as pH and excipient selection, as well as storage conditions, is crucial to ensuring the stability and efficacy of antibiotics in hydrogel formulations. The presence of ethanol and potassium azeloyl diglycinate at appropriate concentrations did not affect the stability of tetracycline or the physicochemical properties of the hydrogel systems. Instead, it enhanced their ability to clear sebum from the hair follicle model and strengthen antimicrobial activity against *C. acnes* and *S. aureus* biofilms. Biosafety evaluations carried out on *G. mellonella* larvae confirmed the formulations' lack of toxicity, and structural analyses of the polymer matrix showed the systems' high stability and lack of noticeable changes during storage, further confirming their physicochemical stability.

The results obtained provide a solid basis for further research, including detailed *in vitro* and *ex vivo* analyses of the permeation of active substances through the skin, the cytotoxicity of the formulations on human cell lines, and the evaluation of their long-term stability. These studies are essential for the further refinement and clinical implementation of hydrogel dermatological formulations for the topical treatment of acne vulgaris.