Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Radwan Joukhadar

RAZVOJ FUNKCIONALNIH NANOSTRUKTURIRANIH LIPIDNIH NOSAČA ZA DERMALNU PRIMJENU

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Radwan Joukhadar

RAZVOJ FUNKCIONALNIH NANOSTRUKTURIRANIH LIPIDNIH NOSAČA ZA DERMALNU PRIMJENU

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof.dr.sc. Mario Jug

Zagreb, 2026.

University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Radwan Joukhadar

DEVELOPMENT OF FUNCTIONAL NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS FOR DERMAL APPLICATION

DOCTORAL DISSERTATION

Mentor: Prof. Mario Jug, Ph.D.

Zagreb, 2026

Ovaj doktorski rad predan je na ocjenu Fakultetskom vijeću Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, pod mentorstvom prof. dr. sc. Maria Juga.

ZAHVALE

Ponajprije zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Mariu Jugu na stručnom vodstvu, strpljenju, razumijevanju i kontinuiranoj podršci tijekom izrade ovog doktorskog rada. Hvala mu na svim korisnim savjetima, poticajnim raspravama i spremnosti da uvijek odvoji vrijeme za pitanja, nedoumice i znanstvena razmišljanja koja su pratila ovaj istraživački put. Njegovo znanje, iskustvo i povjerenje bili su od velike važnosti za uspješan završetak ovog istraživanja.

Zahvaljujem svim kolegicama i kolegama sa Zavoda za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na pomoći, suradnji i ugodnom radnom okruženju. Posebno cijenim svaku stručnu raspravu, savjet i potporu koju su mi pružili tijekom eksperimentalnog rada i pisanja disertacije.

Posebnu i najdublju zahvalnost dugujem svojoj supruzi Ghadeer na bezuvjetnoj ljubavi, strpljenju, razumijevanju i svakodnevnoj podršci. Hvala ti što si bila uz mene tijekom cijelog ovog puta i što si svojim ohrabrenjem, vjerom i toplinom činila i najzahtjevnije trenutke lakšima. Tvoja snaga, mir i podrška bili su mi neprocjenjiv oslonac.

Najveću radost i posebnu snagu tijekom ovoga puta pružali su mi moji sinovi Zyad i Omar. Njihova prisutnost, osmijeh i vedrina bili su mi neprocjenjiv podsjetnik na ono što je u životu doista najvažnije. Hvala im na radosti, motivaciji i neizmjernoj ljubavi koju svakodnevno unose u moj život.

Posebno zahvaljujem i svojoj obitelji na ljubavi, razumijevanju, strpljenju i potpori tijekom svih godina studija i rada na disertaciji. Njihova vjera u mene bila mi je trajni oslonac i motivacija na putu prema ovom cilju. Bez njihove podrške ovaj bi put bio mnogo teži i zahtjevniji.

Na kraju, ovaj doktorat posvećujem svom pokojnom stricu, koji mi je bio uzor, oslonac i poput drugog oca. Njegova podrška, dobrota i vjera u mene ostavili su dubok trag u mom životu i pratili su me kroz ovaj put više nego što riječi mogu izraziti. Uspomena na njega bila mi je snaga i poticaj da ustrajem, a ovu disertaciju posvećujem mu s dubokim poštovanjem, zahvalnošću i trajnim sjećanjem.

SAŽETAK

Cilj ovog doktorskog rada bio je razviti te fizikalno-kemijski i biofarmaceutski vrednovati inovativni topikalni nanokompozitni hidrogel namijenjen obnovi i potpori funkcije oštećene epidermalne barijere kože. U tu svrhu su najprije pripravljeni nanostrukturirani lipidni nosači (NLC) temeljeni na pčelinjem vosku i arganovu ulju, uz dodatak ceramida NG i kolesterola kao fiziološki relevantnih lipidnih sastavnica epidermalne barijere. NLC disperzije proizvedene su metodom visokoturažnog homogeniziranja uz ultrasonikacije, a potom uklopljene u hidrogel formuliran primjenom natrijeva hijaluronata i ksantanske gume u različitim masenim omjerima. Probirom tenzida i prilagodbom procesnih parametara razvijen je NLC sustav srednjeg promjera 215,5 ± 0,9 nm, niske polidisperznosti (≈ 0,2) i izraženo negativnog zeta potencijala (-42,7 ± 0,9 mV). DSC i XRD analizama potvrđena je amorfna struktura ceramida i kolesterola, što pogoduje njihovoj dostupnosti za interakciju s lipidnim strukturama rožnatog sloja. NLC disperzija je mikrobiološki stabilna te pokazuje visoku stabilnost tijekom ubrzanih ispitivanja i ispitivanja u realnom vremenu.

Uklapanjem NLC-a u hidrogel pripremljeni su stabilni nanokompozitni hidrogelovi pseudoplastičnih i tiksotropnih svojstava, prikladni za topikalnu primjenu. In vitro ispitivanja biokompatibilnosti na HaCaT staničnom modelu pokazuju pozitivan učinak hidrogelnog matriksa na podnošljivost NLC-a. Utvrđen je i izražen okluzivni učinak hidrogelova s uklopljenim NLC-om, koji pridonosi smanjenju transepidermalnog gubitka vode i povećanoj hidrataciji kože. U *ex vivo* ispitivanjima na modelu svinjskog uha s prethodno narušenom epidermalnom barijerom primjena razvijenog nanokompozitnogh hidrogela rezultirala je 2,8 puta višom razinom hidratacije kože u odnosu na odgovarajući kontrolni hidrogel bez NLC-a, što upućuje na sinergijski doprinos hidrogelnog nosača i funkcionalnih lipidnih nanočestica održavanju hidratacijskog statusa kože.

Dobiveni rezultati pokazuju da je razvijeni nanokompozitni hidrogel stabilan i biokompatibilan sustav s izraženim potencijalom za primjenu u dermalnim i dermatokozmetičkim pripravcima namijenjenim njezi i obnovi kože s narušenom epidermalnom barijerom.

Ključne riječi: nanostrukturirani lipidni nosači, ceramidi, nanokompozitni hridrogelovi, natrijev hijaluronat, ksantanska guma, reološka karakterizacija, teksturna analiza, biokompatibilnost, hidratacija kože

SUMMARY

Introduction: The skin, particularly its outermost layer, the *stratum corneum*, serves as a vital physical and biochemical barrier that protects the human body from environmental hazards, pathogen invasion, and excessive transepidermal water loss. The structural integrity of the *stratum corneum* depends largely on its unique "brick-and-mortar" architecture, in which protein-rich corneocytes are embedded in a continuous intercellular lipid matrix. This lipid matrix comprises an equimolar mixture of ceramides, free fatty acids, and cholesterol, organised into tightly packed, highly ordered crystalline lamellar phases. Disruption or alteration of this delicate lipid composition and structural organisation is a hallmark of various dermatological disorders, including atopic dermatitis, psoriasis, contact dermatitis, and xerosis. These conditions are characterised by impaired barrier function, increased transepidermal water loss, severe dryness, inflammation, and heightened susceptibility to external irritants.

Conventional topical formulations, such as simple creams, ointments, and hydrogels, often fail to effectively restore the damaged epidermal barrier because they lack physiological lipid components or exhibit poor skin retention and limited bioavailability. To overcome these limitations, nanotechnology-based dermal delivery systems have emerged as a promising strategy. Nanostructured lipid carriers, considered second-generation lipid nanoparticles, were developed to overcome the limitations of solid lipid nanoparticles, such as drug expulsion during storage and low loading capacity. Nanostructured lipid carriers feature a spatially disordered, imperfectly crystalline lipid matrix formed by blending solid and liquid lipids. This unique nanostructure accommodates bioactive lipophilic active ingredients, prevents their expulsion during shelf-life storage, and provides enhanced occlusion and controlled release.

Incorporating bioactive lipids, specifically ceramide NG and cholesterol, into nanostructured lipid carriers at physiologically relevant ratios provides a biomimetic approach to actively replenish missing barrier components and promote structural repair of the *stratum corneum*. However, low-viscosity aqueous nanostructured lipid carrier dispersions are difficult to apply topically and tend to run off the application site. To ensure optimal skin contact, prolonged residence time, and patient compliance, nanostructured lipid carriers must be incorporated into a suitable semi-solid vehicle. Hydrogels based on natural biopolymers, such as sodium hyaluronate and xanthan gum, offer excellent biocompatibility, hydration, and tunable rheological properties.

The primary objective of this doctoral dissertation was to develop, optimize, and thoroughly characterize a topical nanocomposite hydrogel system containing functional nanostructured lipid carriers loaded with ceramide NG and cholesterol for active restoration and support of the damaged epidermal barrier.

Methods: Functional nanostructured lipid carriers were prepared using a high-energy high-speed homogenization followed by ultrasonication. The lipid phase consisted of natural solid and liquid lipids: beeswax as the solid lipid matrix, argan oil as the liquid lipid, α-tocopherol as an antioxidant, and pentylene glycol as a multifunctional constituent. Ceramide NG and cholesterol were incorporated into the lipid phase in a physiologically relevant molar ratio. To stabilize the nanoemulsion droplets, various surfactant systems were evaluated, with a combination of polysorbate 80 and glyceryl monostearate selected as the optimal emulsifying system. Mean particle size (z-average), polydispersity index, and zeta potential were determined via dynamic light scattering and electrophoretic light scattering. Particle concentration was measured to confirm formulation yield. Solid-state characteristics,, such as polymorph state and crystallinity of lipid components, were investigated using differential scanning calorimetry and powder X-ray diffraction.

Nanostructured lipid carrier dispersions were evaluated for physical stability using accelerated centrifugation tests designed to predict potential instability phenomena, such as phase separation, followed by real-time stability monitoring for 6 months under refrigerated (4 °C) and ambient (25 °C) storage conditions. The antimicrobial preservative efficacy of the nanostructured lipid carrier dispersion was evaluated in accordance with the European Pharmacopoeia guidelines.

Optimized nanostructured lipid carrier dispersions were incorporated into a hydrophilic hydrogel base formulated with varying concentrations of sodium hyaluronate and xanthan gum. Comprehensive rheological characterization was conducted using rotational and oscillatory rheological tests. Texture analysis by backwards extrusion was performed to measure hardness, consistency, cohesiveness, and adhesiveness. Furthermore, spreadability, an important sensorial property, was also evaluated using a spreadability rig. The pH values of the developed formulations were determined potentiometrically.

Biocompatibility and cytotoxicity were evaluated *in vitro* on a human keratinocyte cell line (HaCaT cells) using standard MTT cell viability assay. *In vitro* occlusion properties were assessed using a

standardized beaker-evaporation model over set time intervals to calculate the occlusion factor related to Vaseline, a well-known occlusive compound. The efficacy of the nanocomposite hydrogel in restoring damaged barrier function was evaluated *ex vivo* using a porcine ear skin model. Barrier damage was experimentally induced by treating the skin with sodium dodecyl sulphate solution. Formulations were applied to damaged skin sites, and skin hydration levels were quantified over time using a corneometer relative to untreated and control-treated groups.

Results: High-speed homogenization followed by ultrasonication yielded stable, submicron-sized nanostructured lipid carrier particles. The optimized nanostructured lipid carrier dispersion exhibited a mean particle diameter (z-average) of 215.5 ± 0.9 nm, a narrow monodisperse size distribution with a low polydispersity index of approximately 0.20, and a strongly negative zeta potential of −42.7 ± 0.9 mV. This high surface charge provided electrostatic repulsion sufficient to prevent particle aggregation and coalescence during storage. Increasing the homogenization speed during processing significantly influenced particle size, with higher energy input resulting in smaller particle diameters without compromising colloidal stability. Incorporating pentylene glycol into the lipid phase during processing produced smaller, more uniform particles than introducing it into the aqueous phase. Conversely, incorporating glycerol into the aqueous phase during nanostructured lipid carrier dispersion preparation adversely affected nanoparticle formation. Consequently, glycerol was added only after the dispersions had been prepared.

Thermal analysis by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction confirmed the formation of an imperfect crystalline nanostructured lipid carrier matrix. Beeswax, the primary solid lipid, retained its stable polymorphic modification, ensuring long-term matrix integrity. Crucially, ceramide NG and cholesterol, incorporated into the lipid matrix, were in an amorphous state, preventing lipid phase separation and expulsion during storage and enhancing their molecular availability for integration into the intercellular lipid bilayers of the *stratum corneum* following topical application.

The optimized nanostructured lipid carrier dispersion successfully met European Pharmacopoeia criteria for antimicrobial preservative efficacy, demonstrating adequate preservation of the formulation by the added pentylene glycol against bacterial and fungal challenge strains. Accelerated stress testing via centrifugation and six-month stability monitoring at 4 °C and 25 °C

revealed no significant changes in mean particle size, polydispersity index, or zeta potential, confirming robust physical stability.

Hydrogels formulated with sodium hyaluronate and xanthan gum exhibited non-Newtonian, shear-thinning (pseudoplastic) flow behavior and pronounced thixotropy, which are ideal characteristics for topical dermal administration. Xanthan gum served as the primary structural polymer governing viscoelasticity. Increasing xanthan gum concentration systematically elevated viscosity, storage modulus, loss modulus, hardness, consistency, and cohesiveness, indicating a denser, mechanically stronger polymer network. Simultaneously, the loss factor decreased, reflecting a more elastic, structured hydrogel network. Concentrations of 1.0% (w/w) xanthan gum and higher formed stable, elastic hydrogels, whereas 0.5% (w/w) yielded a borderline viscoelastic liquid/gel system.

Incorporation of the nanostructured lipid carrier dispersion into the hydrogel matrix further increased viscosity, storage modulus, loss modulus, hardness, and cohesiveness. These findings demonstrate that lipid nanoparticles do not merely act as carriers of bioactive lipids, but also function as active structural cross-linkers or fillers that reinforce the bydrogel network. Despite this increase in mechanical strength, the nanocomposite hydrogels maintained excellent thixotropic recovery, rapidly restoring their structure rapidly after shear stress ceased. They also displayed favorable spreadability and physiological pH values around 5.5, closely matching healthy skin surface pH.

In vitro biocompatibility studies performed on HaCaT keratinocytes demonstrated good tolerability of the individual excipients and hydrogel formulations. While the nanostructured lipid carrier dispersions induced a concentration-dependent reduction in cell viability at higher concentrations, substantially higher viability was observed after incorporation of the nanostructured lipid carriers into the hydrogel matrix. The improved biocompatibility of the nanocomposite hydrogels may be attributed to the reduced exposure of cells to the nanostructured lipid carriers and to the protective effect of the polymer network. Importantly, the observed cytotoxic effects of concentrated nanostructured lipid carrier dispersions should be interpreted with caution, considering that their constituent lipids have a well-established history of safe topical use and that HaCaT monolayer cultures do not fully reproduce the barrier properties of human skin. Therefore, the *in vitro* model employed may represent a conservative assessment of biocompatibility and potentially overestimate cellular exposure compared with physiological conditions in intact skin. In the *in vitro*

occlusion assay, nanocomposite hydrogels demonstrated significantly higher occlusion factors compared to control hydrogels lacking lipid nanoparticles. The dense film formed by nanostructured lipid carrier particles upon drying effectively hindered water evaporation, confirming strong film-forming and barrier-sealing properties.

On the *ex vivo* porcine ear skin model with SLS-compromised barrier function, topically applied nanocomposite hydrogel produced a statistically significant increase in skin hydration. The nanocomposite hydrogel achieved a 2.8-fold higher skin hydration level compared to the control hydrogel without lipid carriers. This marked increase in hydration demonstrates a synergistic effect between the hydrogel matrix (which provides immediate surface moisture) and the functional nanostructured lipid carriers (which deliver occlusive lipid film formation and active ceramide/cholesterol replenishment to repair lipid lamellae).

Conclusions: In conclusion, a novel topical nanocomposite hydrogel system incorporating ceramide NG- and cholesterol-loaded nanostructured lipid carriers was successfully developed and optimized using natural lipid components and high-energy preparation approach. The optimized nanostructured lipid carrier dispersion exhibited targeted nanometer-scale dimensions, a narrow size distribution, high negative zeta potential, and an imperfect crystalline matrix structure with active lipids preserved in a functionally desirable amorphous state. The formulation met European Pharmacopoeia antimicrobial preservation requirements and maintained long-term physical and colloidal stability under stress and standard storage conditions. Combining sodium hyaluronate and xanthan gum yielded hydrogel matrices with shear-thinning, thixotropic, and highly elastic rheological behavior, while the incorporation of nanostructured lipid carriers further reinforced the structural, viscoelastic, and textural properties without compromising optimal spreadability. Furthermore, the nanocomposite hydrogel appeared biocompatible toward HaCaT human keratinocytes, exhibited pronounced *in vitro* occlusive properties, and a remarkable 2.8-fold increase in skin hydration on barrier-damaged ex vivo skin. Overall, the developed nanocomposite hydrogel represents a safe, stable, and effective platform for topical therapy and restorative care of skin conditions associated with epidermal barrier dysfunction, laying a strong foundation for future clinical evaluation.

Keywords: nanostructured lipid carriers, ceramides, nanocomposite hydrogels, sodium hyaluronate, xanthan gum, rheological characterization, texture analysis, biocompatibility, skin hydration

POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

®	registrirani trgovački znak
™	trgovački znak
°	stupanj
°C	stupanj Celzija
2θ	Braggov kut difrakcije
AFM	mikroskopija atomskih sila
ATCC	American Type Culture Collection
ATR-FTIR	infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom uz prigušenu totalnu refleksiju
CFU	jedinice koje tvore kolonije
Cu Kα	karakteristično rendgensko zračenje bakra
DLS	dinamičko raspršenje svjetlosti
DMEM	Dulbeccov modificirani Eagleov medij
DSC	diferencijalna pretražna kalorimetrija
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
FBS	fetalni goveđi serum
FTIR	infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom
G’	modul pohrane
G’’	modul gubitka
HA	hijaluronska kiselina / natrijev hijaluronat
HaCaT	besmrtna humana stanična linija keratinocita
HBSS	Hanksova uravnotežena otopina soli

HLB	hidrofilno-lipofilni balans
LC-MS/MS	tekućinska kromatografija spregnuta s tandemskom spektrometrijom masa
MADLS	višekutno dinamičko raspršenje svjetlosti
MCR	modularni kompaktni reometar
NLC	nanostrukturirani lipidni nosači
NMF	prirodni faktor vlažnosti
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
PBS	fiziološka otopina puferirana fosfatom
PDI	indeks polidisperznosti
PEG	polietilen glikol
Ph. Eur.	Europska farmakopeja
PVA	polivinilni alkohol
RH	relativna vlažnost
SANS	raspršenje neutrona pod malim kutom
SAXS	raspršenje rendgenskih zraka pod malim kutom
SD	standardna devijacija
SEM	pretražna elektronska mikroskopija
SLN	čvrste lipidne nanočestice
TEM	transmisijska elektronska mikroskopija
TEWL	transepidermalni gubitak vode
XA	ksantanska guma
XRPD	rendgenska difrakcija praškastih uzoraka
Z-average	srednji hidrodinamički promjer

ξ	zeta potencijal
$\dot{\gamma}$	gradijent brzine smicanja
λ	valna duljina

SADRŽAJ

1. UVOD 16

1.1 EPIDERMALNA BARIJERA 2

1.2 LIPIDI KOŽE I NJIHOVA ULOGA U EPIDERMALNOJ BARIJERI 5

1.3 OBNAVLJANJE EPIDERMALNE BARIJERE 11

1.4 FARMACEUTSKI OBLICI LIJEKOVA BAZIRANI NA LIPIDIMA 13

1.4.1 Čvrste lipidne nanočestice i nanostrukturirani lipidni nosači 13

1.4.2 Sirovine za izradu SLN-a i NLC-a 16

1.4.3 Klasifikacija NLC-a 23

1.4.4 Tehnike za pripremu NLC-a 24

1.4.5 Karakterizacija NLC-a za dermalnu primjenu 27

2 OBRAZLOŽENJE TEME 35

3 MATERIJALI I METODE 39

3.1 MATERIJALI 40

3.2 PRIPREMA FUNKCIONALNIH NLC-OVA 42

3.3 FIZIKALNO-KEMIJSKA KARAKTERIZACIJA FUNKCIONALNIH NLC-OVA 43

3.3.1 Veličina čestica, indeks polidisperznosti, zeta potencijal i koncentracija NLC-a 43

3.3.2 Karakterizacija krutog stanja NLC-a 43

3.3.3 Ispitivanje fizičke stabilnosti NLC disperzija 44

3.4 ISPITIVANJE DJELOTVORNOSTI PROTUMIKROBNIH KONZERVANSA 45

3.5 IZRADA HIDROGELOVA S UKLOPLJENIM NLC-IMA 45

3.6 ISPITIVANJA REOLOŠKIH SVOJSTAVA HIDROGELOVA 46

3.6.1 Krivulja viskoznosti 46

3.6.2 3-intervalni test tiksotropije 46

3.6.3 Test promjene amplitude 47

3.6.4 Test promjene frekvencije 47

3.7 TEKSTURNA ANALIZA 47

3.8 MJERENJA pH VRIJEDNOSTI 50

3.9 ISPITIVANJE BIOKOMPATIBILNOSTI *IN VITRO* 50

3.9.1 Uvjeti uzgoja stanične kulture 50

3.9.2 In vitro ispitivanje biokompatibilnosti hidrogela s uklopljenim NLC *51*

3.10 ***IN VITRO ISPITIVANJE*** **OKLUZIVNOG UČINKA** 52

3.11 ***EX VIVO*** **TEST HIDRATACIJE KOŽE** 52

3.12 **STATISTIČKA OBRADA PODATAKA** 54

4 REZULTATI I RASPRAVA **55**

4.1 **PRIPREMA I OPTIMIZACIJA NLC DISPERZIJE** 56

4.2 **STRUKTURNA SVOJSTVA NLC-A** 68

4.3 **FIZIČKA STABILNOST OPTIMALNE NLC DISPERZIJE** 73

4.4 **PRIPREMA I FARMACEUTSKO-TEHNOLOŠKA KARAKTERIZACIJA HIDROGELOVA S UKLOPLJENIM NLC-OM** 75

4.5 **BIOFARMACEUTSKA KARAKTERIZACIJA NLC DISPERZIJA I PRIPREMLJENIH NLC HIDROGELOVA** 89

5 ZAKLJUČCI **100**

6. LITERATURA **105**

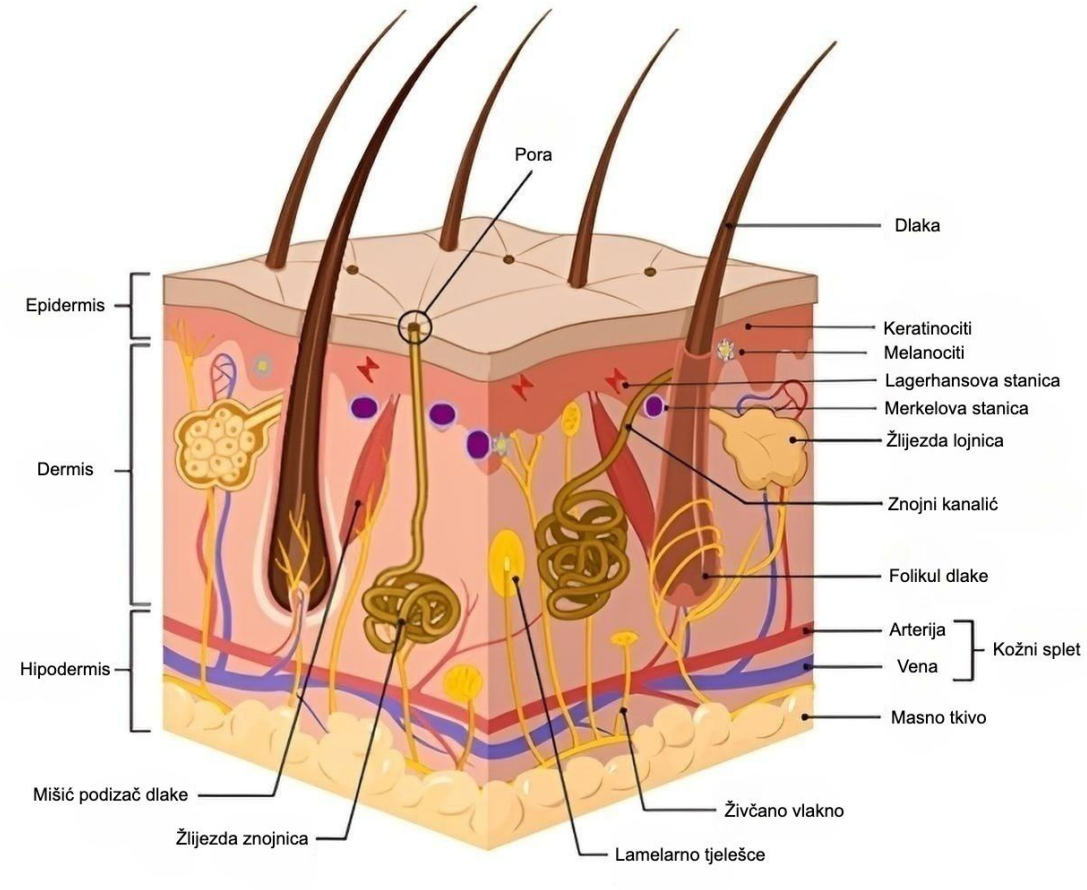
7. PRILOZI **122**

8. ŽIVOTOPIS **124**

1. UVOD

1.1 Epidermalna barijera

Koža, najveći organ ljudskog tijela, čini barijeru između organizma i okoliša koja osigurava zaštitu od negativnih vanjskih utjecaja, regulira tjelesnu temperaturu i omogućuje osjet dodira, boli, topline i hladnoće. To je složen epitelno-vezivni organ koji prekriva cijelu površinu tijela i ima ključnu ulogu u održavanju života, štiteći tijelo od gubitka tekućina, elektrolita i hranjivih tvari, pružajući mehaničku zaštitu te sprečavajući prodor mikroorganizama, štetnih tvari iz okoliša i UV zračenja (1,2). Koža je istodobno i imunološka barijera koja integrira urođenu i stečenu imunost. Pri tome, keratinociti uz Langerhansove i druge dendritičke stanice te tkivno-rezidentne T-limfocite sudjeluju u ranom prepoznavanju potencijalno štetnih podražaja te u pokretanju lokalnih obrambenih odgovora, uključujući stvaranje antimikrobnih čimbenika i regulaciju upale (3). Važan dio barijerne funkcije čini i kožna mikrobiota, koja pridonosi homeostazi, ograničava kolonizaciju patogenima te modulira lokalne imunološke odgovore. Poremećaj barijere i/ili sastava mikrobiote povezuje se s većom sklonošću razvoju upalnih kožnih bolesti (4).



Slika 1. Shematski prikaz građe kože (preuzeto i prilagođeno iz (5), uz suglasnost izdavača).

Koža je građena od tri sloja (Slika 1). Epidermis je najgornji sloj kože s otvorima izvodnih kanala ekrinih žlijezda znojnica, građen uglavnom od keratinocita uz melanocite i Langerhansove stanice. Ne sadrži krvne žile već slobodne živčane završetke i specijalizirane osjetne stanice (Merkelove stanice) te predstavlja glavnu zaštitnu barijeru kože. Ispod epidermisa je smješten dermis koji koži daje potporu i oblik, a sastoji se od vezivnog tkiva bogatog kolagenom i elastinom koje sintetiziraju fibroblasti. U njemu su smješteni privjesci kože (žlijezde lojnice, znojnice, mliječne žlijezde i dlake), bogato je prokrvljen, sadrži limfne žile, osigurava dostavu nutrijenata i vode u vijabilne slojeve epidermisa, te pridonosi termoregulaciji. Bazalna membrana predstavlja specijaliziranu izvanstaničnu strukturu koja strukturno i funkcionalno povezuje epidermis i dermis, osigurava mehaničku stabilnost kože te djeluje kao selektivna barijera u regulaciji razmjene tvari između tih slojeva, dopunjujući barijernu funkciju kože. Supkutis (hipodermis) ili potkožno masno tkivo, sadrži masne stanice (adipocite) koji služe kao zaliha energije, osiguravaju termoizolaciju i pružaju mehaničku zaštitu dubljih struktura (5,6).

Epidermis je građen od višeslojnog pločastog epitela i sastoji se pretežito od keratinocita, koji tijekom terminalne diferencijacije prolaze kroz četiri morfološki i funkcionalno različita sloja: temeljni sloj (*stratum basale*), trnasti sloj (*stratum spinosum*), zrnati sloj (*stratum granulosum*) i rožnati sloj (*stratum corneum*). Na mjestima gdje je epidermis najdeblji (npr. dlanovi i tabani), ispod rožnatog sloja prisutan je još i svijetli sloj (*stratum lucidum*). Upravo rožnati sloj predstavlja ključnu fizičku barijeru kože, odgovornu za sprječavanje transepidermalnog gubitka vode (engl. *Transepidermal Water Loss*, TEWL) i prodora egzogenih kemijskih tvari, alergena i mikroorganizama. Debljina rožnatog sloja iznosi približno 10–30 μm, a sastavljen je od 15–25 spljoštenih, anuklearnih korneocita koji su uklopljeni u visoko organizirani međustanični lipidni matriks (7).

Barijerna svojstva rožnatog sloja proizlaze iz njegove iznimno visoke gustoće (≈1,4 g/cm³), niskog stupnja hidratacije (15–20 % u usporedbi s otprilike 70 % u većini ostalih tkiva) te ograničene dostupne površine za difuziju tvari. Korneociti su građeni pretežito od netopljivog keratina (oko 70 % mase) i lipida (oko 20 %) te su okruženi orožnjelom ovojnicom (eng. *cornified envelope*), složenom proteinsko-lipidnom strukturom nastalom umrežavanjem strukturnih proteina poput involukrina, lorikrina i malih prolin-bogatih proteina, uz kovalentno vezane ceramide. Ova

ovojnica osigurava mehaničku otpornost stanica i dodatno ograničava permeabilnost rožnatog sloja (7,8).

Sastavni dio strukturne i funkcionalne organizacije korneocita čini filagrin, histidinom bogat protein koji se sintetizira u zrnatome sloju epidermisa u obliku velikog prekursora profilagrina, pohranjenog u keratohijalinskim zrncima. Proteolitičkom obradom profilagrina nastaju filagrinski monomeri koji se vežu na intermedijarne keratinske filamente (keratini 1 i 10), omogućujući njihovu agregaciju i kondenzaciju citoskeleta, što je ključno za spljoštavanje korneocita i mehaničku stabilnost rožnatog sloja. Kako diferencijacija keratinocita napreduje, filagrin se dalje razgrađuje u slobodne aminokiseline i njihove derivate, uključujući pirolidon karboksilnu kiselinu i urokaninsku kiselinu, koje zajedno čine glavne sastavnice prirodnog faktora vlažnosti (engl. *natural moisturizing factor*, NMF). Ovi niskomolekularni, vodotopljivi spojevi ključni su za vezanje vode u rožnatom sloju, regulaciju pH vrijednosti površine kože te posredno za aktivnost enzima uključenih u sazrijevanje lipidne barijere i kontrolu deskvamacije (1,8).

Međustanični prostor rožnatog sloja sadrži lamelarno organizirane lipide, koji predstavljaju jedini kontinuirani put prolaska tvari kroz epidermalnu barijeru. Lipidni matriks građen je od približno ekvimolarne smjese ceramida, slobodnih masnih kiselina i kolesterola, pri čemu ceramidi čine kvantitativno i funkcionalno najvažniju lipidnu komponentu. Ti su lipidi organizirani u višeslojne lipidne dvoslojeve s područjima polukristalinične gel faze i područjima tekućih kristala, što omogućuje visoku otpornost na difuziju vode i drugih polarnih molekula. Koheziju korneocita dodatno osiguravaju korneodezmosomi, specijalizirani međustanični spojevi čija regulirana razgradnja omogućuje fiziološku deskvamaciju (1,7).

Barijerna funkcija epidermisa nije ograničena isključivo na rožnati sloj. Živi slojevi epidermisa, osobito zrnati sloj, aktivno pridonose barijeri putem međustaničnih spojeva, uključujući čvrste spojeve (engl. *tight junctions*), adherentne spojeve i dezmosome, koji reguliraju paracelularnu propusnost i održavaju polaritet stanica. Tijekom diferencijacije, keratinociti u zrnatome sloju sintetiziraju prekursore barijernih lipida koji se pohranjuju u lamelarna tjelešca i izlučuju u međustanični prostor na granici zrnatog i rožnatog sloja, gdje se enzimskom preradom pretvaraju u zrele barijerne lipide (7,9).

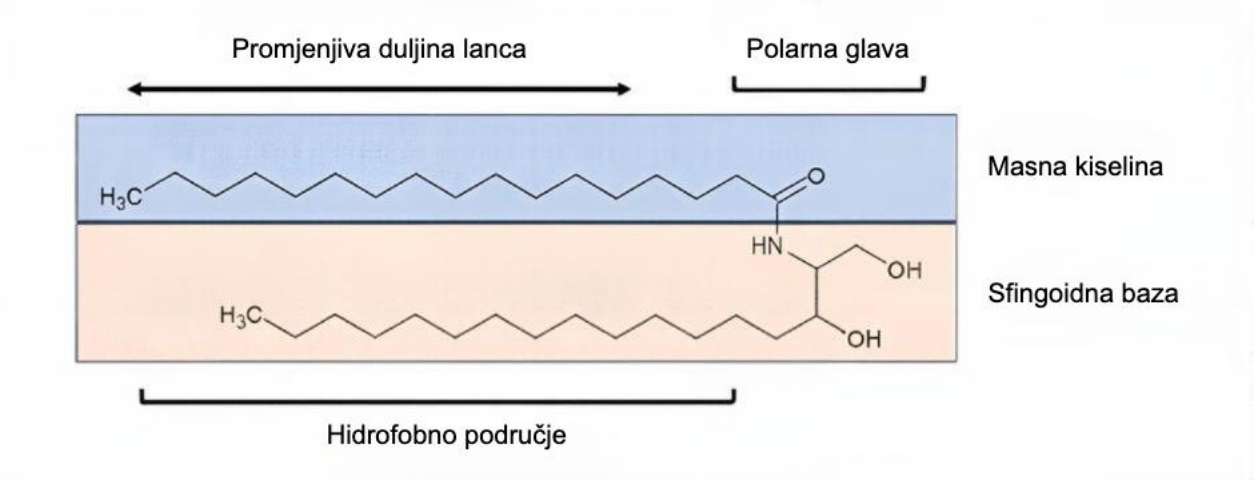
Kontinuirana ravnoteža između proliferacije, diferencijacije i deskvamacije omogućuje potpunu obnovu rožnatog sloja unutar približno 2–3 tjedna, čime se održava integritet epidermalne

barijere unatoč stalnoj izloženosti mehaničkim, kemijskim i mikrobnim stresorima. Poremećaji u strukturi ili organizaciji rožnatog sloja, lipidnom sastavu ili međustaničnim spojevima dovode do kompromitacije barijere, povećanog transepidermalnog gubitka vode i veće osjetljivosti kože na upalu i infekcije (1,7,10).

Kiseli zaštitni hidrolipidni film na površini kože (engl. *acid mantle*) nastaje kao rezultat koordiniranih metaboličkih i sekrecijskih procesa u epidermisu te ima ključnu ulogu u održavanju funkcionalnog integriteta kožne barijere. Snižavanje pH površine kože (≈4,5–5,5) ponajprije je posljedica razgradnje filagrina u slobodne aminokiseline i njihove derivate, uključujući pirolidon karboksilnu kiselinu i urokaninsku kiselinu, koji su sastavni dio prirodnog faktora. Dodatni doprinos kiselosti potječe od slobodnih masnih kiselina nastalih hidrolizom epidermalnih i sebacealnih lipida, kao i od mliječne kiseline iz znoja. Kiseli pH presudan je za optimalnu aktivnost enzima uključenih u metabolizam sfingolipida, osobito β-glukocerebrozidaze i kiselinske sfingomijelinaze, čime se osigurava pravilna sinteza ceramida i organizacija međustaničnog lipidnog matriksa. Istodobno, kiseli plašt inhibira proliferaciju patogenih mikroorganizama i modulira upalne procese, čineći ga integralnom komponentom kemijske i mikrobiološke barijere kože (10).

1.2 Lipidi kože i njihova uloga u epidermalnoj barijeri

Lipidi kože ključna su sastavnica epidermalne barijere, osobito u rožnatom sloju epidermisa, gdje čine visoko organizirani međustanični matriks odgovoran za sprječavanje transepidermalnog gubitka vode i prodora egzogenih tvari. Glavne skupine epidermalnih lipida čine ceramidi, slobodne masne kiseline i kolesterol, prisutni u približno ekvimolarnim omjerima, pri čemu ceramidi predstavljaju kvantitativno i funkcionalno najvažniju komponentu. Specifična lamelarna organizacija tih lipida odgovorna je za iznimno nisku permeabilnost rožnatog sloja u odnosu na ostala biološka tkiva (7,11).

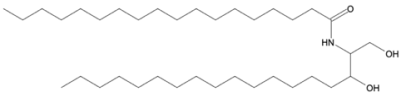
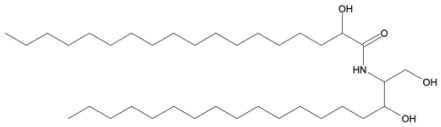
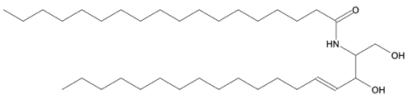
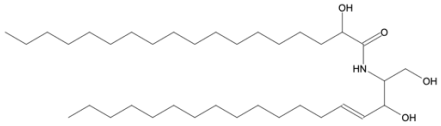
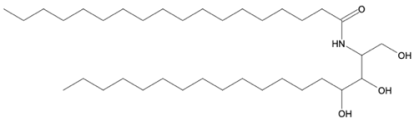
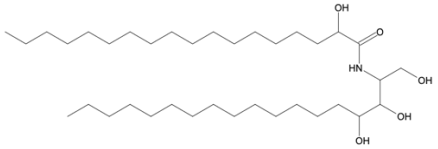
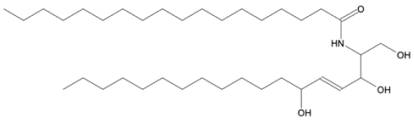
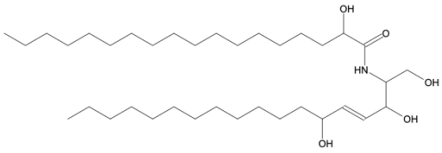
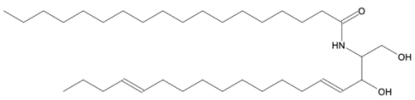
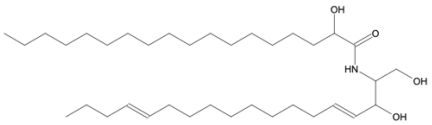
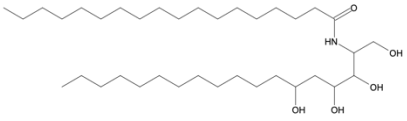


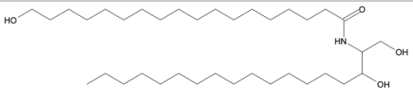
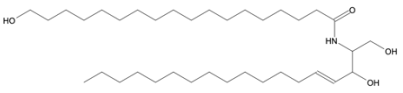
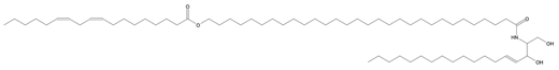
Slika 2. Struktura ceramida prisutnih u koži (preuzeto i prilagođeno prema (9), uz suglasnost izdavača).

Ceramidi su sfingolipidi građeni od dugolančane baze (sfingoidne baze) amidnom vezom povezane s masnom kiselinom (Slika 2). U epidermisu su prisutne specifične dugolančane sfingoidne baze, uključujući sfingozin, dihidrosfingozin, fitosfingozin i 6-hidroksisfingozin, u kombinaciji s masnim kiselinama različite duljine i stupnja hidroksilacije. Posebno obilježje epidermalnih ceramida jest prisutnost vrlo dugih lanaca masnih kiselina (C24–C34), često ω-hidroksiliranih i kovalentno vezanih na proteine rožnate ovojnice, čime nastaje lipidna ovojnica korneocita (engl. *corneocyte lipid envelope*). To je tanak, lipidni sloj koji se nalazi na vanjskoj površini rožnate ovojnice, tj. između korneocita i međustaničnog lipidnog matriksa, a pridonosi čvrstom pakiranju lipidnih slojeva te mehaničkoj stabilnosti i hidrofobnosti epidermalne barijere (9).

Epidermalni ceramidi klasificiraju se na temelju kombinacije tipa sfingoidne baze i vrste masne kiseline. U suvremenoj dermatološkoj literaturi najčešće se koristi nomenklatura koja razlikuje ceramide tipa NS, NP, AS, AP, EOS, EOP i srodne podvrste, pri čemu oznake upućuju na prisutnost nehidroksiliranih ili hidroksiliranih masnih kiselina te na esterificirane ω-hidroksiceramide (Tablica 1). Ljudski rožnati sloj sadrži više od deset različitih klasa ceramida, od kojih su esterificirani ω-hidroksiceramidi (npr. ceramid EOS) osobito važni za pravilnu formaciju lamelarnih lipidnih struktura. Raznolikost ceramida izravno doprinosi heterogenosti i funkcionalnoj prilagodljivosti epidermalne barijere (7,9,11).

Tablica 1. Klasifikacija i nomenklatura ceramida prisutnih u rožnatom sloju (prilagođeno prema (9), uz suglasnost izdavača)

	Ne-hidroksi masna kiselina [N]	α-hidroksi masna kiselina [A]
Dihidroksisfingozin [dS]	 [NdS]	 [AdS]
Sfingozin [S]	 [NS]	 [AS]
Fitosfingozin [P]	 [NP]	 [AP]
6-hidroksisfingozin [H]	 [NH]	 [AH]
4,14-sfingadien [SD]	 [NSD]	 [ASD]
Dihidroksi-dihidrosfingozin [T]	 [NT]	

	ω-hidroksi masna kiselina [O]	Esterificirana ω-hidroksi masna kiselina [EO]
Dihidrosfingozin [dS]	 [OdS]	 [EOdS]
Sfingozin [S]	 [OS]	 [EOS]

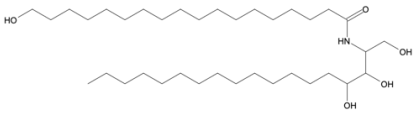


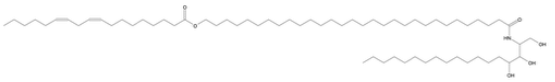
[EO – 18:1]



[EO – 18:2]

Fitosfingozin [P]

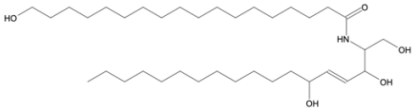


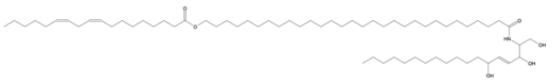


[EOP]

[OP]

6-hidroksisfingozin [H]

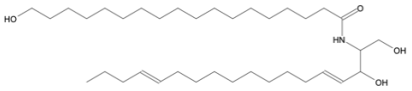


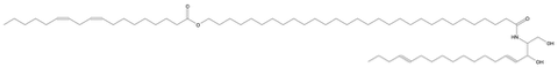


[EOH]

[OH]

4,14-sfingadien [SD]



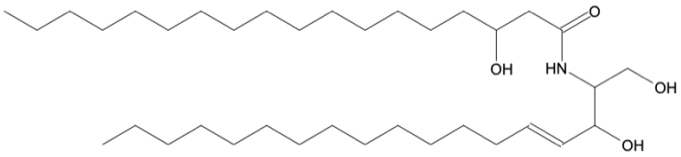


[EOSD]

[OSD]

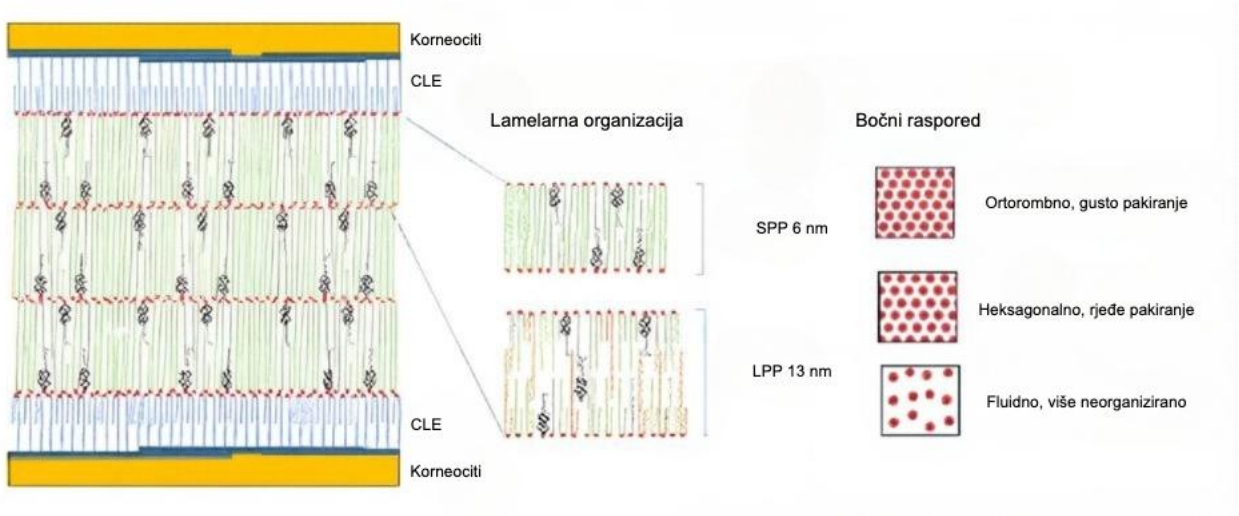
β-hidroksi masna kiselina [B]

Sfingozin [S]



Biosinteza epidermalnih ceramida odvija se u keratinocitima tijekom procesa njihove diferencijacije, ponajprije u zrnatome sloju epidermisa, i uključuje više međusobno povezanih metaboličkih puteva. Ceramidi se sintetiziraju *de novo* iz serina i palmitoil-CoA ili nastaju hidrolizom složenijih sfingolipida, poput glukozilceramida i sfingomijelina. U zrnatome sloju ceramidi i njihovi prekursori pohranjuju se u lamelarna tjelešca, koja se egzocitozom izlučuju u međustanični prostor na granici zrnatog i rožnatog sloja. Tamo se, djelovanjem specifičnih hidrolaza (β-glukocerebrozidaze i kiselinske sfingomijelinaze), prekursori pretvaraju u zrele ceramide koji se ugrađuju u lamelarne lipidne dvoslojeve. Kiselost površine kože od presudne je važnosti za optimalnu aktivnost tih enzima, čime se dodatno naglašava funkcionalna povezanost kiselog plašta i lipidne barijere (9,12).

Epidermalni lipidi organizirani su u višeslojne lamelarne strukture koje se prostiru paralelno s površinom kože (Slika 3). U tim strukturama izmjenjuju se područja polukristalinične gel-faze i tekuće kristalne faze, čime se postiže optimalna kombinacija čvrstoće i fleksibilnosti barijere. Ceramidi, zahvaljujući svojoj linearnoj strukturi i dugim ugljikovodičnim lancima, ključni su za stabilizaciju lamelarnih faza i ograničavanje lateralne difuzije molekula. Svako odstupanje u omjerima ceramida, masnih kiselina i kolesterola dovodi do poremećene lipidne organizacije i povećane permeabilnosti rožnatog sloja (7,9).



Slika 3. Organizacija lipida u izvanstaničnom cementu rožnatog sloja (preuzeto i prilagođeno iz (9), uz suglasnost izdavača).

Kolesterol prisutan u rožnatom sloju epidermisa potječe iz dvaju glavnih izvora: lokalne sinteze u epidermalnim keratinocitima i dopreme iz dermalne cirkulacije, pri čemu lokalna sinteza ima ključnu ulogu u formiranju funkcionalne barijere. Tijekom terminalne diferencijacije keratinocita kolesterol se, zajedno s ostalim barijernim lipidima, pakira u lamelarna tjelešca i izlučuje u međustanični prostor na granici zrnatog i rožnatog sloja epidermisa, gdje postaje sastavni dio izvanstaničnog lipidnog matriksa. U rožnatom sloju kolesterol je gotovo isključivo prisutan u slobodnom, neesterificiranom obliku, što ga bitno razlikuje od kolesterola u drugim kožnim slojevima i perifernim tkivima, gdje su esterificirani oblici znatno zastupljeniji. Slobodni kolesterol funkcionalno je relevantan za barijernu ulogu epidermisa jer njegova rigidna steroidna struktura omogućuje učinkovitu interkalaciju između dugolančanih ceramida i slobodnih masnih kiselina (Slika 3). Esterificirani kolesterol, iako metabolički važan u drugim kontekstima, nije pogodan za

izgradnju čvrstih lamelarnih struktura te se stoga tijekom diferencijacije ne zadržava u rožnatom sloju (1,11).

Funkcionalno, kolesterol ima ključnu ulogu u regulaciji lateralne organizacije lipidnih dvoslojeva međustaničnog matriksa. Njegova prisutnost omogućuje optimalnu ravnotežu između uređenih gel-faza i manje uređenih domena lipidnih lamela, čime se osigurava visoka otpornost barijere na difuziju vode uz očuvanu fleksibilnost strukture. Narušavanje ravnoteže kolesterola u odnosu na ceramide i slobodne masne kiseline, bilo smanjenjem ili relativnim viškom, rezultira dezorganizacijom lipidnih lamela, povećanim transepidermalnim gubitkom vode i funkcionalnim oštećenjem epidermalne barijere. Stoga se kolesterol u rožnatom sloju ne može promatrati izolirano, već isključivo kao dio strogo reguliranog trokomponentnog lipidnog sustava nužnog za barijernu funkciju kože (11).

Slobodne masne kiseline treća su velika skupina lipida rožnatog sloja te, uz ceramide i kolesterol, čine temelj međustaničnog lipidnog matriksa. U epidermalnoj barijeri prisutne su pretežito zasićene i mononezasićene masne kiseline vrlo dugih lanaca (najčešće C12–C26), koje se značajno razlikuju od masnih kiselina prisutnih u fosfolipidima staničnih membrana. Njihova glavna uloga je strukturna pri čemu dugi i linearni ugljikovodični lanci omogućuju gusto pakiranje lamela i smanjenje slobodnog prostora za difuziju vode i polarnih molekula. Nastaju hidrolizom složenijih epidermalnih lipida, uključujući trigliceride i fosfolipide, tijekom kasnih faza diferencijacije keratinocita i sazrijevanja lipidne barijere. Uz strukturnu ulogu, slobodne masne kiseline značajno pridonose kiselosti površine kože, čime sudjeluju u stvaranju i održavanju kiselog plašta. Sniženi pH rožnatog sloja ključan je za optimalnu aktivnost enzima uključenih u metabolizam ceramida i regulaciju deskvamacije, što dodatno naglašava funkcionalnu povezanost masnih kiselina s ostalim komponentama lipidne barijere, potvrđujući da slobodne masne kiseline nisu pasivne komponente epidermalne barijere, već aktivni regulator njezine strukture, funkcije i biokemijske stabilnosti (1,10,11).

Brojna patološka stanja kože povezana su s kvantitativnim i kvalitativnim promjenama u lipidnom sastavu epidermisa. U atopijskom dermatitisu bilježi se smanjen ukupni sadržaj ceramida, osobito esterificiranih ω-hidroksiceramida, uz skraćenje duljine lanaca masnih kiselina, što dovodi do slabije organizacije lipidnih lamela i povećanog transepidermalnog gubitka vode. U psorijazi je prisutan disbalans u sintezi ceramida i ubrzana epidermalna diferencijacija, koja onemogućuje

pravilnu organizaciju lipidnih lamela. Suha i osjetljiva koža često pokazuje snižene razine ceramida i promijenjene omjere masnih kiselina, dok se u nasljednim poremećajima orožnjavanja, poput ihtioza, uočavaju duboki poremećaji u biosintezi i metabolizmu sfingolipida. Ovi nalazi potvrđuju da su ceramidi neizostavni ne samo za strukturalni integritet rožnatog sloja, nego i za očuvanje funkcionalne i imunološke homeostaze kože (7,11,12).

1.3 Obnavljanje epidermalne barijere

Obnavljanje epidermalne barijere danas se smatra temeljnim terapijskim načelom u liječenju suhe kože i upalnih dermatoza, osobito atopijskog dermatitisa, pri čemu je naglasak stavljen na obnovu strukture i funkcije rožnatog sloja, a ne isključivo na supresiju upale. Klinički i eksperimentalni dokazi jasno pokazuju da je oštećenje epidermalne barijere obilježeno smanjenim sadržajem i poremećenom organizacijom epidermalnih lipida, povišenim transepidermalnim gubitkom vode te promijenjenom kiselosti površine kože, što zajedno pogoduje održavanju upalnih procesa i povećanoj osjetljivosti na iritanse i alergene. U tom kontekstu razlikuju se klasične hidratantne formulacije i ciljane formulacije za popravak barijere. Konvencionalni ovlaživači sastoje se ponajprije od okluziva (npr. vazelin, parafini), humektanata (glicerol, urea, hijaluronska kiselina) i emolijentnih ulja, pri čemu im je primarni učinak smanjenje transepidermalnog gubitka vode i kratkotrajno poboljšanje hidratacije. Iako takvi pripravci često pružaju simptomatsko olakšanje, oni ne utječu izravno na poremećaj lipidne homeostaze rožnatog sloja i u nekim slučajevima mogu imati neutralan ili čak nepovoljan učinak na funkcionalni oporavak epidermalne barijere (2,13).

U nastojanju da se prevladaju ograničenja klasičnih ovlaživača, razvijene su formulacije koje sadrže lipide fiziološki zastupljene u koži, ponajprije ceramide, kolesterol i slobodne masne kiseline, u molarnim omjerima koji oponašaju prirodni sastav rožnatog sloja, najčešće s ceramidima kao dominantnom komponentom u omjeru 3:1:1 (2). Takvi pripravci konceptualno su usmjereni na obnovu međustaničnog lipidnog matriksa i normalizaciju lamelarne organizacije rožnatog sloja. Međutim, sve veći broj eksperimentalnih i kliničkih istraživanja ukazuje na to da konvencionalne emulzijske formulacije koje sadrže ceramide često ne ostvaruju stvarni popravak barijerne funkcije. Iako mogu dovesti do određenog poboljšanja kliničkih simptoma, poput smanjenja svrbeža ili subjektivnog osjećaja suhoće, njihova učinkovitost u smislu smanjenja transepidermalnog gubitka vode i obnove lamelarne strukture ostaje ograničena (14). Istraživanja koji proučavaju sudbinu topikalno primijenjenih ceramida, jasno pokazuju da su ceramidi u

konvencionalnim formulacijama najčešće prisutni u kristaliničnom ili polukristaliničnom stanju te da zbog svoje izrazite hidrofobnosti i visoke molekulske mase ne mogu spontano difundirati niti se reorganizirati unutar gusto pakiranih lipidnih dvoslojeva rožnatog sloja. Umjesto da se ugrađuju u međustanični lipidni matriks i doprinose njegovoj funkcionalnoj obnovi, egzogeni ceramidi ostaju površinski lokalizirani ili se uklanjaju deskvamacijom, bez mjerljivog učinka na strukturu barijere (7,13,14).

Dodatno, učinkovita obnova epidermalne barijere ne ovisi samo o prisutnosti pojedinih lipidnih komponenti, već o njihovoj međusobnoj interakciji, pravilnim molarnim omjerima i sposobnosti formiranja uređenih lamelarnih faza. Konvencionalne formulacije rijetko osiguravaju uvjete potrebne za takvu fizikalno-kemijsku reorganizaciju lipida, osobito kada su ceramidi prisutni u kristalnom obliku nespojivom s dinamikom obnove barijere. Stoga se sve jasnije profilira spoznaja da jednostavno dodavanje ceramida u klasične emulzije nije dostatno za funkcionalni popravak epidermalne barijere. Ova ograničenja snažno podupiru potrebu za razvojem novih, formulacijski sofisticiranijih pristupa koji omogućuju solubilizaciju ceramida i drugih lipida fiziološki prisutnih u koži, njihovu ciljanu isporuku i integraciju u lipidni matriks rožnatog sloja, čime se postiže stvarna, strukturna i dugoročna obnova epidermalne barijere, a ne samo prolazno simptomatsko poboljšanje (14).

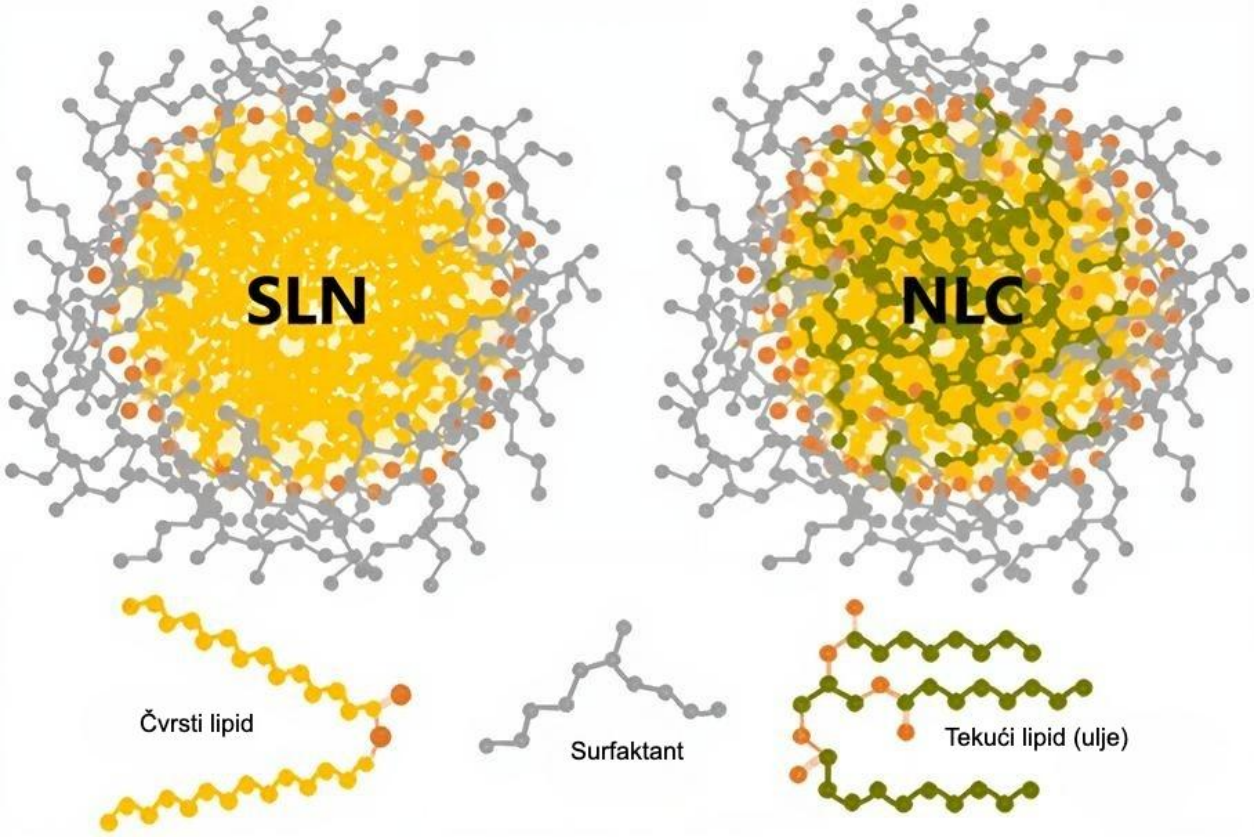
1.4 Farmaceutski oblici lijekova bazirani na lipidima

Lipidi su značajna skupina pomoćnih tvari u farmaceutskoj tehnologiji, zahvaljujući svojoj svestranosti i kompatibilnosti s različitim biološkim sustavima (15). Njihova primjena je posebno izražena u oblikovanju polučvrstih pripravaka za topikalnu primjenu, gdje omogućuju optimalnu isporuku djelatnih tvari u kožu. Rožnati sloj kože, bogat lipidima, djeluje kao prirodna barijera, a upravo visok afinitet lipofilnih pomoćnih tvari prema međustaničnim lipidima (ceramidi, kolesterol, masne kiseline) omogućuje bolju permeaciju i učinkovitiju terapiju lokalno primijenjenog lijeka (11). Osim u dermalnim pripravcima, lipidi nalaze široku primjenu i u drugim farmaceutskim oblicima. U razvoju supozitorija za rektalnu i vaginalnu primjenu, lipidi služe kao osnova zbog svoje sposobnosti taljenja na tjelesnoj temperaturi i kompatibilnosti s mukoznim membranama (16). U oralnim oblicima, posebice u mekim želatinskim kapsulama, ulja i na lipidima bazirana otapala omogućuju poboljšanu bioraspoloživost lijekova slabe topljivosti, čime se povećava njihova terapijska učinkovitost (17). Također, lipidi su ključni sastojci u razvoju parenteralnih pripravaka, poput uljnih injekcija i lipidnih emulzija za parenteralnu prehranu, gdje osiguravaju stabilnost i sigurnu isporuku lijekova ograničene topljivosti i u ulju topljivih vitamina (18). Razvoj nanotehnologije otvorio je nove mogućnosti za primjenu lipida u farmaceutskim oblicima, posebice kroz razvoj lipidnih nanosustava za dostavu lijekova. Lipidni nanosustavi, omogućuju kontrolirano oslobađanje, poboljšanu stabilnost i ciljanu isporuku lijekova, čime se značajno povećava njihova učinkovitost i smanjuju nuspojave. Ovi sustavi predstavljaju inovativan pristup u formulaciji lijekova, s posebnim naglaskom na personaliziranu medicinu i napredne terapijske strategije (19).

1.4.1 Čvrste lipidne nanočestice i nanostrukturirani lipidni nosači

Čvrste lipidne nanočestice (engl. *solid lipid nanoparticles*, SLN; Slika 4) razvijene su tijekom 1990-ih godina, dok su nanostrukturirani lipidni nosači (engl. *nanostructured lipid carriers*, NLC; Slika 4) uvedeni početkom 2000-ih kao njihova unaprijeđena generacija. Ovi lipidni nosači lijekova integriraju ključne prednosti emulzija, liposoma i polimernih nanočestica te omogućuju poboljšanu farmakokinetiku povećanjem permeabilnosti kroz biološke barijere i posljedično bioraspoloživosti djelatnih tvari. Strukturirani lipidni matriks osigurava fizičku stabilnost i zaštitu uklopljenih lijekova od kemijske i enzimske razgradnje, uz mogućnost modulacije kinetike oslobađanja i produljenog zadržavanja u organizmu. U odnosu na SLN-e, NLC-i pokazuju veći

kapacitet uklapanja lijeka i smanjenu sklonost kristaliničnoj reorganizaciji lipida tijekom skladištenja, što doprinosi boljoj stabilnosti i kontroliranom oslobađanju uklopljene molekule. Dodatno, površinska funkcionalizacija (npr. PEGilacija ili konjugacija liganada) omogućuje produženu cirkulaciju i ciljanu dostavu prema specifičnim stanicama ili tkivima, dok uporaba biokompatibilnih i biorazgradivih lipida doprinosi povoljnom sigurnosnom profilu. Zbog navedenih svojstava, SLN-i i NLC-i osobito su prikladni za formulaciju lijekova ograničene topljivosti i terapijske pristupe koji zahtijevaju precizno usmjeravanje i kontrolirano oslobađanje, što potvrđuju brojna recentna predklinička i klinička istraživanja (19–22).



Slika 4. Shematski prikaz strukture čvrstih lipidnih nanočestica (SLN) i nanostrukturiranih lipidnih nosača (NLC) (Preuzeto i prilagođeno iz (19), uz suglasnost izdavača).

SLN-i predstavljaju koloidne sustave submikronskih dimenzija (približno 50–1000 nm), načinjene od fiziološki prihvatljivih, biorazgradivih i biokompatibilnih lipida te prikladnih surfaktanata. Omogućuju uklapanje lipofilnih, ali i određenih hidrofilnih djelatnih tvari unutar čvrstog lipidnog matriksa, pri čemu raspodjela lijeka ovisi o njegovim fizikalno-kemijskim svojstvima i strukturi matriksa. Inicijalno su razvijane kao sferične čestice sastavljene od lipida

koji su u čvrstom stanju pri sobnoj i tjelesnoj temperaturi, dok su novija istraživanja pokazala da se optimizacijom sastava i postupka priprave mogu dobiti i druge morfologije (npr. elipsoidne ili diskoidne) s kontroliranim dimenzijama u nanometarskom području. Strukturno, SLN-i se opisuju kao visoko uređeni ili djelomično kristalinični lipidni matriksi unutar kojih je djelatna tvar molekularno dispergirana ili smještena u amorfnim, odnosno manje uređenim regijama (23,24).

U SLN sustavima čvrsti lipidi (npr. trigliceridi, masne kiseline, voskovi i drugi) čine dispergiranu fazu, dok surfaktanti djeluju kao emulgatori i stabilizatori, najčešće u koncentracijama 0,5–5% (w/v), osiguravajući koloidnu stabilnost i sprječavajući agregaciju čestica. Odabir i kombinacija lipida i surfaktanata presudno utječu na veličinu čestica, kristaliničnost matriksa, kapacitet uklapanja i profil oslobađanja lijeka. U usporedbi s liposomima, SLN-i omogućuju veću fizikalnu stabilnost i potencijal za produljeno oslobađanje, dok u odnosu na polimerne nanočestice nude povoljniji sigurnosni profil, osobito kada se priprava provodi bez uporabe organskih otapala. Međutim, visoka kristaliničnost lipidnog matriksa ograničava uklapanje lijeka te potencijalno dovodi izlučivanja uklopljenog lijeka iz strukture SLN-a tijekom skladištenja. Sva ova ograničenja potaknula su razvoj NLC-a, kod kojih se uvođenjem tekućih lipida u čvrsti lipidni matriks stvara se manje uređena struktura s većim brojem defekata, čime se poboljšavaju kapacitet uklapanja, smanjuje rizik od prerane difuzije ili kristalizacijom induciranog izlučivanja djelatne tvari te bolja kontrola kinetike oslobađanja djelatne tvari (25–27).

Tipični maseni omjeri čvrstih i tekućih lipida u NLC formulacijama kreću se približno u rasponu 70:30 do 99:1, a prisutan je i odgovarajući surfaktant koji osigurava koloidnu stabilnost sustava. Takav sastav odgovoran je za manje uređenu, odnosno djelomično amorfnu strukturu lipidnog matriksa (Slika 2), a takva organizacija pogoduje većem kapacitetu uklapanja djelatne tvari i fleksibilnijoj modulaciji profila oslobađanja. Lipidne komponente u NLC sustavima biraju se s obzirom na njihovu biokompatibilnost, biorazgradivost i regulatornu prihvatljivost, čime se osigurava sigurnost primjene i dobra podnošljivost (19,22,27).

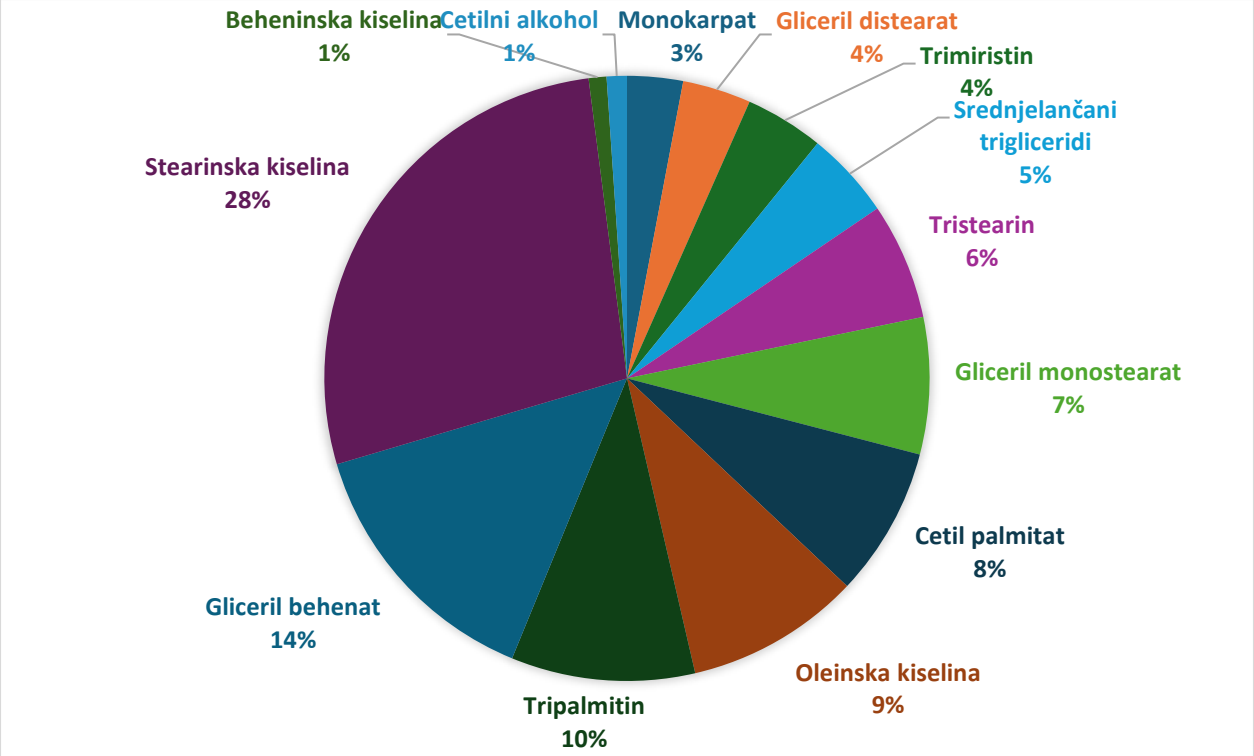
1.4.2 Sirovine za izradu SLN-a i NLC-a

Glavne sirovine za pripremu SLN-a i NLC-a uključuju čvrste lipide, tekuće lipide (ako se radi o NLC-u) i surfaktante, uz djelatne tvari koje želimo uklopiti. Pri tome, vodene disperzije SLN-a sadrže između 0,1% i 30% m/m čvrstih lipida, a stabilizirane su surfaktantom čija koncentracija varira između 0,5% i 5% m/m (22).

1.4.2.1 Lipidi

Lipidi predstavljaju glavni strukturni element NLC sustava te u velikoj mjeri određuju njihova fizikalno-kemijska i biološka svojstva. Učinkovitost uklapanja djelatne tvari, stabilnost formulacije te kinetika oslobađanja izravno ovise o odabiru i kombinaciji lipidnih komponenti, koje se mogu svrstati u nekoliko osnovnih skupina.

Među čvrstim lipidima koriste se zasićene i nezasićene masne kiseline, poput stearinske, palmitinske, oleinske i behenske (dokozanske) kiseline, zatim masni alkoholi (npr. cetilni, stearilni i laurilni alkohol) te različite klase glicerida. U skupini monoglicerida široko su zastupljeni gliceril monostearat (Imwitor® 900, Geleol®), gliceril behenat (Compritol® 888 ATO) i gliceril palmitostearat (Precirol® ATO 5). Od triglicerida se često primjenjuju trikaprin (Dynasan® 110), trilaurin (Dynasan® 112), trimiristin (Dynasan® 114), tripalmitin (Dynasan® 116) i tristearin (Dynasan® 118). Također se koriste i komercijalne smjese mono-, di- i triglicerida, poput Witepsola® W35 (65–80% triglicerida, 10–35% diglicerida i 1–5% monoglicerida) i Witepsola® H35 (pretežno trigliceridi s manjim udjelom di- i monoglicerida). Kao čvrste lipidne komponente primjenjuju se i prirodni i sintetski voskovi, među kojima su najčešći cetil palmitat, pčelinji i karnauba vosak. Međutim, kao što je prikazano na Slici 5, relativno mali broj lipida dominira u formulacijama NLC sustava, a to su stearinska kiselina, gliceril behenat, tripalmitin, cetil palmitat, gliceril monostearat i tristearin koji zajedno čine većinu (približno 70%) najčešće korištenih čvrstih lipida. Ovakva učestalost odražava njihov povoljan odnos između fizikalno-kemijske stabilnosti, sposobnosti uklapanja lijeka te sigurnosne i regulatorne prihvatljivosti (28–30).



Slika 5. Zastupljenost pojedinih čvrstih lipida u SLN i NLC sustavima (Preuzeto i prilagođeno iz (30), uz suglasnost izdavača).

S druge strane, tekući lipidi (ulja) predstavljaju ključnu komponentu NLC sustava, gdje smanjuju stupanj kristaliničnosti čvrstog lipidnog matriksa. Kao što je već istaknuto, uvođenjem tekuće lipidne faze inducira se formiranje manje uređenih, djelomično amorfnih struktura s povećanim brojem defekata, čime se poboljšava kapacitet NLC-a za uklapanje djelatnih tvari te smanjuje rizik od njezina istiskivanja tijekom skladištenja. U razvoji NLC-a primjenjuju se različite vrste ulja, koje se općenito mogu podijeliti na prirodna (npr. biljna ulja i njihove frakcije) i sintetska ulja (npr. srednjelančani trigliceridi i esteri masnih kiselina), a pregled najčešće korištenih predstavnika prikazan je u Tablici 2. Iako ne postoje strogo definirane smjernice za odabir tekućih lipida, topljivost djelatne tvari u lipidnoj fazi predstavlja jedan od ključnih kriterija, uz kompatibilnost s čvrstim lipidom i utjecajem na željena svojstva formulacije. Pri tome se preferira uporaba sintetska ulja zbog niza tehnoloških i farmaceutskih prednosti u odnosu na prirodna ulja. One uključuju bolju fizikalno-kemijsku stabilnost, mogućnost preciznije kontrole sastava i svojstava ulja, osiguravanje većeg kapaciteta uklapanja djelatnih tvari, kao i reproducibilnu kvalitetu i viši stupanj čistoće. Dodatno, njihova uporaba povezana je s manjim rizikom od

oksidacije, kontaminacije i potencijalnih alergijskih reakcija, čime se doprinosi sigurnosti i pouzdanosti konačne formulacije (28–30).

Tablica 2. Sintetička i prirodna ulja koja se koriste u razvoju NLC-a (preuzeto i prilagođeno prema (29), uz suglasnost izdavača).

Klasa spoja:	Primjeri
Srednjelančani mono i digliceridi kaprilne/kaprinske kiseline	Capmul MCM Imwitor
Esteri propilen glikola masnih kiselina (npr. monolaurati)	Lauroglycol FCC Capmul PG-12 Lauroglycol 90
Diesteri propilen glikola i kaprilne/kaprinske kiseline	Labrafac PG Miglyol 840
Srednjelančani trigliceridi i njihovi esteri, uključujući kaprinske/kaprilske trigliceride	Akomed R, Akomed E, Miglyol 810, Captex 355, Crodamol GTCC, Neobee M5
Frakcionirano kokosovo ulje	Miglyol 812, Triacetin, Labrafac CC, Captex 300
Dugolančani monogliceridi,	Maisine 35 (gliceril monolinoleat) Peceol, Capmul GMO (gliceril monoleat)
Kaprinski/kaprilski/digliceril sukcinat	Miglyol 829
Dietilen glikol monoetil eter	Transcutol HP
Masne kiseline, kao što su oleinska i kaprilska kiselina	Crossential O94
Esteri masnih kiselina	Etil butirat, etil oleat (Cardamol EO), izopropil miristat, etil butirat, isopropil palmitat
Mineralna ulja	Tekući parafin
Vitamini	**Vitamin E/α-tokoferol**
Neutralizirana ulja	Suncokretovo ulje, ulje jetre morskog psa, palmino ulje, sezamovo ulje, maslinovo ulje, ulje rižinih mekinja, nim ulje, ulje gorušice, ulje jojobe, ulje jetre bakalara, ulje sjemenke

	pamuka, ulje kikirikija, ricinusovo ulje, ulje sjemenki soje, ulje čaulmugre, arganovo ulje
Eterična ulja	Ulje bučinih sjemenki, ulje limunske trave, ulje cimeta, ulje peperminta, ulje citronele, ulje lavande, ulje klinčića, ulje češnjaka, ulje geranije

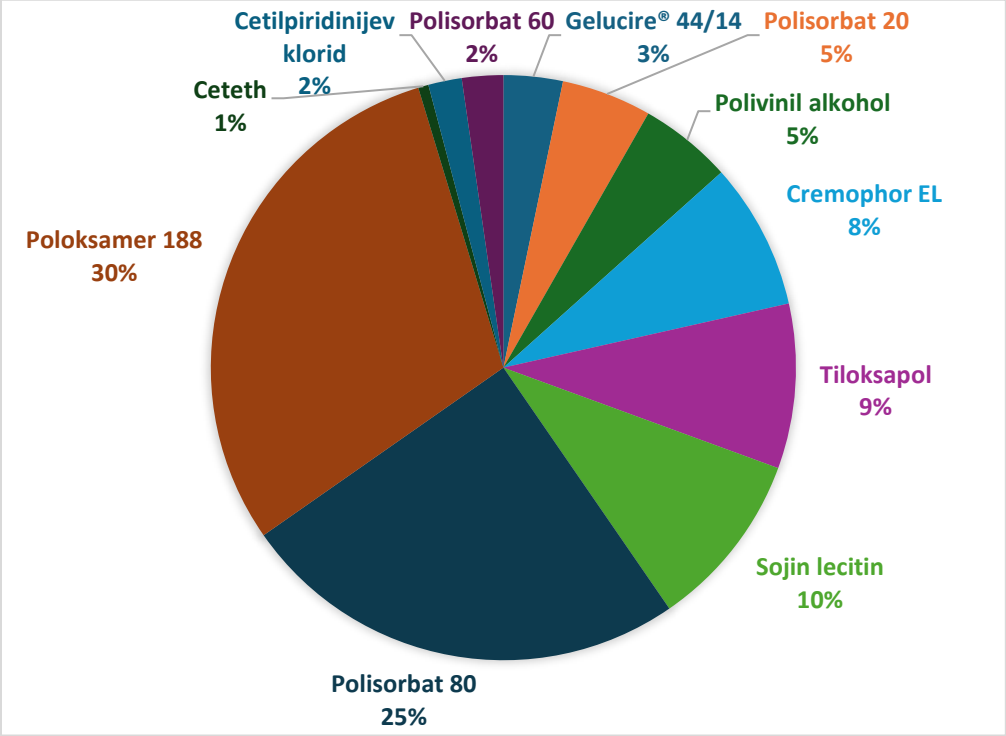
1.4.2.2 Površinski aktivne tvari

Treću ključnu komponentu u formulaciji NLC-a čine površinski aktivne tvari (surfaktanti), koje imaju presudnu ulogu u uspostavi i očuvanju koloidne stabilnosti sustava. Njihova primarna funkcija je smanjenje međupovršinske napetosti između lipidne (dispergirane) i vodene (kontinuirane) faze, čime se omogućuje formiranje nanočestica male veličine i uske raspodjele te sprječava njihova agregacija, koalescencija i rast tijekom skladištenja. Surfaktanti stabiliziraju NLC sustav mehanizmima elektrostatske i/ili steričke stabilizacije, ovisno o njihovoj kemijskoj prirodi i koncentraciji, pri čemu značajno doprinose održavanju uniformnosti veličine čestica i dugoročnoj fizikalnoj stabilnosti disperzije. Njihova amfifilna struktura omogućuje spontanu adsorpciju na granici faza, pri čemu su hidrofilne skupine orijentirane prema vodenoj fazi, a lipofilni segmenti prema lipidnoj jezgri, čime se formira stabilan sloj na međupovršini (31).

Osim stabilizacijske funkcije, surfaktanti mogu utjecati i na unutarnju strukturu lipidnog matriksa, kinetiku kristalizacije te raspodjelu djelatne tvari između faza, što u konačnici utječe na profil oslobađanja lijeka. Također, njihov tip i koncentracija značajno određuju reološka svojstva NLC disperzije, uključujući viskoznost i svojstva tečenja, što je važno za obradivost i primjenjivost pripravka. Stoga odabir odgovarajućeg surfaktanta i njegova optimizacija predstavljaju ključne korake u racionalnom dizajnu i razvoju NLC sustava (28–30).

Odabir površinski aktivne tvari u formulacijama SLN i NLC sustava temelji se na više međusobno povezanih kriterija, pri čemu kompatibilnost s lipidnom fazom i djelatnom tvari predstavlja temeljni preduvjet. Osim toga, u obzir se uzimaju predviđeni put primjene, željena veličina i stabilnost čestica te vrijednost HLB (engl. *hydrophilic–lipophilic balance*) surfaktanta. HLB vrijednost predstavlja empirijski parametar kojim se opisuje relativna hidrofilnost ili lipofilnost molekule, a određuje se na temelju strukture surfaktanta i udjela njegovih hidrofilnih i lipofilnih segmenata. U kontekstu formulacije emulzijskih i nanoemulzijskih sustava, koji su često

faza u pripremi NLC-a, optimalna stabilnost postiže se kada HLB vrijednost surfaktanta ili njihove kombinacije odgovara HLB vrijednosti lipidne faze. U tu svrhu se u praksi često koristi kombinacija surfaktanata, uključujući koemulgatore, s ciljem dodatnog sniženja međupovršinske napetosti i formiranja stabilnijeg sloja na međupovršini. Takav pristup omogućuje pripremu manjih čestica, užu raspodjelu veličine i poboljšanu kinetičku stabilnost sustava, a može posredno utjecati i na učinkovitost uklapanja djelatne tvari putem modificiranja topljivosti i raspodjele lijeka u lipidnoj fazi (28,32).



Slika 6. Zastupljenost pojedinih surfaktanata u SLN i NLC sustavima (Preuzeto i prilagođeno iz (30), uz suglasnost izdavača).

Surfaktanti koji se primjenjuju u razvoju SLN i NLC sustava mogu se klasificirati prema ionskom naboju. Neionski surfaktanti, poput polisorbata (Tween® 20, 60, 80), poloksamera (Poloxamer® 188, 407) i tyloxapola, najčešće se koriste zbog dobre biokompatibilnosti i niskog iritacijskog potencijala. Anionski surfaktanti uključuju natrijev lauril sulfat i žučne soli (natrijev kolat), dok se kationski surfaktanti, poput DOTAP-a (1,2-dioleoil-3-trimetilamonium-propan) i cetrimonijeva bromida, primjenjuju rjeđe, ali su relevantni u sustavima s ciljanom interakcijom s negativno nabijenim biološkim strukturama. Amfoterni i fosfolipidni surfaktanti, osobito lecitin

(sojin ili iz jaja) i fosfatidilkolin (npr. Epikuron®), imaju značajnu ulogu zbog svoje biološke prihvatljivosti i sposobnosti formiranja stabilnih slojeva na međupovršini. U načelu, neionski surfaktanti dominiraju u sastavu NLC-a (Slika 6), pri čemu su najzastupljeniji Poloksamer 188 (s oko 30%) i Polisorbat 80 (28). Koncentracije surfaktanata često su ograničene njihovom podnošljivošću, obzirom da potencijal izazivanja iritacija kože raste kada su primijenjeni u koncentracijama većim od 3% (*m*/*m*) (33).

Spojevi poput polivinilnog alkohola (PVA), propilen glikola i polietilen glikola (PEG) nisu klasični surfaktanti, već djeluju kao ko-stabilizatori međupovršine. Njihova uloga očituje se ponajprije u dodatnoj steričkoj stabilizaciji i modifikaciji reoloških svojstava disperzije NLC-a (28).

1.4.2.3 Modifikatori površine

Modifikatori površine predstavljaju dodatne sastojke formulacije koji nanočesticama lipida (NLC) osiguravaju specifična svojstva te značajno utječu na njihovo ponašanje *in vivo*. Njihova primjena omogućuje ciljanu dostavu u određena tkiva, produljeno zadržavanje u sistemskoj cirkulaciji te poboljšanu staničnu internalizaciju. Površinski modifikatori najčešće se kovalentno vežu na lipidnu komponentu NLC-a, pri čemu se koriste funkcionalizirani lipidni konjugati. Među najčešće primjenjivanim spojevima nalaze se 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamin–polietilenglikol (DSPE–PEG), derivati polietilenglikola vezani na jantarnu kiselinu (PEG 2000–sukcinat), folat–PEG–kolesterol te manan–PEG–fosfatidiletanolamin.

Površinska modifikacija NLC-a najčešće se provodi analogno funkcionalizaciji liposoma, primjenom funkcionaliziranih lipida uključenih u formulaciju metodom naknadnog uklapanja (engl. *post-insertion*). Ova metoda temelji se na dodatku funkcionaliziranih lipida prethodno formiranim nanočesticama u vodenom mediju. Takav pristup omogućuje ugradnju liganada u strukturu NLC-a bez izravne interakcije s uklopljenom djelatnom tvari, čime se očuvaju njezina farmakološka aktivnost i sigurnosni profil. Postupak obuhvaća tri ključna koraka. U prvom koraku funkcionalizirani lipidi sintetiziraju se konjugacijom biološki aktivnih liganada na hidrofilni segment PEG-lipidnog konjugata. Tako dobiveni amfifilni spojevi spontano formiraju micele u vodenoj otopini. U drugom koraku micele se dodaju prethodno pripremljenim SLN-ima ili NLC-ima te miješaju pod strogo kontroliranim uvjetima, uključujući temperaturu, pH vrijednost i hidrodinamičke parametre (npr. brzinu protoka u mikrofluidizatoru). Tijekom tog procesa

hidrofobni lanci funkcionaliziranih lipida ugrađuju se u lipidni matriks nanočestica, dok se ligandi orijentiraju prema vanjskoj površini sustava.

Završni korak uključuje evaluaciju uspješnosti površinske modifikacije. Usporedbom fizikalno-kemijskih svojstava nanočestica prije i nakon modifikacije moguće je procijeniti stupanj uklapanja. Posebna se pozornost posvećuje veličini čestica, koja ne smije pokazivati značajan porast, dok se prisutnost liganada na površini potvrđuje primjenom odgovarajućih analitičkih metoda, poput fluorescentnog označavanja ili elektroforetske analize (SDS-PAGE) (29).

1.4.2.4 Djelatne tvari uklopljene u NLC

NLC-i predstavljaju svestrane nosače za dermalnu primjenu lijekova, zahvaljujući specifičnim karakteristikama lipidnog matriksa koja omogućuje učinkovito uklapanje djelatnih tvari različitih fizikalno-kemijskih svojstava. Posebno su prikladne kao nosači lipofilnih i slabo topljivih lijekova, pri čemu se postiže poboljšana topljivost, stabilnost i lokalna bioraspoloživost u koži. U kontekstu topikalne terapije, NLC-i su uspješno primijenjeni za isporuku kortikosteroida (npr. klobetazol propionat, betametazon), retinoida (tretinoin, adapalen), nesteroidnih protuupalnih lijekova (diklofenak, ketoprofen), antifungalnih djelatnih tvari (ketokonazol, itrakonazol), kao i lokalnih antibiotika (mupirocin, fusidinska kiselina) (32,34–36). Osim toga, značajnu primjenu nalaze u dermalnoj dostavi antioksidansa i dermokozmetičkih aktivnih tvari, uključujući koenzim Q10, tokoferol i druge lipofilne vitamine (36–40).

Zahvaljujući mogućnosti istodobne ugradnje više djelatnih tvari, NLC sustavi omogućuju razvoj kombiniranih topikalnih formulacija s potencijalno sinergijskim učinkom, primjerice u liječenju akni, upalnih dermatoza ili gljivičnih infekcija kože. Nadalje, iako je primjena makromolekula u topikalnim sustavima još uvijek ograničena, istraživanja ukazuju da NLC-i mogu služiti kao nosači za određene biomolekule, uključujući peptide i nukleinske kiseline, čime se otvara prostor za razvoj naprednih dermalnih terapija, poput lokalne genske terapije i imunomodulacijskih pristupa (36,40).

U cjelini, NLC-i se ističu kao posebno prikladni nosači za topikalnu primjenu zbog svoje sposobnosti povećanja zadržavanja lijeka u koži, smanjenja sistemske izloženosti i mogućnosti prilagodbe formulacije specifičnim terapijskim potrebama. Iako primjena NLC sustava nije ograničena isključivo na dermalnu primjenu, već obuhvaća i druge puteve primjene (npr. oralni,

parenteralni, oftalmički ili pulmonalni) (41–44), ti aspekti nadilaze fokus ovog istraživanja te se stoga ovdje neće detaljnije razmatrati.

1.4.2.5 Ostale komponente formulacije

Osim osnovnih sastojaka poput lipidnih komponenti i površinski aktivnih tvari koji čine temelj za pripremu NLC-a, u formulacije se često dodaju i pomoćne tvari koje imaju specifične funkcije ovisno o tehnologiji priprave i ciljanim karakteristikama krajnjeg produkta. U liofiliziranim oblicima ključnu ulogu imaju krio- i lioprotektanti, među kojima su najčešće korišteni glukoza, fruktoza i sorbitol. Njihova je funkcija zaštita nanočestica tijekom procesa smrzavanja i sušenja, čime se održava strukturna stabilnost i biološka aktivnost čestica nakon rekonstitucije. Za dodatnu stabilizaciju i funkcionalizaciju površine nanočestica koristi se kitozan, koji oblaže površinu nanočestica. Zahvaljujući svojim bioadhezivnim svojstvima i pozitivnom naboju, kitozan poboljšava interakciju nanočestica s biološkim membranama te može pridonijeti produljenom zadržavanju u ciljanom tkivu.

U svrhu očuvanja mikrobiološke stabilnosti disperzija, u formulacije se uključuju konzervansi. Najčešće korišteni konzervansi su parabeni i tiomersal, a u novijim formulacijama sve se češće primjenjuju i alternative poput pentilen glikola, kaprilil glikola, fenoksietanola, benzil alkohola, tokoferola i kalijevog sorbata. Ovi spojevi omogućuju inhibiciju rasta mikroorganizama, čime se produžuje vijek trajanja proizvoda bez kompromitiranja sigurnosti ili učinkovitosti formulacije (30).

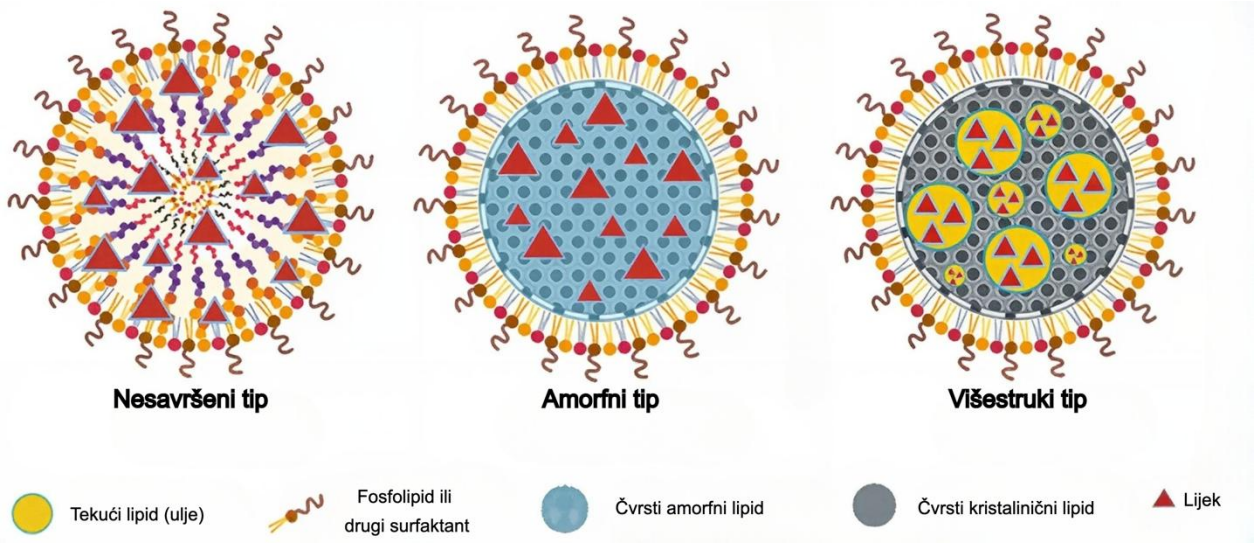
1.4.3 Klasifikacija NLC-a

NLC-i se klasificiraju u tri osnovne skupine na temelju strukture lipidnog matriksa, koja je izravno uvjetovana sastavom i fizikalnim stanjem lipida prisutnih u formulaciji (Slika 7). Svaki od ovih strukturnih tipova karakteriziraju specifične prednosti u pogledu fizikalne stabilnosti, kapaciteta uklapanja djelatne tvari i kinetike njezina oslobađanja.

1. Nesavršeni kristalni tip (Tip 1) razvija se miješanjem lipida različitih duljina masnih lanaca ili uporabom kombinacija mono-, di- i triglicerida. Takva heterogenost sprječava pravilnu kristalizaciju lipida, stvarajući praznine i nesavršenosti unutar kristalne rešetke lipida. Ove strukturne nepravilnosti povećavaju kapacitet za uklapanje lijeka i smanjuju mogućnost njegovog izbacivanja tijekom skladištenja.

2. Amorfni tip (Tip 2) nastaje korištenjem triglicerida srednje duljine u kombinaciji s čvrstim lipidima. U ovom tipu, tijekom hlađenja ne dolazi do rekristalizacije lipidnog matriksa, što rezultira amorfnom, čvrstom strukturom. Nedostatak kristalne organizacije sprječava neželjeno otpuštanje lijeka tijekom skladištenja, čime se poboljšava fizička stabilnost i produžuje rok valjanosti pripravka.

3. Višestruki tip (Tip 3) dobiva se uključivanjem uljnih komponenti – poput oleinske kiseline ili srednje i dugolančanih triglicerida – u čvrsti lipidni matriks. Da bi se formirao ovaj tip, udio ulja u smjesi mora biti veći od njegove topljivosti u čvrstom lipidu. Tijekom faze hlađenja nanoemulzije dolazi do separacije uljnih domena nanometarskih dimenzija, koje ostaju zarobljene unutar čvrstog matriksa. Takva višefazna struktura omogućuje dodatni kapacitet za lijek i potencijalno kontrolirano oslobađanje (22,30,45).



Slika 7. Shematski prikaz građe NLC-a nesavršenog kristalnog (tip 1), amofrnog (tip 2) i višestrukog tipa (tip 3) (Preuzeto i prilagođeno iz (45), uz suglasnost izdavača).

1.4.4 Tehnike za pripremu NLC-a

NLC-i mogu se pripraviti primjenom različitih tehnoloških pristupa koji se, ovisno o osnovnom fizikalnom principu, najčešće klasificiraju u tri glavne skupine: visokoenergetske metode, niskoenergetske metode te metode koje uključuju uporabu organskih otapala. Izbor odgovarajuće tehnike priprave od presudne je važnosti jer izravno utječe na svojstva konačnog produkta,

uključujući veličinu čestica, polidisperznost, fizičku stabilnost te učinkovitost uklapanja djelatne tvari (28,30).

Najčešće primjenjiv pristup u pripravi NLC sustava jest metoda homogenizacije pod visokim tlakom (engl. *high-pressure homogenization,* HPH), koja se smatra industrijski najprihvatljivijom i najčešće korištenom tehnikom. Ova metoda temelji se na primjeni visokih tlakova (tipično 400–800 bar) kojima se omogućuje dispergiranje lipidne faze u vodeni medij uz istodobno smanjenje veličine kapljica do nanometarskog raspona. Razlikuju se dvije osnovne varijante, homogenizacija pri povišenoj i pri sniženoj temperaturi. Prilikom homogenizacije pri povišenoj temperaturi, smjesa lipida smjesa se zagrijava obično 5–10 °C iznad tališta komponente s najvišim talištem, u njoj se otapa djelatna tvar, a zatim se formira predemulzija miješanjem s vodenom otopinom surfaktanta zagrijanom na istu temperaturu. Tako dobivena predemulzija podvrgava se homogenizaciji visokim tlakom pri istoj temperaturi, nakon čega hlađenjem dolazi do rekristalizacije lipida i nastanka NLC-a. Danas se osim konvencionalnih tipova visokotlačnih homogenizatora sve više primjenjuje i mikrofluidizator, koji se zahvaljujući specijalnoj konstrukciji interakcijske ćelije omogućava vrlo učinkovito usitnjavanje dispergiranih lipidnih domena, rezultirajući sustavima niske polidisperznosti i visoke reproducibilnosti. S druge strane, homogenizacija pri sniženoj temperaturi uključuje brzo hlađenje taline lijeka i lipida (npr. uranjanjem u tekući dušik), koja se zatim usitnjava do mikrometarske veličine, dispergira u rashlađenoj vodenoj otopini sufraktanta i homogenizira visokotlačnim homogenizatorom pri temperaturama nižim od sobne, čime se izbjegava dugotrajna izloženost djelatne tvari povišenim temperaturama i smanjuje rizik od njezine razgradnje. Iako homogenizacija pri sniženim temperaturama rezultira širim rasponom veličina čestica, ona je osobito pogodna za termolabilne i hidrofilne djelatne tvari (28,30).

Drugu važnu skupinu visokoenergetskih metoda čine visokoturažna homogenizacija (engl. *high shear homogenization*) koja je često spregnuta s ultrasonikacijom. U tim postupcima se rastaljena lipidna i zagrijana vodena faza najprije preemulgiraju korištenjem visokoturažnih miješalica pri 10 000 – 15 000 okr/min, a zatim se primjenom ultrazvučne sonde ili ultrazvučne kupelji postiže dodatno smanjenje veličine dispergiranih kapljica. Dodatno smanjenje veličine čestica posljedica je fenomena akustične kavitacije, pri čemu implozija mjehurića otapala uzrokuje intenzivne lokalne promjene tlaka i temperature. Prednost ove metode jest jednostavnost i izbjegavanje

upotrebe organskih otapala, dok se nedostaci očituju u potencijalnoj kontaminaciji uzorka metalnim česticama (kod uporabe ultrazvučnih sondi) te u relativno visokoj polidisperznosti sustava (28–30).

Za pripravu NLC-a također su značajne različite niskoenergetske metode, osobito metoda temeljena na pripravi mikroemulzije. Ovaj pristup temelji se na formiranju termodinamički stabilne mikroemulzije koja nastaje miješanjem rastaljene lipidne faze s vodenom otopinom surfaktanta i kosurfaktanta pri povišenoj temperaturi. Naknadnim razrjeđivanjem takve mikroemulzije hladnom vodom (2-10 °C) dolazi do brze rekristalizacije lipidnih domena i formiranja nanočestica. Prednost metode leži u jednostavnosti i reproducibilnosti, dok su njezina ograničenja potreba za visokim koncentracijama surfaktanata te često dodatni postupci koncentriranja disperzije (npr. ultrafiltracija ili liofilizacija). U istu skupinu mogu se ubrojiti i postupci temeljeni na pripravi dvostruke emulzije (w/o/w), fazne inverzije inducirane temperaturom te metode koje koriste membranski kontaktor, koji omogućuju kontroliranu formaciju kapljica i potencijalno kontinuiranu proizvodnju NLC-a (29).

Treću skupinu čine metode koje uključuju uporabu organskih otapala koja se ne miješaju s vodom, za otapanje lipidnih komponenata NLC-a. Takva otopina se zatim emulgira u vodenom mediju koji sadrži surfaktant, nakon čega se organska faza uklanja pri sniženom tlaku, što potiče precipitaciju lipida i formiranje nanočestica. Ukoliko se koriste otapala koja se djelomično miješaju s vodom, difuzija otapala u vodenu fazu dovodi do nastanka nanočestica. Metoda injektiranja uključuje ubrizgavanje otopine lipida u vodu, pri čemu dolazi do trenutne difuzije otapala i taloženja lipida. Prednost ovih metoda jest izbjegavanje toplinskog opterećenja, što ih čini pogodnima za termolabilne djelatne tvari, dok je njihov glavni nedostatak potreba za uklanjanjem potencijalno toksičnih organskih otapala (28–30).

Zaključno, izbor metode priprave NLC-a ovisi o više čimbenika, uključujući fizikalno-kemijska svojstva sirovina, ciljana svojstva formulacije i prikladnost uvećanja proizvodnog postupka na industrijske razmjere. Visokoenergetske metode, osobito homogenizacija pod visokim tlakom, dominiraju zbog svoje robusnosti i primjenjivosti u industrijskim uvjetima, dok niskoenergetske metode i postupci s organskim otapalima imaju specifične prednosti u formulaciji osjetljivih molekula. Kombinacijom odgovarajućih tehnika i optimizacijom procesnih parametara moguće je

prirediti NLC sustave s ciljanim svojstvima, što je ključno za njihovu učinkovitu primjenu u dermalnoj i drugim farmaceutskim primjenama (28).

1.4.5 Karakterizacija NLC-a za dermalnu primjenu

1.4.5.1 Fizikalno-kemijska karakterizacija NLC-a

Fizikalno-kemijska karakterizacija NLC-a predstavlja temelj za razumijevanje njihovih strukturnih i funkcionalnih svojstava te je ključna u procesu optimizacije proizvodnog procesa i procjeni njihove prikladnosti za dermalnu primjenu. Odabrani parametri karakterizacije izravno ukazuju na stabilnost sustava, interakciju s komponentama rožnatog sloja i bioraspoloživost uklopljene djelatne tvari. U tom kontekstu najvažnije je odrediti veličinu čestica i raspodjelu veličina, površinski naboj, stupanj kristaliničnosti lipidnog matriksa i uklopljenih djelatnih tvari te učinkovitost uklapanja lijeka, uz praćenje stabilnosti tijekom vremena (46,47).

Veličina čestica i raspodjela veličina u NLC disperzijama najčešće se određuju metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering,* DLS), koja se temelji na analizi fluktuacija intenziteta raspršene svjetlosti uzrokovanih Brownovim gibanjem čestica u disperzijskom mediju. Brzina Brownovog gibanja obrnuto je proporcionalna veličini čestica te se, primjenom Stokes–Einsteinove jednadžbe, izračunava njihov hidrodinamički promjer. Osim srednje veličine čestica, ovom metodom određuje se i indeks polidisperznosti (engl. *polydispersity index,* PDI), koji predstavlja mjeru širine raspodjele veličina u sustavu. Za dermalnu primjenu poželjni su sustavi s veličinom čestica u rasponu približno 50–400 nm, pri čemu veličine manje od 300 nm omogućuju bolji kontakt s lipidnim slojem rožnatog sloja i povoljan okluzivni učinak. Istodobno, PDI vrijednosti manje od 0,3 ukazuju na relativno homogenu disperziju i smanjenu sklonost agregaciji, što se smatra važnim kriterijem kakvoće nanosustava (46–48).

Površinski naboj nanočestica izražava se kroz zeta potencijal, koji predstavlja električni potencijal na plohi smicanja između površine čestice i disperznog medija. Određivanje zeta potencijala provodi se metodom elektroforetskog raspršenja svjetlosti, pri čemu se elektroforetska pokretljivost čestica u električnom polju izračunava na temelju Dopplerova pomaka raspršene svjetlosti i zatim prevodi u vrijednost zeta potencijala odgovarajućim teorijskim modelom. Visoke apsolutne vrijednosti zeta potencijala (veće od ±30 mV) ukazuju na izraženu elektrostatsku odbojnost između čestica i dobru fizikalnu stabilnost disperzije. Međutim, u NLC sustavima koji

sadrže neionske surfaktante stabilnost se često postiže kombinacijom elektrostatske i steričke stabilizacije, pa i niže apsolutne vrijednosti mogu biti prihvatljive (46,48).

Strukturna obilježja lipidnog matriksa, osobito stupanj kristaliničnosti, određuju se primjenom diferencijalne pretražne kalorimetrije (engl. *differential scanning calorimetry,* DSC) i rendgenske difrakcije na polikristalnom uzorku (engl. *X-ray powder diffraction,* XRPD). U tu svrhu potrebno je iz pripremljene disperzije NLC-a ukloniti vodu te prevesti uzorak u čvrsto stanje, što se najčešće postiže liofilizacijom. DSC metoda mjeri promjene toplinskog toka tijekom kontroliranog zagrijavanja ili hlađenja uzorka, čime se identificiraju fazni prijelazi poput taljenja i kristalizacije. XRPD analiza temelji se na difrakciji rendgenskog zračenja na kristalnim ravninama te omogućuje uvid u kristalnu strukturu i stupanj uređenosti lipida. Za NLC-e je karakterističan niži stupanj kristaliničnosti u odnosu na čvrste lipidne nanočestice zbog prisutnosti tekućih lipida koji ometaju pravilno pakiranje molekula u kristalnu rešetku. Takva djelomično neuređena struktura povećava raspoloživi prostor za uklapanje lijeka i smanjuje njegovu tendenciju istiskivanja tijekom skladištenja (46,49). Osim kristaliničnosti i faznih prijelaza lipidnih komponenata, DSC i XRPD pružaju informacije u karakteristikama čvrstog stanja uklopljenih djelatnih tvari, što je ključno za njihovo oslobađanje (47).

Učinkovitost uklapanja lijeka predstavlja jedan od ključnih parametara kvalitete NLC sustava te se definira kao omjer količine lijeka uklopljenog u lipidni matriks i ukupno dodane količine lijeka. Određuje se indirektno, odvajanjem slobodnog (neuklopljenog) lijeka ultrafiltracijom ili centrifugiranjem, nakon čega slijedi kvantifikacija spektrofotometrijskim ili kromatografskim metodama. Za dermalnu primjenu poželjne su visoke vrijednosti učinkovitosti uklapanja, najčešće iznad 80%, a kod lipofilnih djelatnih tvari često i veće od 90%. Sastav lipidnog matriksa, posebice omjer čvrstih i tekućih lipida, značajno utječe na ovaj parametar jer povećana količina tekuće faze dovodi do stvaranja strukturnih nepravilnosti koje omogućuju veći kapacitet uklapanja (28,47).

Stabilnost NLC sustava procjenjuje se praćenjem promjena u navedenim fizikalno-kemijskim parametrima tijekom vremena i pod različitim uvjetima skladištenja. Očuvanje veličine čestica, niskog PDI-a, stabilnog zeta potencijala i konstantne učinkovitosti uklapanja ukazuje na dobru fizikalnu stabilnost, dok odstupanja od početnih vrijednosti mogu upućivati na agregaciju, rast čestica, promjene u kristaliničnosti ili istiskivanje uklopljenog lijeka

iz lipidnog matriksa. Zahvaljujući neuređenijoj strukturi lipidnog matriksa, NLC-i općenito pokazuju bolju stabilnost u usporedbi s čvrstim lipidnim nanočesticama (30,50).

Uz navedene temeljne metode, dodatne tehnike koriste se za cjelovitiju karakterizaciju nanosustava. Elektronska mikroskopija (SEM, TEM, AFM) omogućuje direktan uvid u morfologiju i veličinu čestica, dok spektroskopske metode poput FTIR-a ili Ramanove spektroskopije pružaju informacije o interakcijama između uklopljenog lijeka i lipidnog matriksa. Napredne metode raspršenja (SAXS, SANS) i nuklearna magnetska rezonancija (NMR) koriste se za detaljnu analizu unutarnje strukture i dinamike sustava, ali se primjenjuju uglavnom u istraživačkom kontekstu (47).

S obzirom na zahtjeve dermalne primjene, optimalno formulirani NLC sustavi karakterizirani su veličinom čestica manjom od 300 nm, uskom raspodjelom veličina (PDI ≤ 0,3), stabilnim površinskim nabojem te visokim stupnjem uklapanja lijeka. Kombinacija navedenih svojstava omogućuje stabilnost disperzije, učinkovitu interakciju s rožnatim slojem i kontrolirano oslobađanje djelatne tvari, što NLC-e čini prikladnim nosačima za dermalnu isporuku lijekova (50).

1.4.5.2 Biofarmaceutska karakterizacija NLC-a

Biofarmaceutska karakterizacija NLC-a obuhvaća skup *in vitro* i *ex vivo* metoda kojima se procjenjuje oslobađanje uklopljene djelatne tvari, interakcija sustava s kožom, sposobnost penetracije NLC-a i/ili djelatne tvari u kožu te biokompatibilnost sustava. Ove metode omogućuju uspostavljanje veze između fizikalno-kemijskih svojstava NLC-a i njihove terapijske učinkovitosti, osobito u kontekstu dermalne primjene gdje je cilj postići kontrolirano oslobađanje uklopljene djelatne tvari i njeno zadržavanje u rožnatom sloju uz izbjegavanje sistemske apsorpcije lijeka, kako bi se izbjegle sistemske nuspojave. Također, ispituje se biokompatibilnost i potencijal izazivanja iritacija kože, kao ključni atributi kvalitete pripravka koji osiguravaju sigurnost primjene razvijenih NLC formulacija (47,51).

In vitro ispitivanje oslobađanja lijeka iz NLC sustava najčešće se provodi primjenom difuzijskih sustava, kao što su dijalizacijske membrane ili horizontalne (Franz) difuzijske ćelije. Moguća je i primjena imerzijske ćelije, naročito prilikom ispitivanja *in vitro* oslobađanja lijeka iz NLC-a uklopljenih u hidrogel ili neku drugu polučvrstu podlogu. Pri tome polupropusna membrana odvaja formulaciju od receptorskog medija, pri čemu kinetika oslobađanja ovisi o difuziji lijeka kroz lipidni matriks i desorpciji s površine čestica. Pri tome važno je odabrati odgovarajući tip

membrane koji neće ograničavati difuziju oslobođenog lijeka iz donorskog odjeljka. Ostali eksperimentalni parametri uključuju sastav, pH i volumen prihvatnog medija koji se najčešće prilagođava s ciljem postizanja uvjeta osigurane topljivosti za ispitivani lijek, temperaturu koja najčešće iznosi 32 °C obzirom na temperaturu površine kože, brzinu miješanja te vremenski raspored uzorkovanja (52). Kvantifikacija oslobođenog lijeka provodi se spektrofotometrijski ili češće kromatografski. Tipični rezultati izražavaju se kao kumulativni postotak oslobođenog lijeka u zavisnosti o vremenu te se analiziraju primjenom različitih kinetičkih modela koji mogu ukazivati na ključne mehanizme koji kontroliraju oslobađanje lijeka. Za NLC je karakteristično inicijalno brže oslobađanje površinski vezanog lijeka praćeno produljenim oslobađanjem lijeka iz lipidnog matriksa, a može se modificirati prilagodbom koncentracije tekućeg lipida i surfaktanta te uporabom čvrstih lipida niskog tališta (28). Takav profil oslobađanja smatra se poželjnim jer omogućuje brzo postizanje i produženo održavanje terapijske koncentracije lijeka u koži uz smanjeni rizik sistemske izloženosti (47,51).

Okluzivni učinak NLC sustava procjenjuje se gravimetrijskim praćenjem prijenosa vodene pare kroz polupropusnu membranu (engl. *water vapor transmission rate*), pri čemu smanjenje gubitka vode ukazuje na stvaranje okluzivnog lipidnog filma. U praksi se masa vode izgubljene kroz membranu prati tijekom vremena u kontroliranim uvjetima temperature i relativne vlažnosti, a rezultati se često izražavaju kao faktor okluzije u odnosu na referentni sustav (npr. vazelin). Tipično se očekuje smanjenje gubitka vode za više od 20–50% u odnosu na kontrolu, ovisno o sastavu formulacije i dimenzijama nanočestica (51). Okluzivni učinak NLC-a pripisuje se njihovoj sposobnosti formiranja homogenog lipidnog filma na površini kože, čime se smanjuje transepidermalni gubitak vode i povećava hidratacija rožnatog sloja kože. Takvo povećanje hidratacije može posljedično povećati permeabilnost kože i poboljšati bioraspoloživost djelatne tvari, ali i doprinijeti smanjenju iritacije zbog obnove lipidne barijere (36).

Ispitivanje penetracije lijeka u/kroz kožu provodi se različitim modelima koji uključuju biomimetske membrane (npr. Strat-M®), stanične kulture (npr. HaCaT), rekonstruirani humani epidermis, te *ex vivo* kožu (najčešće ljudsku ili svinjsku) (53–56). Transport lijeka se zavisno o fizikalno-kemijskim karakteristikama odvija kroz međustanične lipide, transcelularno ili putem folikula dlaka. Ispitivanjima u Franz difuzijskim ćelijama određuju se parametri poput fluksa, koeficijenta permeabilnosti i količine lijeka zadržane u pojedinim slojevima kože (47). Pri tome, u

kontekstu dermalne primjene lijeka, izraženi transdermalni transport nije poželjan jer će sistemski apsorbirani lijek dovesti do razvoja sistemskih nuspojava. Od većeg je značaja količina lijeka koja se dostavi u pojedine slojeve kože, što se prati tehnikom kojom se uzastopnim nanošenjem i odljepljivanjem specijalnih medicinskih traka s kože uklanja rožnati sloj radi analize i procjene apsorpcije tvari (engl. *tape stripping*). Tipični parametri uključuju ukupnu količinu penetriranog lijeka, njegovu distribuciju po slojevima kože te kinetiku penetracije (56). Kod ispitivanja koja koriste stanične modele ili tkiva od ključne je važnosti pratiti njihov integritet. U tu svrhu primjenjuje se mjerenje transepitelnog otpora (stanične kulture) ili određivanje transepidermalnog gubitka vlage (koža), pri čemu se vrijednosti TEWL $\leq$ 15 g/m^2/h smatraju graničnim (53). Istraživanja permeabilnosti pokazuju da NLC-i povećavaju depoziciju lijeka u rožnatom sloju i epidermisu, uz ograničenu sistemsku apsorpciju, što je poželjno za lokalnu terapiju. Na penetraciju značajno utječu veličina čestica (učinkovitije su čestice dimenzija manjih od 200 nm), sastav lipida i tip surfaktanata te površinska svojstva čestica. Praćenje transporta NLC-a kroz kožu je zahtjevnije i uključuje primjenu konfokalnih i fluorescentnih mikroskopa uz obilježavanje čestica odgovarajućim markerima (51).

Biokompatibilnost NLC sustava procjenjuje se primjenom različitih *in vitro* modela čija se složenost kreće od jednostavnih jednoslojnih staničnih kultura do naprednih trodimenzionalnih, višeslojnih modela kože. Jednostavniji modeli, koji uključuju primarno keratinocite ili fibroblaste, najčešće su zastupljeni u svakodnevnoj eksperimentalnoj praksi zbog svoje dostupnosti, jednostavnosti provedbe i dobre ponovljivosti rezultata (57,58). U tim se sustavima biokompatibilnost procjenjuje na temelju vijabilnosti stanica nakon izlaganja formulaciji, pri čemu se najčešće primjenjuju kolorimetrijski testovi poput MTT testa, koji se temelji na redukciji tetrazolijskih soli u obojeni produkt kao pokazatelju metaboličke aktivnosti stanica. Dodatno se prate i parametri oštećenja stanične membrane, poput oslobađanja laktat dehidrogenaze, kao i pokazatelji oksidativnog stresa ili genotoksičnosti. Tipično se prihvatljivima smatraju formulacije koje održavaju vijabilnost stanica iznad 70–80%, dok se vrijednosti ispod 50% povezuju s izraženim iritacijskim potencijalom. U tom kontekstu većina NLC formulacija pokazuje povoljan sigurnosni profil, osobito kada su formulirane iz fizioloških lipida i stabilizirane neionskim surfaktantima, dok kationske formulacije često pokazuju povećanu citotoksičnost zbog izraženije interakcije s negativno nabijenim staničnim membranama (58).

S druge strane, napredniji trodimenzionalni modeli, poput rekonstruiranog humanog epidermisa (EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™) ili modela pune debljine kože koji uključuju i dermalnu komponentu, omogućuju realističniju procjenu interakcije NLC sustava s kožnom barijerom (59). Ovi modeli oponašaju slojevitu organizaciju epidermisa s funkcionalnim rožnatim slojem te omogućuju istodobnu procjenu vijabilnosti tkiva, integriteta barijere, histoloških promjena i potencijalnog upalnog odgovora. Međutim, zbog složenije izvedbe, veće cijene i manjih mogućnosti visokoprotočne analize, njihova je primjena u pravilu rjeđa te se koriste ponajprije u završnim fazama razvoja formulacije ili za detaljniju procjenu sigurnosti i iritacijskog potencijala. U tim modelima kriteriji procjene temelje se na vijabilnosti tkiva, pri čemu se prag od 50% koristi za klasifikaciju iritansa, u skladu s regulatornim smjernicama.

Integracija rezultata dobivenih jednostavnijim staničnim modelima i složenijim trodimenzionalnim sustavima omogućuje cjelovitiju procjenu biokompatibilnosti NLC sustava, pri čemu prvi pružaju brzu i osjetljivu procjenu citotoksičnosti, dok drugi omogućuju dublji uvid u interakciju formulacije s funkcionalnom kožnom barijerom i njezin ukupni sigurnosni profil (59).

U kontekstu ovog doktorskog rada poseban je naglasak na procjeni potencijala razvijenih NLC formulacija za obnovu epidermalne barijere kože. Funkcionalni integritet barijere najčešće se procjenjuje kombinacijom *in vivo* i *in vitro* metoda koje omogućuju praćenje promjena u propusnosti, stupnju hidratacije i strukturnoj organizaciji rožnatog sloja. Među dostupnim pristupima, neinvazivne metode temeljene na praćenju fizikalnih parametara kože, poput transepidermalnog gubitka vode (TEWL) i stupnja hidratacije rožnatog sloja, predstavljaju standard u procjeni obnove barijerne funkcije (60). TEWL odražava količinu vode koja difundira kroz epidermis te se povećava s oštećenjem barijerne funkcije rožnatog sloja, dok smanjenje TEWL vrijednosti nakon primjene formulacije ukazuje na njezinu obnovu ili poboljšanje (61).

Mjerenje TEWL temelji se na određivanju gradijenta vodene pare iznad površine kože, pri čemu se koriste uređaji s otvorenom ili zatvorenom komorom (npr. Tewameter ili Vapometer). Kod metode s otvorenom komorom, najčešće primjenjivane u istraživačkoj i kliničkoj praksi, sonda se postavlja okomito na površinu kože te mjeri razliku u koncentraciji vodene pare između dviju točaka unutar sonde, čime se izračunava difuzijski tok vode kroz rožnati sloj. Prije mjerenja ispitanici se moraju aklimatizirati najmanje 15–30 minuta u kontroliranim uvjetima (temperatura približno 20–22 °C i relativna vlažnost zraka <60%), dok se mjereno područje kože ostavlja

neprekriveno kako bi se izbjegli artefakti povezani s okluzijom. Sonda se mora primijeniti uz lagani, konstantni pritisak, bez prethodnog dodirivanja kože, a vrijeme mjerenja treba biti što kraće kako bi se spriječila promjena uvjeta na površini kože tijekom analize. Budući da na TEWL značajno utječu brojni čimbenici (temperatura, znojenje, dnevne aktivnosti, anatomsko mjesto), preporučuje se standardizacija eksperimentalnih uvjeta i uključivanje odgovarajućih kontrola kako bi se osigurala pouzdanost rezultata (61–63).

Dodatno, stupanj hidratacije rožnatog sloja procjenjuje se mjerenjem električne vodljivosti ili kapaciteta površinskog sloja kože, najčešće pomoću korneometra. Ova metoda temelji se na činjenici da sadržaj vode u epidermisu utječe na dielektrična svojstva tkiva, pa viši stupanj hidratacije rezultira većim izmjerenim signalom. Za razliku od TEWL-a, koji odražava gubitak vode, mjerenje stupnja hidratacije kvantificira „stvarni" sadržaj vode u rožnatom sloju, čime daje komplementarnu informaciju o stanju barijere. Mjerenja se također provode u standardiziranim uvjetima, uz kontrolu vanjskih čimbenika i ponovljena očitanja na istom anatomskom mjestu kako bi se smanjila varijabilnost (63,64).

Obnova epidermalne barijere može se procjenjivati nakon jednokratne primjene formulacije ili tijekom dugotrajnog tretmana, pri čemu kontinuirana primjena često rezultira izraženijim i stabilnijim smanjenjem TEWL-a te povećanjem stupnja hidratacije rožnatog sloja vrijednosti. Ispitivanja se u pravilu provode *in vivo* na pokusnim životinjama ili zdravim dobrovoljcima , ili na *ex vivo* modelu svinjskog uha koji nakon žrtvovanja životinje u određenoj mjeri odražava fiziološke vrijednosti ključnih fizičkih parametara kože, kao što je elastičnost, TEWL, sadržaj vlage i slično (60,65). Pri tome, integritet epidermalne barijere se prethodno narušava kemijskim (npr. natrijev lauril sulfat), fizikalnim (*tape-stripping*) ili okolišnim čimbenicima, nakon čega se prati dinamika oporavka nakon jednokratne ili višekratne primjene ispitivane formulacije. U takvim modelima uspješna formulacija ubrzava normalizaciju TEWL vrijednosti i sadržaja vode i te smanjuje kliničke znakove oštećenja kože. Dodatne metode, poput skvamometrije, omogućuju procjenu stupnja deskvamacije i stabilnosti rožnatog sloja kao dodatnog pokazatelja obnove barijere (60).

In vitro pristupi, temeljeni na proučavanju permeacije različitih modelnih tvari, kao što je primjerice kofein, pružaju komplementarni uvid u funkcionalnu obnovu barijere procjenom sposobnosti formulacija da smanje penetraciju modelnih spojeva kroz kožu (60). Zbog

kompleksnosti barijerne funkcije, suvremeni pristup procjeni obnove epidermalne barijere temelji se na kombinaciji metoda, pri čemu TEWL i praćenje stupnja hidratacije čine temelj kvantitativne procjene, dok studije permeacije i napredni modeli kože omogućuju dublje razumijevanje mehanizama djelovanja formulacija i njihovog stvarnog učinka na kožnu barijeru.

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Epidermalna barijera predstavlja visoko organiziranu i multifunkcionalnu strukturu koja osigurava homeostazu kože, štiteći organizam od gubitka vode i ulaska egzogenih štetnih čimbenika. Funkcionalno se sastoji od međusobno povezanih fizičkih, kemijskih, mikrobioloških i imunoloških komponenti koje zajednički održavaju integritet i adaptivnu otpornost kože (7,66). Fizička barijera primarno je lokalizirana u rožnatom sloju te je građena od korneocita uronjenih u intercelularni lipidni matriks lamelarne organizacije, sastavljen od ceramida, kolesterola i slobodnih masnih kiselina u približno ekvimolarnim omjerima. Ona je ključna za ograničavanje transepidermalnog gubitka vode i sprječavanje penetracije stranih tvari (10,67).

Poremećaj epidermalne barijere predstavlja središnji patofiziološki mehanizam u nizu kožnih bolesti, osobito u upalnim dermatozama poput atopijskog dermatitisa i psorijaze. Takvi poremećaji često uključuju kvantitativne i kvalitativne promjene u sastavu ceramida, uključujući smanjenje ukupne koncentracije, skraćenje duljine masnih lanaca i promijenjenu distribuciju podklasa, što rezultira dezorganizacijom lamelarne strukture lipidnog matriksa i povećanom propusnošću kože. Posljedično dolazi do povećane penetracije alergena i iritansa, aktivacije imunološkog odgovora i razvoja upale, čime se uspostavlja začarani krug barijerne disfunkcije i upale. Klinički se to očituje pojavom kseroza, eritema, pruritusa i povećane osjetljivosti kože, a narušena barijera prepoznata je kao ključni etiološki čimbenik i u kontaktnom dermatitisu, ihtiozama i aknama (7,9–12,67–69).

Temeljni pristupi obnovi epidermalne barijere usmjereni su na rehidrataciju rožnatog sloja, nadoknadu intercelularnih lipida i normalizaciju epidermalne diferencijacije. Topikalni pripravci, osobito emolijensi i hidratantni proizvodi, tradicionalno predstavljaju prvu liniju terapije, djelujući putem okluzivnog učinka, zadržavanja vode i smanjenja TEWL-a (13,70). Međutim, suvremeni koncepti naglašavaju važnost primjene fizioloških lipida u optimalnim omjerima (ceramidi, kolesterol i slobodne masne kiseline), čime se potiče endogena sinteza lipida i obnova lamelarne organizacije lipidnog matriksa Dodatno, regulacija pH vrijednosti, modulacija imunoloških odgovora i utjecaj na mikrobiom kože predstavljaju integralne komponente suvremenog pristupa obnovi barijere (9–11,14,60).

Unatoč širokoj primjeni, konvencionalne formulacije poput krema i losiona imaju značajna ograničenja, osobito u dostavi lipofilnih i visokomolekularnih tvari poput ceramida. Njihova penetracija kroz rožnati sloj je često ograničena, a učinkovitost može varirati ovisno o sastavu baze,

prisutnosti emulgatora i pospješivača permeacije, koji ponekad mogu dodatno narušiti barijernu funkciju kože. Osim toga, problem predstavlja i fizička stabilnost ceramida u formulacijama, jer njihova neadekvatna solubilizacija i kristalizacija značajno smanjuju biološki učinak na obnovu barijere (14,71).

S ciljem prevladavanja navedenih ograničenja razvijaju se napredni tipovi formulacija, uključujući mikroemulzije, nanoemulzije, liposome i lipidne nanočestice. Ovi sustavi omogućuju povećanu topljivost i stabilnost uklopljenih lipida kože, poboljšanu penetraciju kroz rožnati sloj te potencijalno ciljanu i kontroliranu dostavu ceramida i drugih fiziološki relevantnih lipida u epidermalne slojeve. Mikroemulzije, primjerice, povećavaju termodinamičku aktivnost i permeaciju ceramida, dok liposomi, zbog sličnosti s lipidnom strukturom kože, olakšavaju njihovu integraciju u intercelularni lipidni matriks (9,14,60). Ipak, neki od ovih sustava, posebice oni s visokim udjelom surfaktanata, mogu imati ograničenja u kliničkoj primjeni zbog potencijalnog iritacijskog učinka, što dodatno ističe potrebu za razvojem novih, funkcionalno optimiziranih nanostrukturiranih nosača za učinkovitu i sigurnu obnovu epidermalne barijere. Međutim, razvoj takvih sustava je tehnološki izrazito zahtjevan te zahtjeva preciznu optimizaciju brojnih formulacijskih i procesnih parametara.

U tom smislu, hipoteza ovog doktorskog rada polazi od pretpostavke da je postupkom visokoturažnog homogeniziranja u sprezi s ultrasonikacijom moguće formulirati stabilne nanostrukturirane lipidne nosače definiranog raspona veličine čestica i kontroliranih površinskih svojstava, koji sadrže fiziološki relevantne omjere kolesterola i ceramida. Tako pripremljeni nosači, ugrađeni u hidrogel, mogu poboljšati strukturnu organizaciju lipidnog matriksa rožnatog sloja i doprinijeti obnovi narušene kožne barijere. Slijedom navedene hipoteze, cilj ovog istraživanja je izraditi te farmaceutsko-tehnološki i biofarmaceutski okarakterizirati nanostrukturirane nosače biomimetičkog sastava koji oponašaju lipidni matriks rožnatog sloja te ispitati njihov doprinos obnovi barijerne funkcije kože u polučvrstom dermalnom pripravku.

Specifični ciljevi istraživanja uključuju:

1. Probir sirovina za izradu funkcionalnih NLC-a koji će sadržavati ceramide i kolesterol u fiziološki relevantnom omjeru.
2. Razvoj i optimizaciju tehnološkog postupka za izradu funkcionalnih NLC-a u laboratorijskom mjerilu.
3. Tehnološka karakterizacija NLC-a obzirom na veličinu, elektrokinetička svojstva, koncentraciju, strukturna svojstva nanočestica te fizičku i mikrobiološku stabilnost njihovih disperzija.
4. Uklapanje optimirane NLC formulacije u hidrogel s ciljem unapređenja prikladnosti pripravka za nanošenje na kožu korištenjem sirovina prirodnog podrijetla s povoljnim utjecajem na kožu.
5. Reološka i teksturna karakterizacija kompozitnih hidrogelova uz praćenje pH vrijednosti formulacija s ciljem optimizacije njihovog sastava i analize utjecaja NLC-a na karakteristike gela.
6. Biofarmaceutska karakterizacija kompozitnih hidrogelova koja će uključivati ispitivanje biokompatibilnosti na staničnim kulturama keratinocita, *in vitro* ispitivanje okluzivnog učinka te ispitivanje potencijal razvijenih NLC gelova da obnove oštećenu epidermalnu barijeru na *ex vivo* modelu svinjskog uha.

3 MATERIJALI I METODE

Materijali i metodologija korištena u ovom istraživanju prethodno je opisana u radu (72), objavljenom na temelju rezultata ostvarenih tijekom izrade ove doktorske disertacije. U nastavku su prikazane ključne eksperimentalne procedure relevantne za razumijevanje dobivenih rezultata.

3.1 Materijali

Arganovo ulje (CAS br. 223747-87-3), α-tokoferil acetat (CAS br. 7695-91-2), pčelinji vosak (CAS br. 8012-89-3), kolesterol (CAS br. 57-88-5), glicerol (GLY, CAS br. 56-81-5), gliceril monostearat (GMS, CAS br. 31566-31-1), polisorbat 20 (polioksietilen (20) sorbitan monolaurat, CAS br. 9005-64-5), polisorbat 60 (polioksietilen (20) sorbitan monostearat, CAS br. 9005-67-8), polisorbat 80 (polioksietilen (20) sorbitan monooleat, CAS br. 9005-65-6), natrijev hijaluronat (HA, CAS br. 9067-32-7, mol. masa 1,5–2,0 × 10^6 Da) i ksantanska guma (CAS br. 11138-66-2) nabavljeni su od tvrtke Fagron (Zagreb, Hrvatska). Ceramid NG (N-acilirani sfingolipid koji se sastoji od sfinganina D-eritro konfiguracije sa zasićenim ili nezasićenim masnim kiselinama vezanim amidnom vezom, AS br. 100403-19-8 / 2304-80-5) nabavljen je od tvrtke Sederma S.A.S. (Le Perray-en-Yvelines, Francuska), dok je pentilen glikol (CAS br. 5343-92-0) kupljen od Cosmaderm GmbH (Wuppertal, Njemačka). Sukroza monostearat (C-1816, CAS br. 25168-73-4) i sukroza monopalmitat (P-1570, CAS br. 13039-41-3) donacija su tvrtke Mitsubishi Chemical Foods Corporation (Tokio, Japan). Pluronic F-68 (Poloxamer 188, CAS br. 9003-11-6) i Pluronic F-127 (Poloxamer 407 , CAS br. 9003-11-6) nabavljeni su od tvrtke BASF SE, Rheinland-Pfalz, Njemačka.

Za *in vitro* ispitivanja biokompatibilnosti korištena je HaCaT stanična linija keratinocita (Cell Line Services, Eppelheim, Njemačka). Za uzgoj staničnih kultura korišteni su Hanksova uravnotežena otopina soli (engl. *Hanks' balanced salt solution*, HBSS; pH 6,0; Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka), Dubleccov modificirani Eaglov medij (engl. *Dublecco's Modified Eagle Medium*, DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Sjedinjene Američke Države), fetalni goveđi serum (Biosera, Cholet, Francuska), otopina penicilina, streptomicina i amfotericina B (Lonza Group Ltd., Basel, Švicarska), fiziološka otopina puferirana fosfatom (PBS; Lonza Group Ltd., Basel, Švicarska), tripsin (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka) i otopina etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Sjedinjene Američke Države).

Sva ostala otapala i kemikalije korištene u ovom istraživanju bile su analitičkog stupnja čistoće i korištene su bez dodatnog pročišćavanja.

3.2 Priprema funkcionalnih NLC-ova

Protokol pripreme funkcionalnih NLC-ova uključivao je korištenje visokoturažnog homogeniziranja spregnutog s ultrazvučnim tretmanom (28,73). Lipidna faza, koja je sadržavala 2,0 g arganova ulja (tekući lipid) te 4,26 g pčelinjeg voska, 0,60 g ceramida NG, 0,30 g kolesterola i 1,56 g gliceril monostearata kao čvrste lipide, prethodno je zagrijana na 80 °C u termostatiranoj vodenoj kupelji (VK6X100DRT, InkoLab d.o.o., Zagreb, Hrvatska) radi potpunog taljenja čvrstih komponenti. Nakon toga je, uz umjereno miješanje, dodano 0,02 g α-tokoferol acetata i 5,00 g pentilen glikola, čime je dobivena homogena bistra uljna faza.

Vodena faza, koja je sadržavala 84,2 g destilirane vode i 1,56 g odabranog emulgatora, također je zagrijana na 80 °C te je potom postupno dodavana u rastaljenu lipidnu fazu uz kontinuirano miješanje. U ovom istraživanju kao emulgatori su korišteni derivati polisorbata (polisorbat 20, HLB 16,7; polisorbat 60, HLB 14,9; polisorbat 80, HLB 15,0), derivati sukroznih estera (sukrozni monostearat, HLB 16; sukrozni monopalmitat, HLB 15) te kopolimerni surfaktanti (Pluronic F-68, HLB 29; Pluronic F-127, HLB 22).

Emulgiranje faza provedeno je primjenom visokoturažne miješalice pri brzinama u rasponu od 12.000 do 20.000 okr/min (IKA Magic Lab (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Njemačka), opremljen ULTRA-TURRAX® UTC modulom) uz održavanje temperature na 80 °C. Dobivena emulzija zatim je podvrgnuta ultrazvučnoj obradi u ultrazvučnoj vodenoj kupelji (Bandelin Sonorex Digiplus DL510H, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Njemačka) zagrijanoj na 45 °C, pri čemu je tretirana ultrazvukom snage 360 W i frekvencije 35 kHz tijekom 10 minuta.

Nakon završene ultrazvučne obrade, disperzija NLC-a ohlađena je na sobnu temperaturu uz kontinuirano miješanje na magnetskoj miješalici (400 okr/min). Pripremljene formulacije zatim su prenesene u zatvorene tamne staklene bočice, označene prema vrsti korištenog surfaktanta (NLC_PS20, NLC_PS60, NLC_PS80, NLC_SS, NLC_SP, NLC_F68 i NLC_F127) te pohranjene pri 4 °C do daljnjih analiza. Za svaku NLC formulaciju pripremljena su i karakterizirana tri neovisna uzorka.

3.3 Fizikalno-kemijska karakterizacija funkcionalnih NLC-ova

3.3.1 Veličina čestica, indeks polidisperznosti, zeta potencijal i koncentracija NLC-a

Srednji hidrodinamički promjer (Z-average) i indeks polidisperznosti (PDI) pripremljenih NLC uzoraka određeni su metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti pri 25 °C, uporabom uređaja Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo), opremljenog He–Ne laserom valne duljine 633 nm i maksimalne snage 10 mW.

Prije analize, svaka NLC disperzija razrijeđena je 50 puta (v/v) destiliranom vodom kako bi se osigurali optimalni uvjeti mjerenja (48). Indeks loma čestica postavljen je na 1,45, a koeficijent apsorpcije na 0,01, pri čemu je voda korištena kao disperzni medij. Mjerenja su provedena u triplikatu pri 25 °C, uz vrijeme termostatiranja od 60 s prije svakog određivanja. Atenuacija laserskog snopa automatski je podešavana od strane instrumenta kako bi se osigurala odgovarajuća razina raspršenog signala, pri kutu detekcije od 174,7°.

Elektrokinetički ili zeta potencijal (ζ) pripremljenih NLC uzoraka određen je na istom instrumentu pri identičnim eksperimentalnim uvjetima. Elektroforetsko raspršenje svjetlosti mjereno je u triplikatu pri 25 °C, uz vrijeme termostatiranja od 60 s prije svakog određivanja. Atenuacija laserskog snopa i primijenjeni električni napon automatski su podešavani od strane instrumenta kako bi se osigurali optimalni uvjeti mjerenja.

Koncentracija čestica određena je metodom višekutnog dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *Multi-Angle Dynamic Light Scattering*, MADLS) korištenjem istog instrumenta i odgovarajućih eksperimentalnih postavki. Mjerenja provedena su pri trima kutovima detekcije: stražnji (174,7°), bočni (90°) i prednji (12,78°), uz vrijeme termostatiranja od 120 s. Sve postavke instrumenta bile su automatski optimizirane kako bi se osigurala pouzdanost i ponovljivost rezultata.

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (SD) triju neovisnih mjerenja.

3.3.2 Karakterizacija krutog stanja NLC-a

Za potrebe karakterizacije krutog stanja optimizirana NLC disperzija podvrgnuta je procesu liofilizacije korištenje uređaja Christ Epsilon 2-4 LSC Plus (Martin Christ

Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Njemačka). Zamrzavanje uzoraka provedeno je u staklenim bočicama napunjenima do visine približno 1 cm, pri −40 °C tijekom 2 sata. Nakon toga uslijedilo je primarno sušenje pri −20 °C i tlaku od 0,5 mbar u trajanju od 18 sati, dok je sekundarno sušenje provedeno pri 4 °C i tlaku od 0,05 mbar tijekom 6 sati. Dobiveni liofilizirani produkt je potom analiziran diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC) i rendgenskom difrakcijom praha (XRPD) (49).

DSC analiza liofilizirane NLC formulacije i početnih sirovina provedena je korištenjem Perkin-Elmer Diamond 7 direferncijalnog pretražnog kalorimetra (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, SAD), koji je najprije kalibriran indijem (99,98% čistoće; talište 156,61 °C, entalpija taljenja 28,71 J g^{-1}). Odvage uzoraka od 2 do 5 mg (Mettler M3 mikrovaga, Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Švicarska) hermetički su zatvorene u aluminijske posudice s probušenim poklopcima. Ispitivanje je provedeno u struji dušika (25 mL min^{-1}) pri brzini zagrijavanja od 10 °C min^{-1}, u temperaturnom rasponu od 20 do 160 °C.

XRPD difrakcijski dijagrami sirovina i liofiliziranog NLC-a snimljeni su na rendgenskom difraktometru Malvern Panalytical Empyrean (Malvern Panalytical B.V., Almelo, Nizozemska) u Braggovih kutova (2θ) od 3° do 40°. Kao izvor zračenja korištena je Cu Kα zračenje s valnim duljinama λ(Kα1) = 1,54056 Å i λ(Kα2) = 1,54439 Å, uz omjer intenziteta Kα1/Kα2 od 0,5. Radni napon cijevi iznosio je 45 kV, a katoda je bila zagrijavana strujom od 40 mA.

3.3.3 Ispitivanje fizičke stabilnosti NLC disperzija

Ubrzano ispitivanje fizičke stabilnosti provedeno je centrifugiranjem prema protokolu opisanom u radu Gonçalves i sur. (74). Odabrana NLC disperzija najprije je razrijeđena pročišćenom vodom (1:100, v/v), a zatim podvrgnuta dvama uzastopnim ciklusima centrifugiranja pri 3000 × g na centrifugi Thermo Scientific Heraeus Biofuge Stratos High-Speed Benchtop Centrifuge (Dreieich, Njemačka) tijekom 15 minuta. Nakon svakog ciklusa uzorci su vizualno pregledani radi utvrđivanja pojave destabilizacijskih procesa, uključujući faznu separaciju, vrhnjenje (engl. *creaming*) i flokulaciju. Istodobno su određeni srednji hidrodinamički promjer, indeks polidisperznosti (PDI) i zeta potencijal, sukladno prethodno opisanom postupku.

Ispitivanje fizičke stabilnosti u stvarnom vremenu provedeno je pohranom odabranih NLC disperzija u hermetički zatvorenim staklenim posudama pri 25 °C ± 2 °C / 60 % RH i 4 °C ± 2 °C. Uzorci su analizirani u unaprijed definiranim vremenskim točkama (0, 30, 60, 90, 120 i 180 dana),

pri čemu su određivani veličina čestica, PDI i zeta potencijal primjenom prethodno opisanih analitičkih metoda.

3.4 Ispitivanje djelotvornosti protumikrobnih konzervansa

Ispitivanje mikrobiološke stabilnosti optimalne NLC disperzije provedeno je u skladu s monografijom Europske farmakopeje (Ph. Eur. 10), poglavlje 5.1.3 Djelotvornost protumikrobnih konzervansa (75). Serije NLC disperzija, smještene u prethodno sterilizirane plastične posude, inokulirane su pojedinačno ispitnim mikroorganizmima: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231 i *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Inokulacija je provedena tako da se postigne početna koncentracija od 10^5–10^6 CFU g^{-1} pripravka.

Nakon inokulacije, uzorci su homogenizirani blagim miješanjem kako bi se osigurala ravnomjerna raspodjela mikroorganizama te su pohranjeni pri 22,5 ± 2,5 °C, zaštićeni od svjetlosti. U unaprijed definiranim vremenskim točkama (npr. 2, 7, 14 i 28 dana), iz uzoraka su uzimani alikvoti te je određivan broj živih mikroorganizama metodom odgovarajućeg razrjeđenja i nasijavanja na selektivne hranjive podloge.

Dobiveni rezultati izraženi su kao logaritamska promjena broja održivih mikroorganizama u odnosu na početnu vrijednost te su interpretirani u skladu s kriterijima prihvatljivosti propisanima Europskom farmakopejom za odgovarajući tip pripravka.

3.5 Izrada hidrogelova s uklopljenim NLC-ima

Optimirana NLC disperzija uklopljena je u hidrogel sastavljen od natrijeva hijaluronata (HA, 1,0%, m/m) i ksantanske gume (XA) u različitim koncentracijama (0,5; 1,0; 1,5 i 2,0%, m/m). Priprava hidrogelova s NLC-ima provedena je korištenjem uređaja FagronLab™ PRO unguator (Fagron B.V., Capelle aan den IJssel, Nizozemska), koji omogućuje kontroliranu i reproducibilnu izradu polučvrstih pripravaka.

Polovica ukupne količine NLC disperzije najprije je prenesena u FagronLab™ posudu, nakon čega je dodan glicerol (10%, m/m) kao humektans te odgovarajuće količine natrijevog hijaluronata i ksantanske gume. Na kraju je dodana preostala količina NLC disperzije. Miješanje je provedeno tijekom ukupno 26 minuta, primjenom šest izmjeničnih intervala brzine i trajanja (600 o/min tijekom 485 s i 510 s, te 1400 o/min tijekom 30 s), čime je ostvarena učinkovita

hidratacija polimera i istodobno očuvana fizikalna stabilnost NLC disperzije. Takav protokol omogućuje postizanje ujednačene strukture gela uz minimalno mehaničko opterećenje disperznog sustava.

Kontrolni hidrogelovi bez uklopljenih NLC-a pripravljeni su identičnim postupkom, pri čemu je NLC disperzija zamijenjena vodenom otopinom koja je sadržavala glicerol (10%, m/m) i pentilen glikol (5%, m/m), kako bi se osigurala usporedivost sastava kontinuirane faze i reoloških svojstava pripravaka.

3.6 Ispitivanja reoloških svojstava hidrogelova

Ispitivanje reoloških svojstava pripremljenih hidrogelova provedeno je na modularnom kompaktnom reometru serije MCR 102 (Anton Paar GmbH, Graz, Austrija) opremljenom s Peltierovim sustavom za kontrolu temperature. Rotacijska mjerenja provedena su koristeći mjerni sustav stožac/ploča, odnosno mjerno tijelo CP50 (engl. *cone plate*, promjera 50 mm i nagiba 1 °), dok su oscilacijska mjerenja provedena koristeći sustav paralelnih ploča, odnosno mjerno tijelo PP50 (engl. *parallel plate*, promjera 50 mm). Svi eksperimentalni podaci prikupljeni tijekom mjerenja obrađeni su i analizirani pomoću RheoCompass TM, verzija Light 1.23.403 (Anton Paar GmbH, Graz, Austrija). Sva reološka mjerenja su provedena u triplikatu.

3.6.1 Krivulja viskoznosti

Rotacijskim testom mjerena je ovisnost viskoznosti o gradijentu brzine smicanja ($\dot{\gamma}$) u rasponu od 0,1 do 100 s^{-1} (76). Kao mjerno tijelo korišten je mjerni stožac CP50-1 pri fiksnoj udaljenosti od donjeg mjernog tijela (ploče) koja iznosi 0,102 mm. Svi uzorci prethodno su termostatirani na 32 °C tijekom 3 minute.

3.6.2 3-intervalni test tiksotropije

3-intervalni test tiksotropije (3-ITT) korišten je za procjenu tiksotropijskih svojstava razvijenih hidrogelova. Mjerenja su provedena na 32 °C koristeći mjerni stožac CP50-1 pri fiksnoj udaljenosti od donjeg mjernog tijela od 0,102 mm. U prvom intervalu viskoznost ispitivanog uzorka mjerena je gradijentu brzine smicanja od 1 s^{-1} tijekom 10 s. U drugom intervalu primijenjen je gradijent brzine smicanja od 1000 s^{-1} tijekom 5 s. U trećem intervalu viskoznost je ponovno mjerena pri početnoj vrijednosti gradijenta brzine smicanja od 1 s^{-1} tijekom 65 s. Svi uzorci analizirani su u triplikatu.

3.6.3 Test promjene amplitude

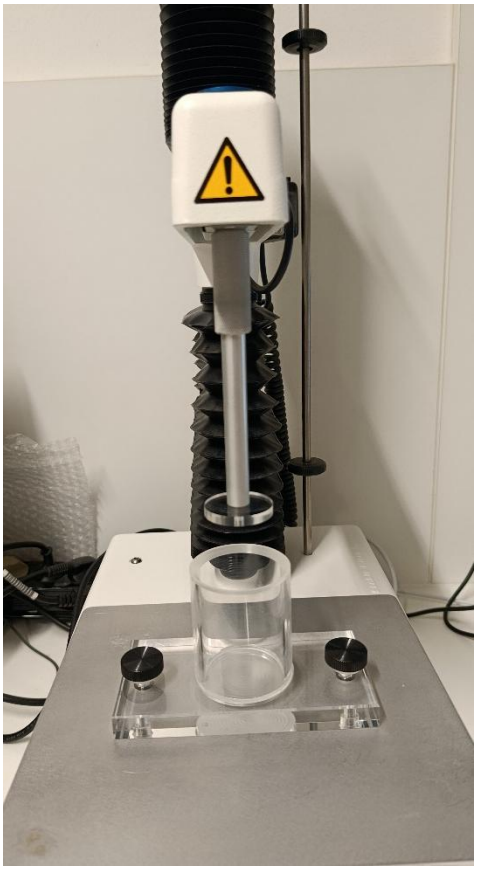
Test promjene amplitude primijenjen je za određivanje linearnog viskoelastičnog područja (engl. *linear viscoelastic range,* LVE), odnosno smične deformacije pri kojoj će se izvoditi test promjene frekvencije te za procjenu mehaničkih karakteristika gela te za procjenu mehaničkih svojstava gela (77). Mjerenja su provedena koristeći mjerno tijelo PP50 pri fiksnoj udaljenosti od donjeg mjernog tijela (ploče) od 0,500 mm. Nakon nanošenja, uzorci hidrogelova su termostatirani na 32 °C tijekom 3 minute. Vrijednosti modula pohrane (G′) i modula gubitka (G″) određene su pri stalnoj kutnoj frekvenciji od 1 rad s^{-1}, u rasponu relativne amplitude od 0,1 do 100%. Za svaki uzorak mjerenje je provedeno u triplikatu.

3.6.4 Test promjene frekvencije

S ciljem ispitivanja stabilnosti odabranih hidrogelova proveden je oscilacijski test promjene frekvencije (78). Mjerenja su provedena koristeći PP50 mjernu ploču na fiksnoj udaljenosti od donjeg mjernog tijela (ploče) od 0,500 mm. Nakon nanošenja, uzorci hidrogelova su termostatirani na 32 °C tijekom 3 minute. Mjerenja su rađena u području kutne frekvencije od 0,1 do 100 rad s^{-1} određena je pri amplitudi deformacije od 1%, odabranoj unutar linearnog viskoelastičnog područja.

3.7 Teksturna analiza

Za ispitivanje teksturnih svojstava korišten je teksturni analizator TA.XT Plus (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, Ujedinjeno Kraljevstvo), opremljen ćelijom za mjerenje sile nosivosti 5 kg, a sva mjerenja provedena na sobnoj temperaturi.



Slika 8. Teksturni analizator TA.XT Plus (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, Ujedinjeno Kraljevstvo) s mjernim sustavom za mjerenje teksturnih svojstava polučvrstih pripravaka.

Teksturna svojstva pripravaka ispitana su metodom povratne ekstruzije uz korištenje sonde u obliku diska, promjera 40 mm (Slika 8). Oko 75 g uzorka ispitivanog hidrogela preneseno je u standardni cilindrični spremnik promjera 50 mm, pri čemu se vodilo računa o izbjegavanju uklapanja mjehurića zraka i osiguravanju ravne površine uzorka. Tijekom mjerenja, sonda je uronjena u uzorak do dubine od 20 mm pri brzini od 2 mm/s, nakon čega je vraćena u početni položaj brzinom od 20 mm/s. Pri tome je kontinuirano bilježena promjena sile u funkciji vremena te je konstruiran odgovarajući dijagram. Parametri teksture određeni su iz dobivenih dijagrama pri čemu je maksimalna sila kompresije (u g) definirana kao tvrdoća gela, odnosno otpor uzorka deformaciji pri kompresiji. Kohezivnost je određena kao rad potreban za deformaciju sustava tijekom faze uranjanja sonde (površina ispod krivulje), dok je adhezivnost definirana kao površina negativnog dijela krivulje tijekom faze povlačenja sonde (79,80).



Slika 9. Teksturni analizator TA.XT Plus (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, Ujedinjeno Kraljevstvo) s TTC mjernim sustavom za mjerenje razmazivosti polučvrstih pripravaka.

Razmazivost hidrogelova određena je primjenom TTC nastavka za ispitivanje razmazivosti (81). TTC nastavak za ispitivanje razmazivosti sastoji se od para muškog i ženskog konusa s kutom od 45°, načinjenih od pleksiglasa (Slika 9). Ispitivani se uzorak smješta u udubinu ženskog konusa koji je fiksiran na postolju uređaja, dok je muški konus pričvršćen na pomičnu nosivu glavu analizatora. Tijekom ispitivanja muški konus penetrira u uzorak brzinom od 5 mm/s na udaljenost od 23 mm, uzrokujući njegovo radijalno širenje između konusnih površina, pri čemu se mjeri sila potrebna za deformaciju i razmazivanje sustava u zavisnosti o vremenu. Kao pokazatelji razmazivosti određeni su maksimalna sila i rad smicanja, izračunat kao površina ispod pozitivnog dijela krivulje koja pokazuje ovisnost izmjerene sile o vremenu. Mjerenja su provedena u tri ponavljanja za svaki uzorak.

3.8 Mjerenja pH vrijednosti

pH vrijednosti praznih HaXa hidrogelova i hidrogelova s NLC-ima određene su pomoću modularnog uređaja za istovremeno mjerenje pH vrijednosti i električne vodljivosti (Mettler S47 SevenMulti™, Mettler-Toledo, Greifensee, Švicarska) opremljenog elektrodom za viskozne uzorke (Mettler InLab® Viscous). Mjerenja su provedena na nerazrijeđenim uzorcima u triplikatu. pH vrijednost NLC disperzije određena je primjenom elektrode InLab® Expert Pro-ISM (Mettler-Toledo, Greifensee, Švicarska), također na nerazrijeđenim uzorcima, pri čemu su mjerenja izvedena u triplikatu.

3.9 Ispitivanje biokompatibilnosti *in vitro*

3.9.1 Uvjeti uzgoja stanične kulture

Humana stanična linija keratinocita HaCaT uzgajana je u Dulbeccoovu modificiranom Eagleovu mediju (DMEM) dodatno obogaćenom s 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS) i 1 % otopine penicilina, streptomicina i amfotericina B. Uzgoj stanica proveden je u inkubatoru (Heracell VIOS 160i CO_2 Incubator, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Sjedinjene Američke Države) pri temperaturi od 37 °C, relativnoj vlažnosti od 95 % i u atmosferi koja sadrži 5 % CO_2. Hranjivi medij mijenjan je svaka dva dana. Stanice su presađivane nakon postizanja 80–90 % konfluentnosti koja je praćena promatranjem pomoću invertnog mikroskopa (Primovert, Carl ZeissAG, Njemačka). Prilikom presađivanja, za odjeljivanje stanica od podloge korištena je smjesa tripisina (0,25 %, V/V; Capricorn Scientific GmbH, Njemačka) i EDTA (0,02 %, V/V; Sigma Aldrich, SAD) u fosfatnom puferu pH 7,4 (engl. *phosphatebuffered saline*, PBS; Lonza, Švicarska). Stanice su razrjeđivane u omjerima od 1:5 do 1:10, a u ispitivanjima biokompatibilnosti korištene su stanice između 8. i 10. pasaže.

Ljudska keratinocitna linija HaCaT uzgajana je u DMEM mediju obogaćenom s 10% FBS-a te 1% mješavine penicilina, streptomicina i amfotericina B. Medij je mijenjan svaka 2 dana, a stanice su pasirane pri dosezanju 80–90% konfluencije. Kultura je održavana u inkubatoru Heracell VIOS 160i CO_2 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SAD) na 37 °C, pri 95% relativne vlažnosti i u atmosferi s 5% CO_2. Odvajanje stanica od podloge provedeno je najprije inkubacijom u EDTA otopini, a potom tretmanom tripsinom/EDTA-om (0,25%/0,02% u PBS-u). Dobivena stanična suspenzija potom je podvrgnuta centrifugiranju pri 300×g tijekom 3 minute (laboratorijska rahshladna centrifuga 5702 R, Eppendorf SE, Hamburg, Njemačka), nakon čega je supernatant

uklonjen, a stanični pelet resuspendiran u svježem hranjivom mediju u omjerima od 1:5 do 1:10. Za ispitivanja biokompatibilnosti korištene su stanice iz pasaža 8–10 (57,58,82).

3.9.2 In vitro ispitivanje biokompatibilnosti hidrogela s uklopljenim NLC

In vitro biokompatibilnost optimalne NLC disperzije, vodeće formulacije hidrogela (NLC_HaXa_0.5) i pripadajućih kontrolnih uzoraka ispitana je primjenom kolorimetrijskog testa s 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolijevim bromidom (MTT) (57,58). U tu svrhu stanice su nasađene u ploče s 96 jažica 96 jažica s polikarbonatnim umetcima (Transwell®, Corning Costar, Corning Inc., Corning, NY, Sjedinjene Američke Države) u gustoći od 1×10^4 stanica po jažici. Nakon 48 h, stanice su isprane sterilnim HBSS-om te tretirane ispitivanim formulacijama pomiješanim s HBSS-om u volumenskim omjerima od 1:2 do 1:100 000 tijekom 2 h pri 37 °C. Kao kontrolni uzorci ispitan je HaXa hidrogel bez uklopljenih NLC-a koji je sadržavao glicerol i pentilen glikol ($HaXA_{PG+GL}$), HaXa hidrogel bez uklopljenih NLC-a i glicerola ($HaXA_{PG}$) te HaXa hidrogel bez uklopljenih NLC-a, glicerola i pentilen glikola (HaXa). Također, zasebno je ispitana je i biokompatibilnost glicerola i pentilen glikola. Svi ovi uzorci nanošeni su na stanice u volumenskim omjerima od 1:2 do 1:20. Kao negativna kontrola korištena je čista HBSS. Svaka formulacija ispitana je u četiri paralelna uzorka.

Nakon tretmana, formulacije su uklonjene iz jažica, stanice su ponovno isprane HBSS-om te inkubirane u svježem hranjivom mediju. Vijabilnost stanica određena je nakon 24 h primjenom MTT testa. MTT je otopljen u sterilnoj fosfatno puferiranoj fiziološkoj otopini (PBS) u koncentraciji od 2,5 mg/mL te razrijeđen DMEM-om do konačne koncentracije od 0,5 mg/mL. Stanice su inkubirane s otopinom MTT-a (100 µL po jažici) tijekom 45 min, nakon čega je reagens uklonjen, stanice su lizirane, a nastali kristali formazana otopljeni u 100 µL kiselog izopropanola (4 % 1 M HCl u izopropanolu, v/v).

Količina nastalog formazana određena je spektrofotometrijski pomoću čitača mikroploča SpectraMax i3x (Molecular Devices LLC, San Jose, CA, Sjedinjene Američke Države) pri valnoj duljini od 570 nm. Vijabilnost stanica izračunata je u odnosu na kontrolu (stanice inkubirane u HBSS-u) prema jednadžbi:

$$Vijabilnost\ stanica\ (\%) = \frac{A_{uzorak} - A_{izopropanol}}{A_{kontrola} - A_{izopropanol}} \times 100$$

gdje A_{uzorak} predstavlja apsorbanciju otopine kristala formazana nastalih u stanicama izloženim ispitivanim formulacijama, $A_{kontrola}$ predstavlja apsorbanciju otopine kristala formazana nastalih u jažicama izloženim čistom HBSS puferu, a $A_{izopropanol}$ je apsorbancija čistog izopropanola pri istoj valnoj duljini.

3.10 *In vitro ispitivanje* okluzivnog učinka

In vitro ispitivanje okluzivnosti hidrogelova sa i bez uklopljenih NLC-a provedeno je primjenom PTFE imerzijskih ćelija s podesivim volumenom i kontaktnom površinom od 4 cm² (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Sjedinjene Američke Države). Spremnik ćelije napunjen je s 1 mL pročišćene vode te prekriven membranom (filtri od regenerirane celuloze, veličine pora 0,2 μm; Sartorius, Göttingen, Njemačka). Nakon sastavljanja sustava, na membranu je naneseno 1 g ispitivanog uzorka hidrogela, koji je špatulom ravnomjerno raspoređen po površini membrane u obliku tankog sloja.

Ćelije su inkubirane u klimatskoj komori (ICH110eco Climate Chamber, Memmert GmbH, Schwabach, Njemačka) pri temperaturi od 32 °C i relativnoj vlažnosti zraka od 50 %, čime su simulirani uvjeti na površini kože. U unaprijed definiranim vremenskim točkama zaostala količina vode u spremniku određivana je gravimetrijski (Mettler Toledo ML204T, Hessen, Njemačka), kako bi se procijenio gubitak vode uslijed isparavanja kroz membranu i sloj hidrogela. Sva mjerenja provedena su u triplikatu za svaki uzorak. Kao negativna kontrola korištene su ćelije bez nanesenog uzorka hidrogela, dok je vazelin korišten kao pozitivna kontrola.

Faktor okluzivnosti za svaku vremensku točku izračunat je prema jednadžbi:

$$Faktor\ okluzivnosti\ (\%) = \frac{A - B}{A} \times 100$$

gdje A označava gubitak vode u sustavu bez nanesenog uzorka, a B gubitak vode u prisutnosti uzorka. Vrijednost faktora okluzivnosti jednaka nuli ukazuje na izostanak okluzivnog učinka, dok vrijednost 100 predstavlja maksimalni okluzivni učinak (79,83).

3.11 *Ex vivo* test hidratacije kože

Ex vivo test hidratacije kože proveden je na modelu svinjskog uha (59,60,65), za što je ishođena suglasnost Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta (Klasa 004-01/24-03/01; ur. broj: 251-62-03-24-9, od 1. veljače 2024).

Svježe svinjske uši pribavljene su iz lokalne klaonice te su korištene unutar 2 sata nakon klanja. Uši su najprije isprane mlakom vodom, a potom osušene mekim papirnatim ručnikom. Odabrana su intaktna područja kože dimenzija 2,5 × 2,5 cm, bez vidljivih oštećenja ili ogrebotina, koja su zatim označena. Dlake unutar odabranih područja pažljivo su skraćene na duljinu od približno 1 mm pomoću šišača. Pripremljeni uzorci kože inkubirani su u klimatskoj komori (ICH110eco Climate Chamber, Memmert GmbH, Schwabach, Njemačka) 30 min pri 32 °C i relativnoj vlažnosti zraka od 50 % radi stabilizacije uvjeta (63). Nakon toga određene su početne vrijednosti hidratacije kože primjenom uređaja Multi Skin Test Center 1000 opremljenog sondom za određivanje hidratacije temeljem mjerenja kapacitancije (Courage + Khazaka Electronic GmbH, Köln, Njemačka) (64). Za svako odabrano područje provedena su tri neovisna mjerenja na različitim mjestima kako bi se izbjegle pogreške uzrokovane lokalnom maceracijom kože.

Nakon toga, integritet epidermalne barijere narušen je modificiranim postupkom prema Čuríková-Kindlová i sur. (84). Ukratko, na svako označeno područje postavljen je komad staničevine natopljen 10 % otopinom natrijevog lauril sulfata, koji je ostavljen djelovati tijekom 8 h. Petrijeve zdjelice s uzorcima svinjskih ušiju prekrivene su parafilmskom folijom radi sprječavanja isparavanja te inkubirane pri 32 °C i 50 % relativne vlažnosti zraka u klimatskoj komori. Nakon uklanjanja staničevine netopljene SLS-om, koža je temeljito isprana i osušena mekim papirnatim ručnikom.

Na tri različita područja kože na tri zasebne svinjske uške naneseno je po 100 µL svake formulacije (HaXa_0.5 i NLC_HaXa_0.5), koje su ravnomjerno raspoređene po površini kože špatulom. Jedno označeno područje na svakoj uši ostavljeno je netretirano i služilo je kao kontrola. Nakon primjene pripravaka, uzorci su ponovno inkubirani pri 32 °C i relativnoj vlažnosti od 50 % tijekom 1 h, nakon čega su ponovno izmjerene vrijednosti hidratacije kože prema prethodno opisanom postupku. Prije mjerenja eventualni ostaci pripravka pažljivo su uklonjeni papirnatim ručnikom.

Relativna promjena hidratacije kože (engl. *skin hydration level*, ΔSHL) izračunata je prema jednadžbi (63,64):

$$\Delta SHL(\%) = 100 \times \frac{SHL_1 - SHL_0}{SHL_0}$$

gdje SHL_0 označava početnu vrijednost hidratacije kože prije narušavanja epidermalne barijere, a SHL_1 vrijednost hidratacije izmjerenu 1 h nakon primjene formulacije.

3.12 Statistička obrada podataka

Svi rezultati prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) iz *N neovisnih* mjerenja. Statistička obrada podataka provedena je primjenom programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Boston, MA, Sjedinjene Američke Države).

Za usporedbu srednjih vrijednosti između skupina s jednom neovisnom varijablom korištena je jednofaktorska analiza varijance (one-way ANOVA), uz naknadni Dunnettov test višestrukih usporedbi. Za usporedbu skupina s dvjema neovisnim varijablama primijenjena je dvofaktorska analiza varijance (two-way ANOVA), nakon koje je proveden Tukeyjev test višestrukih usporedbi.

Vrijednosti $p \leq 0,05$ smatrane su statistički značajnima.

4 REZULTATI I RASPRAVA

Dio rezultata prikazanih u ovom poglavlju prethodno je objavljen u radu (72), nastalom u okviru provedbe doktorskog istraživanja. Rezultati su ovdje prikazani radi cjelovite prezentacije i rasprave svih spoznaja proizašlih iz disertacije.

4.1Priprema i optimizacija NLC disperzije

U ovom radu, za razvoj NLC-a pozornost je usmjerena na primjenu prirodnih sirovina, uvažavajući recentne preferencije potrošača prema kozmetičkim pripravcima baziranim na sirovinama prirodnog podrijetla te snažnim pritiskom održivosti ponajprije zbog činjenice da kozmetički proizvodi imaju životni ciklus s višestrukim utjecajem na okoliš, od dobave sirovina, proizvodnje, transporta, uporabe pa sve do odlaganja ambalaže (85). Temeljem opsežnih preliminarnih istraživanja koja nisu prikazana u ovome radu, kao tekući lipid odabrano je arganovo ulje, koje pokazuje sličan sastav estera glicerola kao i lipidi prisutni u ljudskom sebumu, čime pridonosi očuvanju hidratacije kože i podržava liječenje akni, ožiljaka i bora, uz dodatnu zaštitu od UV-B zračenja. Arganovo ulje je kompleksna smjesa u kojoj dominiraju trigliceridi bogati nezasićenim masnim kiselinama, osobito oleinskom (ω-9) i linolnom (ω-6), koje čine ključne komponente međustaničnog lipidnog cementa rožnatog sloja. Njihova sposobnost uklapanja u lipidne lamelarne strukture omogućuje obnavljanje narušene epidermalne barijere i smanjenje transepidermalnog gubitka vode, dok istodobno sudjeluju u sintezi eikozanoida koji reguliraju upalne procese u koži (86). Osim trigliceridne frakcije, arganovo ulje sadrži i neosapunjivu frakciju (≈2–3%) bogatu fitosterolima, skvalenom, karotenoidima i polifenolima, koji doprinose stabilnosti lipida te pokazuju antioksidativno i protuupalno djelovanje. Posebno važnu ulogu imaju tokoferoli (vitamin E), čija prisutnost osigurava zaštitu lipida od peroksidacije, neutralizaciju reaktivnih kisikovih vrsta te očuvanje strukturnog integriteta staničnih membrana keratinocita. Zbog amfifilnih svojstava pojedinih komponenti, arganovo ulje može djelovati i kao blagi okluziv, stvarajući diskontinuirani zaštitni film koji smanjuje isparavanje vode, bez blokiranja pora kože (87,88).

Kao čvrsti lipid u razvoju NLC-a odabran je pčelinji vosak, prirodni pčelinji proizvod koji djeluje okluzivno stvarajući zaštitni film na površini kože, čime smanjuje transepidermalni gubitak vode i zadržava vlagu. Osim toga, pčelinji vosak djeluje kao emolijens koji omekšava i umiruje kožu te može ublažiti simptome povezanih dermatoloških stanja, poput dermatitisa i psorijaze. Po svom kemizmu, pčelinji vosak je kompleksna smjesa dugolančanih alkana, alkena, slobodnih masnih kiselina i estera (mono- i diestera), što uvjetuje njegovu nisku topljivost u vodi i izražena

okluzivna svojstva. Upravo ta struktura omogućuje stvaranje zaštitnog filma na površini kože koji ograničava transepidermalni gubitak vode i doprinosi održavanju hidratacije rožnatog sloja. Dodatno, prisutnost propolisa i fenolnih spojeva u vosku povezana je s antioksidativnim, antimikrobnim i protuupalnim djelovanjem, što je osobito važno u kontekstu očuvanja ravnoteže mikrobioma kože i prevencije upalnih dermatoza. Kao fizikalni modifikator, pčelinji vosak također utječe na reološka svojstva formulacije, povećavajući viskoznost i stabilnost, što dodatno doprinosi kontroliranom oslobađanju uklopljenih djelatnih tvari iz NLC sustava (89–91). Pčelinji vosak se smatra sigurnim i dobro podnošljivim sastojkom u dermokozmetičkim i farmaceutskim pripravcima, što proizlazi iz njegove biokompatibilnosti i niske toksičnosti što potvrđuje njegov povoljan sigurnosni profil tijekom dugogodišnje kliničke primjene. Rizik od nuspojava je minimalan i uglavnom se odnosi na rijetke alergijske reakcije, najčešće povezane s nečistoćama poput propolisa. Ključni sigurnosni izazovi vezani su uz kvalitetu sirovine, uključujući mogućnost kontaminacije pesticidima i krivotvorenja pčelinjeg voska parafinskim voskovima, zbog čega je nužna stroga kontrola sastava i podrijetla. Uz povoljan sigurnosni profil, pčelinji vosak pokazuje i dodatna bioaktivna svojstva, uključujući protuupalno i zaštitno djelovanje na epidermalnu barijeru, čime potvrđuje svoju vrijednost u suvremenim dermokozmetičkim formulacijama (90).

Pentilen glikol je kratkolančani 1,2-glikol s izraženim hidrofilnim svojstvima zbog čega djeluje kao dobro otapalo. U kozmetičkim formulacijama djeluje prvenstveno kao humektans i sredstvo za kondicioniranje kože, sposobno vezati i zadržavati vodu u rožnatom sloju, čime izravno doprinosi hidrataciji i elastičnosti kože. Osim toga, pentilen glikol djeluje i kao konzervans, inhibirajući rast mikroorganizama te povećavajući mikrobiološku stabilnost formulacije. Nadalje, djeluje i kao pojačivač permeacije tvari u/kroz kožu, čime može povećati bioraspoloživost aktivnih tvari unutar epidermisa. Temeljem navedenog, pentilen glikol ima dvostruku funkciju u očuvanju epidermalne barijere: izravnu, putem hidratacije, i neizravnu, putem stabilizacije formulacije i poboljšanja bioraspoloživosti aktivnih sastojaka (92,93).

α-tokoferol (vitamin E), kao dominantni lipofilni antioksidans u koži, predstavlja ključnu komponentu u zaštiti epidermalne barijere od oksidativnog stresa. Njegova kemijska struktura, koja uključuje kromanolni prsten s hidroksilnom skupinom i hidrofobni izoprenoidni lanac, omogućuje mu lokalizaciju u lipidnim dvoslojevima i učinkovito hvatanje slobodnih radikala. Neutralizacijom lipidnih peroksilnih radikala α-tokoferol prekida lančane reakcije lipidne peroksidacije i štiti

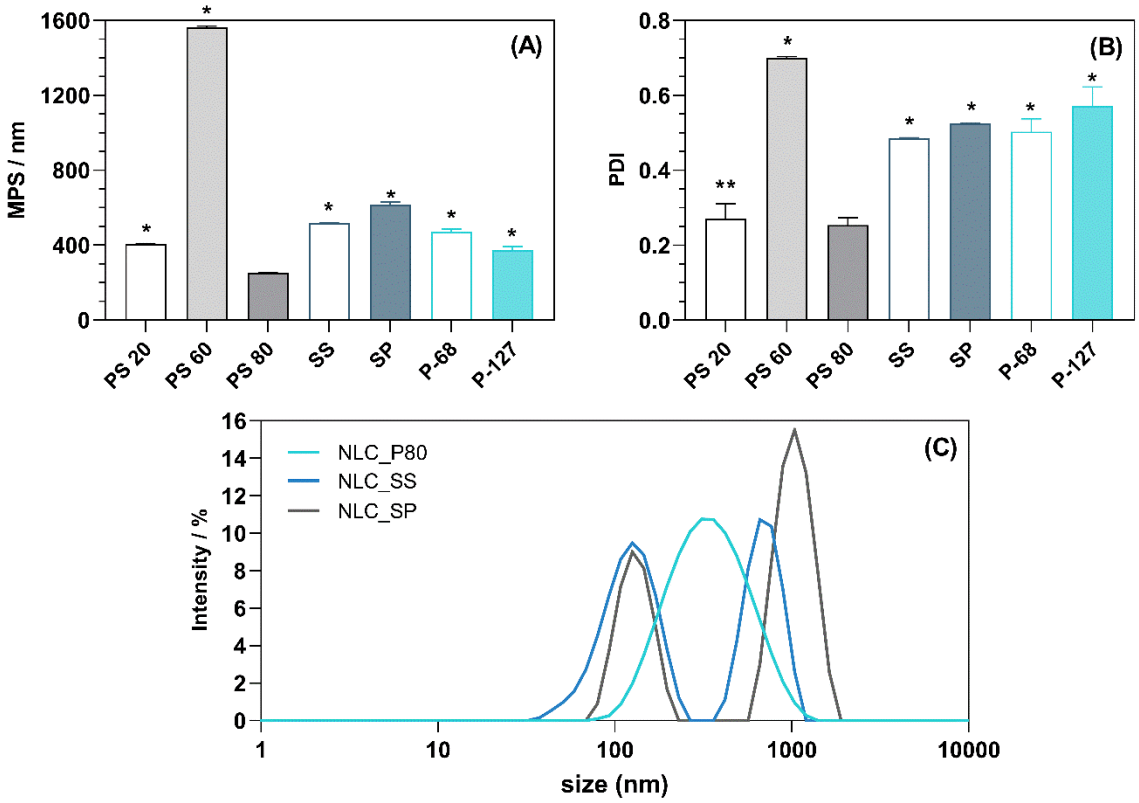
polinezasićene masne kiseline u membranama i međustaničnom cementu. U fiziološkim uvjetima distribuira se u rožnatom sloju putem diferencijacije keratinocita i sekrecije iz lojnih žlijezda, stvarajući koncentracijski gradijent koji odražava zaštitne potrebe površinskih slojeva kože. U topikalnim pripravcima se obično primjenjuje u rasponu koncentracija od 0.1 do 1%. Njegova prisutnost stoga ima ključnu ulogu u očuvanju integriteta epidermalne barijere, usporavanju procesa starenja kože i zaštiti od UV-induciranih oštećenja (94–96).

Integracijom navedenih komponenti u NLC sustav pretpostavlja se sinergijski učinak pri čemu arganovo ulje obnavlja međustanični lipidni sloj i osigurava nutrijente, pčelinji vosak stabilizira strukturu i smanjuje gubitak vode, pentilen glikol održava hidrataciju i mikrobiološku stabilnost, dok α-tokoferol štiti lipide i stanice od oksidativnih oštećenja. Takva kombinacija izravno doprinosi očuvanju funkcionalne cjelovitosti epidermalne barijere, što je ključno za održavanje zdravlja kože. Nadalje, ceramid NG i kolesterol odabrani su kao strukturni i funkcionalni lipidi te su uklopljeni u NLC sustave u fiziološkom omjeru masa 2:1, što je u skladu s njihovom ključnom ulogom u formiranju epidermalne barijere (7,9,11,12).

Funkcionalni NLC-i pripremljeni su postupkom visokoturažnog homogeniziranja spregnutog s ultrasonikacijom. Visokoturažno homogeniziranje primijenjeno je za procesuiranje rastaljene lipidne faze s unaprijed zagrijanom vodenom fazom koja je sadržavala surfaktant, dok je dodatni korak ultrazvučne obrade korišten za daljnju homogenizaciju sustava i usitnjavanje dispergiranih lipidnih domena. Iako se tretman ultrazvučnom sondom općenito smatra učinkovitijim u usitnjavanju dispergiranih lipidnih domena od obrade u ultrazvučnoj kupelji, njezina primjena može dovesti do kontaminacije uzorka metalima koji se odvajaju od ultrazvučne sonde zbog mehaničkog stresa, zbog čega je u ovom radu odabrana kupelj uz optimizaciju vremena ultrasonikacije kako bi se postigla ciljana veličina čestica bez pretjeranog zagrijavanja disperzije (28).

Pri pripremi NLC-a surfaktanti se primarno koriste za smanjenje međupovršinske napetosti između lipidne i vodene faze te za osiguravanje visokog stupnja usitnjenja lipidnih kapljica, dok nakon hlađenja disperzije i formiranja NLC-a surfaktanti osiguravaju fizičku stabilnost disperzije tijekom skladištenja (30). Odabir surfaktanata temelji se na putu primjene i vrijednosti hidrofilno-lipofilne ravnoteže (HLB), koja mora biti usklađena s HLB vrijednošću uljne faze formulacije (28). Taj je postupak osobito izazovan pri uporabi lipida prirodnog podrijetla zbog

varijabilnosti u sastavu sirovina iz različitih proizvodnih šarži i često nedostupnih podataka o HLB vrijednosti, kao što je slučaj s ceramidom NG. Stoga je ispitan niz surfaktanata u kombinaciji s gliceril monostearatom u istom masenom omjeru, oslanjajući se na poznati sinergizam gliceril monostearata s drugim surfaktantima koji pogoduje stvaranju stabilnih emulzija (97). Preliminarna istraživanja, čiji rezultati nisu prikazani u ovom radu su pokazala da bez primjene gliceril monostearata nije moguće prirediti NLC-e željenog sastava u ciljnom rasponu veličine čestica. Nadalje, podaci iz literature sugeriraju da uporaba više surfaktanata istodobno učinkovitije smanjuje PDI u odnosu na formulacije s jednim surfaktantom (98). U ovoj fazi razvoja pre-emulzija je pripravljana pri brzini homogenizacije od 12 000 o/min. Pripremljene NLC disperzije karakterizirane su obzirom na srednji promjer čestica, indeks polidisperznosti i raspodjelu veličina (Slika 10), dok su vrijednosti zeta potencijala za iste sustave i koncentracije formiranih NLC-ova prikazane na Slikama 11 i 12.



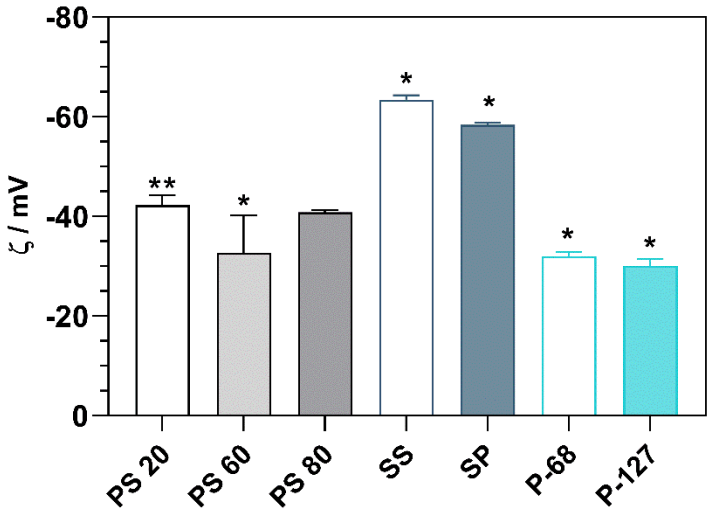
Slika 10. Utjecaj odabranih smjesa emulgatora i gliceril monostearata na svojstva formiranih NLC-a procesiranih pri 12 000 rpm: srednja veličina čestica (MPS, A), indeks polidisperznosti (PDI, B)

i raspodjela veličine čestica za odabrane uzorke. Jedna zvjezdica (*) označava statistički značajnu razliku u usporedbi s PS80 ($p < 0,0001$), dok dvije zvjezdice (**) označavaju statistički neznačajnu razliku u usporedbi s PS80 ($p > 0,05$).

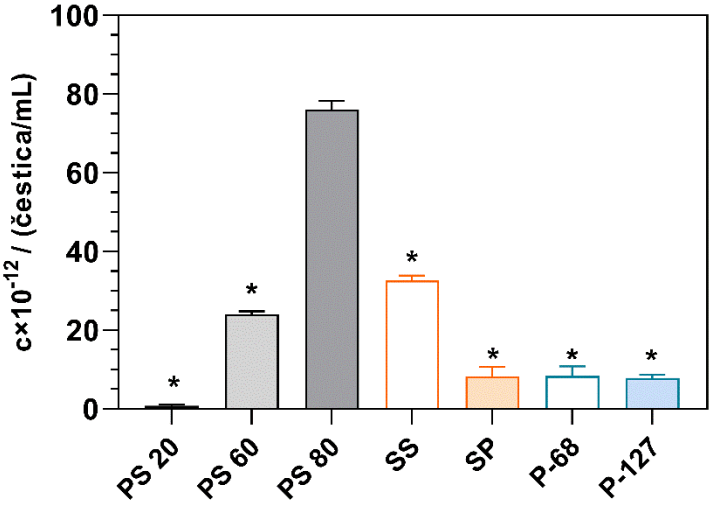
Među ispitivanim kombinacijama tenzida, smjesa polisorbata 80 i gliceril monostearata pokazala se najprikladnijom, pri čemu su pripremljeni monodisperzni NLC sustavi (PDI 0,25 ± 0,02) srednje veličine čestica 251,90 ± 3,77 nm i zeta-potencijala −40,16 ± 0,55 mV, uz najveću koncentraciju čestica u disperziji (Slike 11 i 12). Nasuprot tome, kombinacije gliceril monostearata s polisorbatom 20 i polisorbatom 60 pokazale su se neprikladnima. Primjena polisorbata 60 u kombinaciji s gliceril monostearatom, pri istovjetnim uvjetima pripreme, rezultirala je polidisperznim česticama dimenzija značajno većih od ciljanog raspona (MPS 1562 ± 8 nm), dok je u uzorku pripremljenom s polisorbatom 20 određena najniža koncentracija NLC-a (slika 12).

NLC formulacije temeljene na sukroznim esterima (sukroza stearat, NLC_SS, i sukroza palmitat, NLC_SP) bile su polidisperzne te karakterizirane dvjema populacijama čestica (Slika 10). Primarni pik u raspodjeli veličine čestica zabilježen je u području 125–131 nm i najvjerojatnije odgovara veličini formiranih NLC-a, dok sekundarni pik u rasponu 722–987 nm upućuje na prisutnost agregata nastalih udruživanjem primarnih čestica (Slika 10, C).

Unatoč naglašeno negativnim vrijednostima zeta-potencijala (oko −63 i −58 mV; Slika 11), rezultati upućuju na to da sama elektrostatska stabilizacija NLC sustava stabiliziranih sukroznim esterima nije dostatna za sprječavanje agregacije. Nasuprot tome, polisorbat 80 vjerojatno doprinosi dodatnoj stabilizaciji sustava putem steričkog mehanizma, zahvaljujući dugim polietoksilenskim lancima u strukturi polioksietilen(20)sorbitan monooleata. Time se osigurava učinkovitija stabilizacija disperzije unatoč nešto nižim vrijednostima zeta-potencijala, što je u skladu s njegovom širokom primjenom kao surfaktanta izbora u NLC formulacijama za dermalnu i topikalnu primjenu (28).



Slika 11. Utjecaj odabranih smjesa emulgatora i gliceril monostearata na zeta potencijal (ζ) formiranih NLC-a procesiranih pri 12 000 rpm. Jedna zvjezdica (*) označava statistički značajnu razliku u usporedbi s PS80 ($p < 0{,}0001$), dok dvije zvjezdice (**) označavaju statistički neznačajnu razliku u usporedbi s PS80 ($p > 0{,}05$).

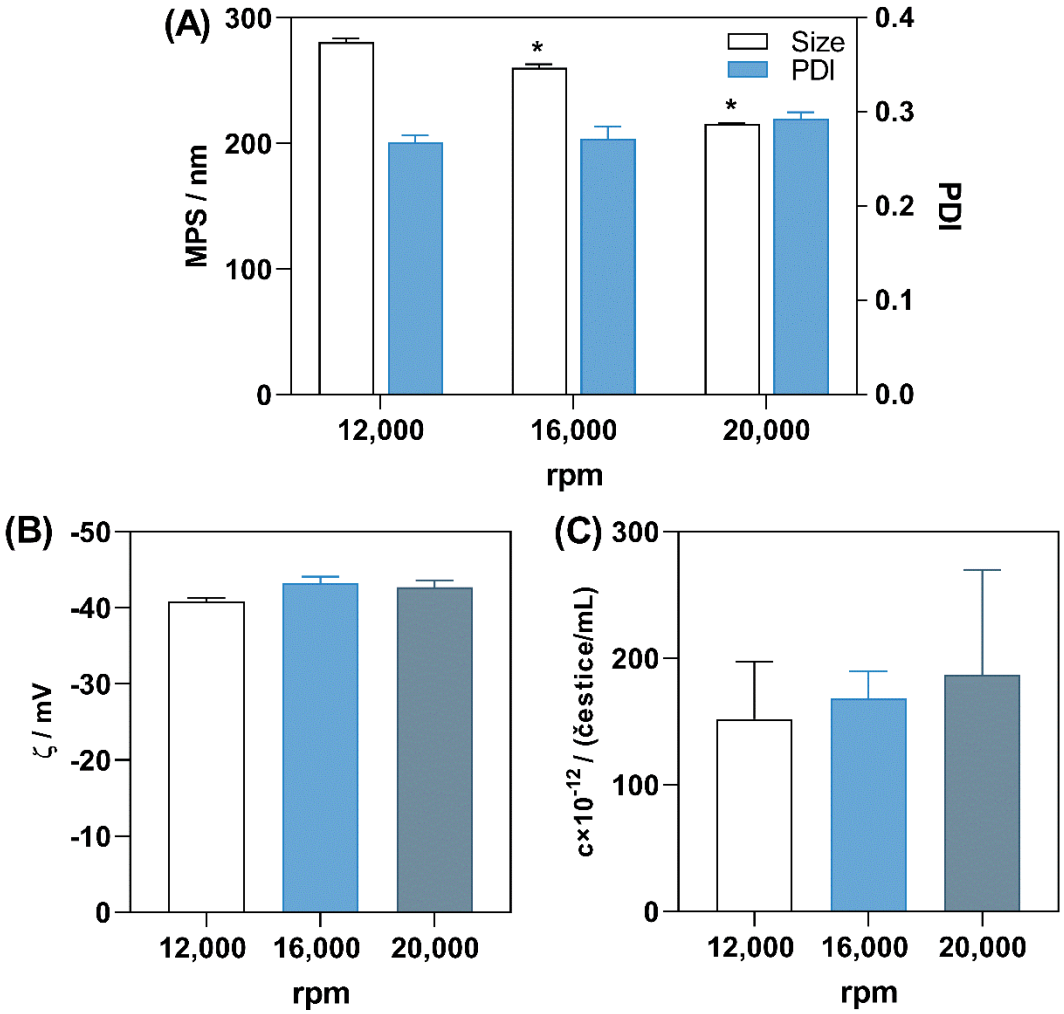


Slika 12. Utjecaj odabranih smjesa emulgatora i gliceril monostearata na koncentraciju formiranih NLC-a procesiranih pri 12 000 rpm. Jedna zvjezdica (*) označava statistički značajnu razliku u

usporedbi s PS80 ($p < 0,0001$), dok dvije zvjezdice (**) označavaju statistički neznačajnu razliku u usporedbi s PS80 ($p > 0,05$).

S obzirom na istaknuti značaj steričke stabilizacije razvijanih NLC sustava, očekivalo se da će poloksameri F68 i F127 djelovati kao vrlo učinkoviti emulgatori, u skladu s njihovom PEO–PPO–PEO triblok strukturom (99). Međutim, dobiveni rezultati pokazali su da pri primjeni istih procesnih parametara nastaju polidisperzni NLC sustavi s prosječnom veličinom čestica izvan ciljanog raspona (Slika 10), pri čemu je i koncentracija formiranih čestica bila značajno niža u usporedbi s uzorcima stabiliziranima polisorbatom 80 (Slika 12). Općenito, neionski surfaktanti s hidrofobnim dijelom građenim od masnih kiselina ostvaruju povoljne asocijativne interakcije s lipidnom fazom, što omogućuje gušće molekularno pakiranje i u pravilu rezultira manjim česticama (28). Nasuprot tome, u slučaju poloksamera F68 i F127 interakcija PPO segmenta s korištenim lipidima očito nije bila optimalna, što se odrazilo u formiranju većih i polidisperznijih čestica (100).

Daljnja optimizacija formulacije bila je usmjerena na dodatno smanjenje veličine NLC-a te je uključivala povećanje brzine homogenizacije preemulzije na 16 000 i 20 000 o/min. Primjena navedenih procesnih parametara rezultirala je daljnjim smanjenjem veličine čestica i indeksa polidisperznosti (PDI) sustava NLC_PS80, bez značajnih promjena zeta-potencijala i koncentracije čestica ($p > 0,05$; Slika 13). Pri brzini od 20 000 o/min pripremljene su disperzije NLC-a prosječne veličine 215,5 ± 0,9 nm. Dobivena veličina čestica smatra se prikladnom za dermalnu primjenu, budući da lipidni nanonosači u rasponu približno 100–300 nm pokazuju povoljnu fizičku stabilnost, adherenciju na površinu kože i naglašeni okluzivni učinak te povećanu retenciju u rožnatom sloju kože uz mogućnost ciljane interakcije s epidermalnim lipidima (9,36,40,47).



Slika 13. Utjecaj brzine homogenizacije na srednju veličinu čestica (*MPS,* A), indeks polidisperznosti (PDI, A), zeta-potencijal (*ζ*, B) i koncentraciju čestica (C) NLC_PS80 disperzije. Jedna zvjezdica (*) označava statistički značajnu razliku u usporedbi s uzorkom pripravljenim pri 12 000 o/min ($p < 0{,}0001$).

Tijekom optimizacije postupka priprave NLC disperzija posebna je pozornost posvećena ulozi pentilen glikola, koji je namjerno uključen u lipidnu fazu, za razliku od uobičajenog pristupa njegove primjene u vodenoj fazi (28). Tijekom priprave uočeno je da pentilen glikol djeluje kao suotapalo, olakšavajući otapanje komponenti visokih tališta, poput gliceril monostearata i kolesterola, u rastaljenom pčelinjem vosku. Nadalje, dodatak pentilen glikola u lipidnu fazu rezultirao je formiranjem NLC-a manjih dimenzija. Suprotno tome, pri njegovu dodatku u vodenu fazu, uz primjenu istovjetnih procesnih parametara, pripremljene su čestice većih dimenzija i značajno višeg stupnja polidisperznosti (MPS 325,5 ± 5,4 nm; PDI 0,44 ± 0,02), uz slične vrijednosti zeta-potencijala (−39,62 ± 0,95 mV naspram −42,72 ± 0,9 mV; $p > 0,05$). Dobiveni rezultati upućuju na to da pentilen glikol, kada je inicijalno uključen u lipidnu fazu, povoljno utječe na proces formiranja čestica, vjerojatno zbog poboljšanog molekularnog rasporeda lipida tijekom homogenizacije i početnih faza nukleacije. Tijekom procesa hlađenja i solidifikacije NLC-a, pretpostavlja se da pentilen glikol djelomično difundira u vodenu fazu, pri čemu može dodatno utjecati na stabilnost i unutarnju strukturu čestica (101).

Budući da je mikrobiološka stabilnost jedan od ključnih parametara kvalitete svakog dermalnog pripravka, provedeno je ispitivanje djelotvornost protumikrobnih konzervansa optimirane NLC formulacije izrađene s polisorbatom 80 sukladno zahtjevima Europske farmakopeje (Ph. Eur. 10, monografija 5.1.3 *Djelotvornost protumikrobnih konzervansa*) (75). Ispitivanja protumikrobne učinkovitosti konzervansa provedena su na standardiziranom skupu mikroorganizama koji uključuje predstavnike Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (*Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa*), kvasci (*Candida albicans*) i plijesni (*Aspergillus brasiliensis*). Ovi mikroorganizmi predstavljaju referentne testne sojeve mikroorganizama definirane u monografiji 5.1.3 Europske farmakopeje i odgovaraju tipičnim kontaminantima koji se mogu pojaviti tijekom proizvodnje i uporabe dermalnih pripravaka (102). Odabir ovih modelnih mikroorganizama omogućuje sveobuhvatnu procjenu učinkovitosti pentilen glikola kao konzervansa, budući da obuhvaća različite tipove staničnih struktura i otpornosti na antimikrobne tvari. Prema podacima prikazanima u Tablici 3, razvijena NLC_PS80 disperzija zadovoljava zahtjeve Europske farmakopeje za pripravke za kutanu primjenu, čime je potvrđena učinkovita antimikrobna zaštita sustava.

Tablica 3. Rezultati ispitivanja učinkovitosti protumikrobnog konzerviranja za optimiranu disperziju NLC-a izrađenu korištenjem polisorbata 80.

Testni mikroorganizmi	Početna koncentracija (log_{10} cfu/mL)	Logaritamsko smanjenje broja mikroorganizama			
		2 dana	7 dana	12 dana	28 dana
Staphilococcus aureus ATTC 6538	5,66	4,66 (2)*	4,66 (3)*	4,66 (3)*	Ø (NI)*
Escherichia coli ATCC 8739	5,89	4,89 (2)*	4,89 (3)*	4,89 (3)*	Ø (NI)*
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	5,95	4,95 (2)*	4,95 (3)*	4,95 (3)*	Ø (NI)*
Candida albicans ATCC 10231	5,91	4,91 (2)*	4,91 (3)*	4,91 (3)*	Ø (NI)*
Aspergillus brasiliensis ATTC 16404	5,58	4,58 (-)*	4,58 (-)*	4,58 (2)*	Ø (NI)*

* – zahtijevano smanjenje broja živih mikroorganizama prema monografiji 5.1.3 Europske farmakopeje (Ph. Eur. 11.0); NI – bez porasta; Ø – nije detektirano.

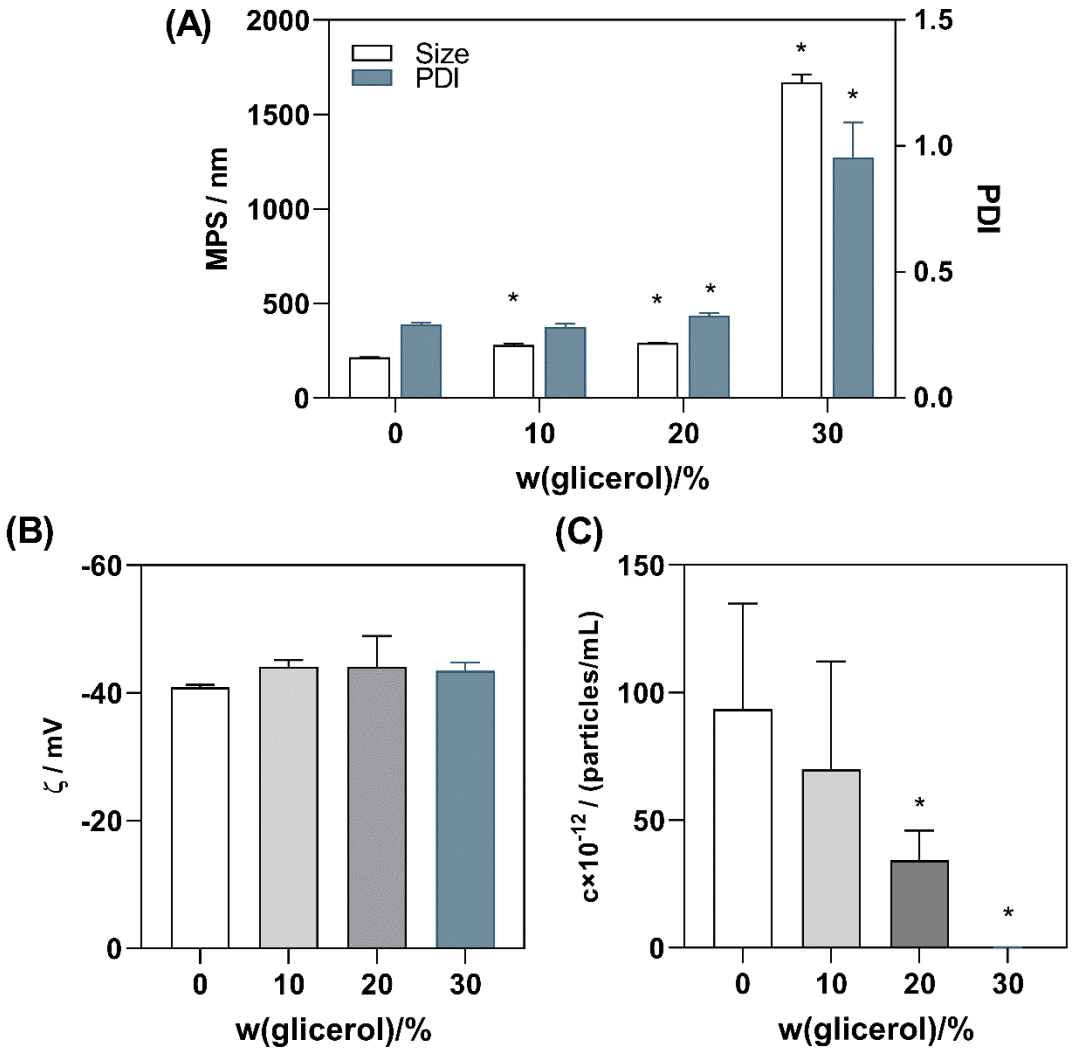
U svim ispitivanim slučajevima zabilježeno je brzo i značajno smanjenje broja živih mikroorganizama već unutar prva dva dana, uz postizanje i premašivanje propisanih vrijednosti logaritamskog smanjenja sukladno kriterijima Europske farmakopeje (Tablica 3). Nadalje, nakon 28 dana praćenja, prisutnost ispitivanih mikroorganizama u pripravku više nije detektirana, što potvrđuje dugoročnu učinkovitost pentilen glikola kao konzervansa, neovisno o činjenici da je tijekom priprave bio uključen u lipidnu fazu preemulzije. Prikazani rezultati upućuju na to da tijekom procesa priprave dolazi do redistribucije pentilen glikola između lipidne i vodene faze, osobito tijekom hlađenja i solidifikacije NLC-a, čime postaje dostupan mikroorganizmima u kontinuiranoj vodenoj fazi i omogućuje učinkovito konzerviranje sustava. U konačnici, sastav NLC_PS80 formulacije osigurava njenu pouzdanu zaštitu od mikrobne kontaminacije, što je od posebne važnosti za topikalne pripravke namijenjene primjeni na oštećenoj ili osjetljivoj koži. Opisani pristup formulaciji ujedno je u skladu s konceptom tzv. „*self-preserving systems*", odnosno sustava s reduciranim udjelom klasičnih konzervansa, u kojima sinergijsko djelovanje

multifunkcionalnih pomoćnih tvari i specifičnih fizikalno-kemijskih svojstava formulacije doprinosi učinkovitoj i dugotrajnoj mikrobiološkoj stabilnosti (103).

Osim pentilen glikola, moguće je da i gliceril monostearat doprinosi ukupnom antimikrobnom učinku formulacije. Naime, monoacilgliceroli kao skupina spojeva poznati su po sposobnosti narušavanja integriteta mikrobnih membrana, čime ostvaruju antimikrobnu aktivnost širokog spektra. Iako gliceril monostearat, kao dugolančani monoacilglicerol, pokazuje slabiji izravni antimikrobni učinak u usporedbi s kraćim analozima, njegova uloga u lipidnim nanosustavima može biti značajnija (104). U kontekstu SLN/NLC sustava pokazano je da lipidne nanočestice koje sadrže gliceril monostearat mogu doprinijeti pojačanju antimikrobne učinkovitosti sustava (105). To se može objasniti velikom specifičnom površinom nanosustava, koja omogućuje intenzivniji kontakt s mikrobnim stanicama, kao i činjenicom da se gliceril monostearat, djelujući kao površinski aktivna tvar, raspoređuje na sučelju čestica. Takva lokalizacija rezultira visokom lokalnom koncentracijom molekula gliceril monostearata izloženih okolini, čime se dodatno povećava njihova dostupnost i potencijal za interakciju s mikrobnim membranama, osobito u sinergiji s drugim ugrađenim bioaktivnim komponentama. Stoga se može pretpostaviti da u promatranom sustavu gliceril monostearat ne djeluje isključivo kao strukturna komponenta, već potencijalno sudjeluje u ukupnom antimikrobnom učinku formulacije, u okviru šireg multifunkcionalnog i samokonzervirajućeg sustava.

Glicerol je jedan od najčešće korištenih humektansa u topikalnim farmaceutskim i dermokozmetičkim pripravcima, prvenstveno zbog izražene higroskopnosti i sposobnosti vezanja vode u rožnatom sloju. Njegovo djelovanje usko je povezano s konceptom prirodnog faktora vlaženja (NMF), budući da glicerol funkcionalno oponaša endogene komponente NMF-a i doprinosi održavanju hidratacije, elastičnosti i integriteta epidermalne barijere (106). Nadalje, poznato je da glicerol ima važnu ulogu u regulaciji epidermalne hidratacije putem aquaporina-3 te u procesima obnove oštećene barijerne funkcije, što je osobito važno u stanjima karakteriziranim suhom i dehidriranom kožom (107,108). Uzimajući u obzir njegovu ključnu ulogu u održavanju homeostaze rožnatog sloja i rehabilitaciji oštećene epidermalne barijere, tijekom izrade NLC-a glicerol je dodavan u vodenu fazu s ciljem ispitivanja kako promjena viskoznosti kontinuirane faze utječe na proces formiranja nanočestica i njihova konačna fizikalno-kemijska svojstva. Glicerol kao humektans u topikalnim pripravcima se najčešće primjenjuje u koncentracijama od 2 do 10 %,

dok se u pripravcima namijenjenima intenzivnoj hidrataciji i obnovi epidermalne barijere koristi u višim koncentracijama, do približno 30% (109). U skladu s time, postupak optimirani postupak pripreme NLC-a je modificiran na način da je u vodenu fazu emulzije dodano 10, 20 i 30% glicerola, dok su ostali procesni parametri bili nepromijenjeni. Pripremljeni uzorci karakterizirani su obzirom na srednji promjer, polidisperznost i vrijednost zeta potencijala, a rezultate su prikazani u Slici 14.



Slika 14. Utjecaj glicerola u koncentraciji od 10, 20 i 30% (m/m) na srednju veličinu čestica (*MPS*, A), indeks polidisperznosti (PDI, A), zeta-potencijal (ζ, B) i koncentraciju čestica (C) NLC_PS80

disperzije. Jedna zvjezdica (*) označava statistički značajnu razliku u usporedbi s uzorkom bez glicerola pripravljenim pri 12 000 o/min ($p < 0,0001$).

Dodatak glicerola tijekom priprave značajno je utjecao na veličinu formiranih NLC-ova. U usporedbi sa sustavom bez glicerola (215,5 ± 0,9 nm), pri koncentracijama od 10 i 20 % uočen je umjeren porast veličine čestica za 30,4 % i 34,8 %, dok je pri 30 % glicerola zabilježen izražen porast od čak 675,4 %, uz formiranje čestica mikrometarskih dimenzija. Takvo ponašanje može se pripisati prvenstveno povećanoj viskoznosti kontinuirane vodene faze uslijed dodatka glicerola, što smanjuje učinkovitost smičnih sila tijekom homogenizacije i otežava fragmentaciju kapljica uljne faze, rezultirajući većim česticama. Dodatno, promjena viskoznosti utječe na omjer viskoznosti disperzne i kontinuirane faze te time modulira dinamiku deformacije i razbijanja kapljica (110). Istodobno, glicerol može utjecati na svojstva međupovršine, uključujući kinetiku adsorpcije surfaktanta i međupovršinsku napetost, koja predstavlja ključni parametar u određivanju veličine čestica u emulzijskim sustavima (111).

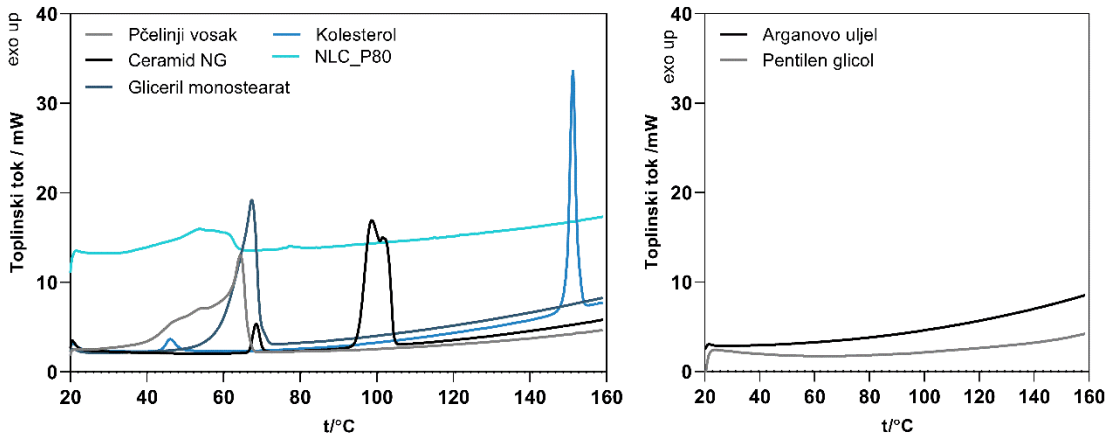
Izrazito povećanje veličine čestica pri 30 % glicerola ukazuje na postojanje kritične koncentracije iznad koje dolazi do dominacije viskozno-kontroliranog režima formiranja čestica, pri čemu su procesi fragmentacije i stabilizacije kapljica značajno ograničeni, što rezultira izrazitim povećanje polidisperznost čestica u uzorku te značajnim smanjenjem njihove koncentracije (Slika 14). U tom smislu, kako bi se osiguralo formiranje NLC-a ciljanog raspona veličina, priprema je provedena bez dodatka glicerola, a on je naknadno dodan u vodenu fazu tijekom daljnjeg razvoja formulacije. Utvrđeno je kako se tme ne narušavaju ključna fizikalno-kemijska svojstva NLC-a (podaci nisu prikazani).

4.2 Strukturna svojstva NLC-a

Strukturna karakterizacija NLC-a predstavlja ključan korak u razumijevanju njihovih fizikalno-kemijskih svojstava i funkcionalne učinkovitosti kao nosača djelatnih tvari. S obzirom na to da su svojstva NLC-a u velikoj mjeri određena stanjem lipidnog matriksa, njegovom kristalnošću, polimorfizmom i faznim ponašanjem, primjena analitičkih tehnika koje pružaju uvid u čvrsto stanje sustava od posebne je važnosti. U tom kontekstu, diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) i rendgenska difrakcija (XRPD) ubrajaju se među najznačajnije i najčešće korištene metode, budući da omogućuju detekciju toplinskih prijelaza, određivanje kristaliničnosti

i identifikaciju polimorfnih oblika lipida. Ove tehnike djeluju komplementarno, pri čemu DSC pruža informacije o toplinskom ponašanju i energetskim promjenama u sustavu, dok XRPD omogućuje izravan uvid u kristalnu strukturu i organizaciju lipidnog matriksa. Njihova kombinirana primjena stoga omogućuje detaljnu analizu strukturnih svojstava NLC-a, što je nužno za razumijevanje stabilnosti sustava, kapaciteta uklapanja djelatnih tvari i njihovog oslobađanja (49,79).

Kako bi se provela analiza, disperziju NLC-a je potrebno najprije osušiti kako bi se izolirale čestice u čvrstom stanju. U tu svrhu se standardno primjenjuje postupak liofilizacije (79). Rezultati DSC analize ulaznih sirovina te liofiliziranog NLC_P80 uzorka prikazani su na Slici 15.



Slika 15. DSC termogrami sirovina korištenih u izradi NLC-a i optimirane formulacije stabilizirane polisorbatom 80 (NLC-P80) nakon liofilizacije.

U DSC termogramu pčelinjeg voska vidljiv je široki endotermni pik u temperaturnom rasponu od 25 do 69 °C, s maksimumom pri 64,10 °C, što upućuje na prisutnost više polimorfnih prijelaza pojedinih komponenti prisutnih u materijalu prije taljenja. Ovisno o geografskom podrijetlu sirovine, talište pčelinjeg voska u pravilu se nalazi u rasponu od 61 do 67 °C (112). Kameda i Tamada identificirali su dva polimorfna prijelaza koji prethode talištu pčelinjeg voska. Prvi odgovara faznoj transformaciji iz ortorombične u rotacijsku fazu pri 36,4 °C. Drugi prijelaz pripisuje se konformacijskoj promjeni alkilnih (–CH_2–) lanaca iz potpuno trans-konfiguracije u mješavinu gauche–trans konfiguracija, pri čemu se u DSC-u opaža pik na 49,2 °C. Dodatni fazni

prijelaz pri 55,2 °C opisali su Gaillard i sur., a odnosi se na transformaciju između dviju rotacijskih kristalnih modifikacija (rot. I i rot. II) (112,113).

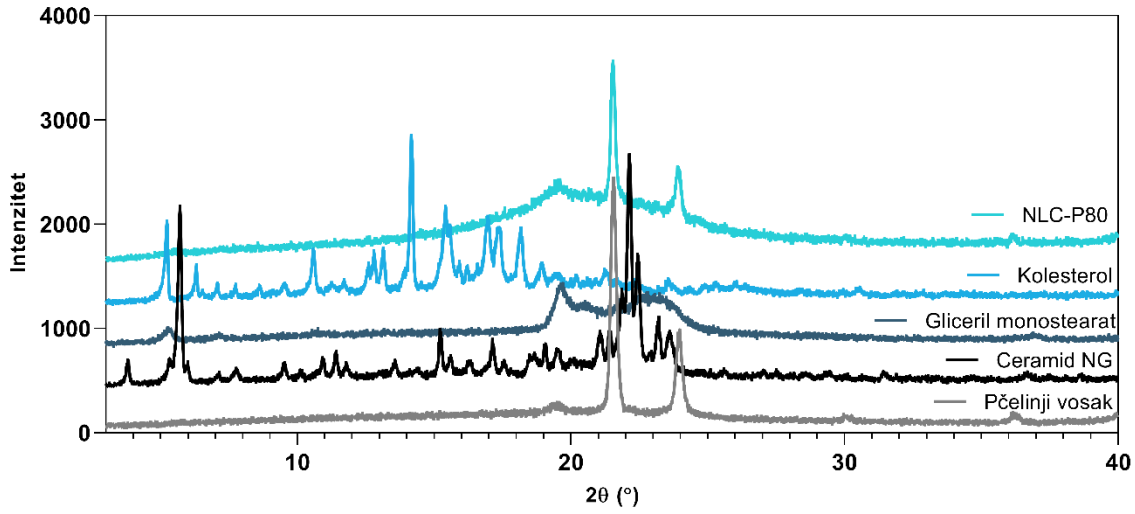
Prvi fazni prijelaz u DSC termogramu kolesterola opažen pri približno 46 °C može se pripisati polimorfnoj transformaciji u čvrstom stanju, odnosno reorganizaciji kristalne rešetke anhidratnog kolesterola bez taljenja. Takvi endotermni prijelazi u području 37–45 °C dobro su poznati u literaturi te odgovaraju prijelazu između različitih kristalnih modifikacija kolesterola, pri čemu dolazi do promjene molekularnog pakiranja i povećanja pokretljivosti molekula. Na položaj i intenzitet ovog prijelaza značajno utječe toplinska povijest i stupanj hidratacije uzorka (114). Također, zabilježen je i endotermni pik pri 148,51 °C koji odgovara talištu kolesterola (115).

Karakteristični razdvojeni pik ceramida (CE) pri temperaturi od 91,47 °C ukazuje na to da je ispitivani uzorak ceramida NG pripremljen kristalizacijom iz metil-acetata. Točan toplinski profil ceramida u velikoj je mjeri ovisan o njegovoj toplinskoj povijesti i brzini zagrijavanja tijekom DSC mjerenja. Mali egzotermni pik pri 68,53 °C može se stoga pripisati taljenju njegove metastabilne modifikacije (116,117).

U DSC termogramu gliceril monostearata vidljiv je širok endotermni pik u rasponu temperatura od 35,16 do 67,8 °C, što se može objasniti istodobnom prisutnošću β- i α-modifikacije u uzorku. Čista β-modifikacija gliceril monostearata tali se pri 71,9 °C, dok se čista α-modifikacija tali pri 67,9 °C. Brzo hlađenje rastaljenog GMS-a dovodi do formiranja α-modifikacije, koja se zatim pri sobnim uvjetima postupno transformira u stabilniju β-modifikaciju preko međufazne β′-modifikacije. Ovisno o toplinskoj povijesti, uzorak može sadržavati manji udio α-modifikacije, što rezultira sniženjem uočenog tališta (118). U termogramima arganovog ulja i pentilen glikola, u ispitivanom temperaturnom području nisu uočeni izraženiji termički događaji.

Liofilizirani uzorak NLC-PS80 pokazao je širok egzotermni pik u rasponu od 35,16 do 65,50 °C, čiji oblik odgovara signalu zabilježenom za pčelinji vosak, koji je najzastupljeniji čvrsti lipid u formulaciji. U odnosu na termogram čistog pčelinjeg voska, pik u uzorku NLC-80 pomaknut je prema nižim temperaturama, što se pripisuje prisutnosti arganovog ulja i ostalih lipidnih komponenti u NLC-u (119). Također, kao i kod čistog pčelinjeg voska, može se pretpostaviti više polimorfnih prijelaza koje prethode taljenju sirovine (Slika 15). Iz navedenih rezultata proizlazi da se NLC čestice u potpunosti tale tek pri temperaturama višim od 65,50 °C, dok pri temperaturi kože od oko 32 °C ostaju u čvrstom stanju (79).

Kako bi se dodatno pojasnila strukturna organizacija lipida, provedena je XRPD analiza čvrstih sirovina i liofiliziranog uzorka optimalne NLC formulacije. Rezultati su prikazani na slici 17. Dobiveni difrakcijski obrasci potvrdili su polikristalnu prirodu korištenih čvrstih lipidnih sirovina. Pčelinji vosak, kao djelomično kristalna tvar, karakteriziran je izraženim refleksijama pri 2θ = 21,58° i 23,98°. Takav difraktogram tipičan je ortorombnu kristalnu strukturu frakcija ugljikovodika i monoestera (112). Difrakcijski pikovi pri istim 2θ vrijednostima uočeni su i u XRPD difraktogramu liofiliziranog uzorka NLC-PS80 disperzije (Slika 16), što jasno upućuje na zaključak da pčelinji vosak unutar NLC matriksa zadržava svoju osnovnu kristalnu organizaciju. Istodobno, smanjeni intenzitet karakterističnih refleksija ukazuje na smanjen stupanj kristaliničnosti, što se može pripisati prisutnosti drugih lipidnih komponenti i surfaktanta te formiranju većeg broja kristalnih defekata u NLC sustavu (120).



Slika 16. XRPD difraktogrami čvrstih lipida korištenih u izradi NLC-a i optimirane formulacije stabilizirane polisorbatom 80 (NLC-P80) nakon liofilizacije.

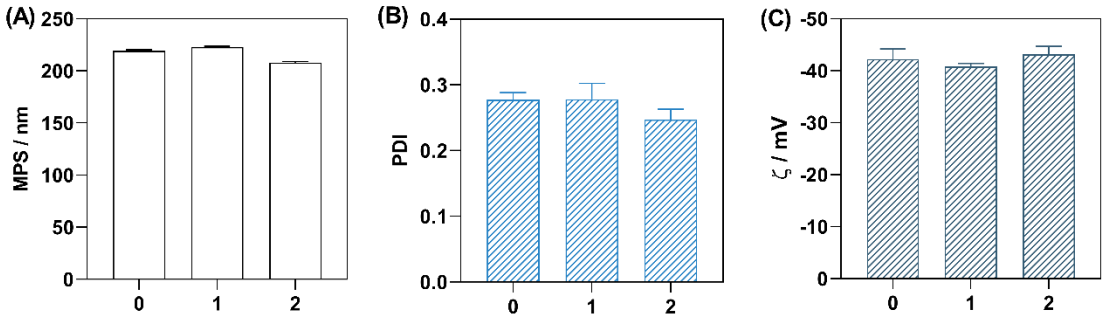
Difraktogram gliceril monostearata pokazuje difrakcijski obrazac tipičan za β-modifikaciju (Slika 16), dok refleksija pri 2θ ≈ 21,3°, karakteristična za α-modifikaciju GMS-a, nije uočena (121). Međutim, njezina prisutnost u uzorku ne može se u potpunosti isključiti. Yajima i sur. pokazali su da se refleksija karakteristična za α-modifikaciju ne može detektirati u XRPD difraktogramu kada je njen udio u smjesi manji od 15 % (m/m) (118). Nadalje, refleksija tipična za β-modifikaciju GMS-a pri 2θ ≈ 19,5° može se uočiti i u difraktogramu NLC-PS80, dok refleksije karakteristične za ostale čvrste lipide korištene u formulaciji nisu prisutne. To upućuje na

formiranje NLC-a tipa „nesavršene kristalne strukture" (engl. *imperfect crystal type*), što se tipično događa pri miješanju lipida različitih duljina alkilnih lanaca ili pri uporabi mono-, di- i triglicerida (22). U takvom sustavu pčelinji vosak i gliceril monostearat prisutni su u stabilnim polimorfnim modifikacijama, dok kolesterol i ceramid zadržavaju amorfnu strukturu. Primjena neionskog surfaktanta niskog tališta (npr. polisorbata 80, $T_m \approx -25$ °C) pogoduje brzoj transformaciji lipida u najstabilniju polimorfnu modifikaciju tijekom formiranja NLC-a (30). S druge strane, amorfno stanje kolesterola i ceramida NG može se pripisati njihovoj dobroj topljivosti u rastaljenoj smjesi voska i arganovog ulja, pri čemu pentilen glikol (PG) djeluje kao suotapalo i dodatno olakšava njihovo uklapanje unutar lipidnog matriksa. Također se čini da gliceril monostearat ne djeluje isključivo kao emulgator u kombinaciji s polisorbatom 80, već je djelomično uklopljen u strukturu NLC-a te ima ulogu strukturnog čvrstog lipida.

Općenito, termodinamička stabilnost lipida, njihova gustoća pakiranja te polimorfne transformacije tijekom skladištenja ključni su čimbenici koji određuju kapacitet uklapanja i profil oslobađanja djelatne tvari iz NLC-a. Općenito, lipidi prisutni u metastabilnim modifikacijama (α i β′) imaju tendenciju rekristalizacije u stabilniju β-modifikaciju tijekom skladištenja. Ova sekvencijalna transformacija (α → β′ → β) može dovesti do istiskivanja uklopljenih djelatnih tvari iz lipidnog matriksa. Nadalje, kapacitet uklapanja izravno je povezan s kristalnim stanjem lipida koji izgrađuju NLC matriks (79). U razvijenoj NLC formulaciji, ceramid NG i kolesterol, kao ključne funkcionalne komponente, prisutne su u amorfnom obliku. Time se stvara termodinamički metastabilan, ali funkcionalno povoljan sustav, u kojem su ove komponente dostupnije za interakciju s kožnim lipidima nakon primjene. Upravo amorfno stanje ovih funkcionalnih lipida može značajno pridonijeti njihovom učinkovitom uklapanju u postojeći lipidni matriks kože. Dok su lipidi u visoko uređenom kristalnom stanju skloni ograničenoj mobilnosti i slabijem miješanju s okolnim lipidima, amorfne ili manje uređene lipidne domene pokazuju veću molekularnu pokretljivost i veću sposobnost uklapanja u lamelarne strukture rožnatog sloja. Takva svojstva potencijalno omogućuju lakšu redistribuciju i reorganizaciju unutar međustaničnih lamela, što je ključno za obnovu oštećene barijerne funkcije kože (9). Dodatno, poznato je da pravilna kooperativna organizacija ceramida i kolesterola unutar lamelarnih domena zahtijeva njihovu međusobnu interakciju i redistribuciju, što je proces koji je olakšan upravo u manje kristaliničnim sustavima. Stoga se može zaključiti da njihova amorfna disperzija u NLC-u predstavlja funkcionalno poželjno stanje koje može pridonijeti učinkovitijoj obnovi lipidne barijere kože.

4.3 Fizička stabilnost optimalne NLC disperzije

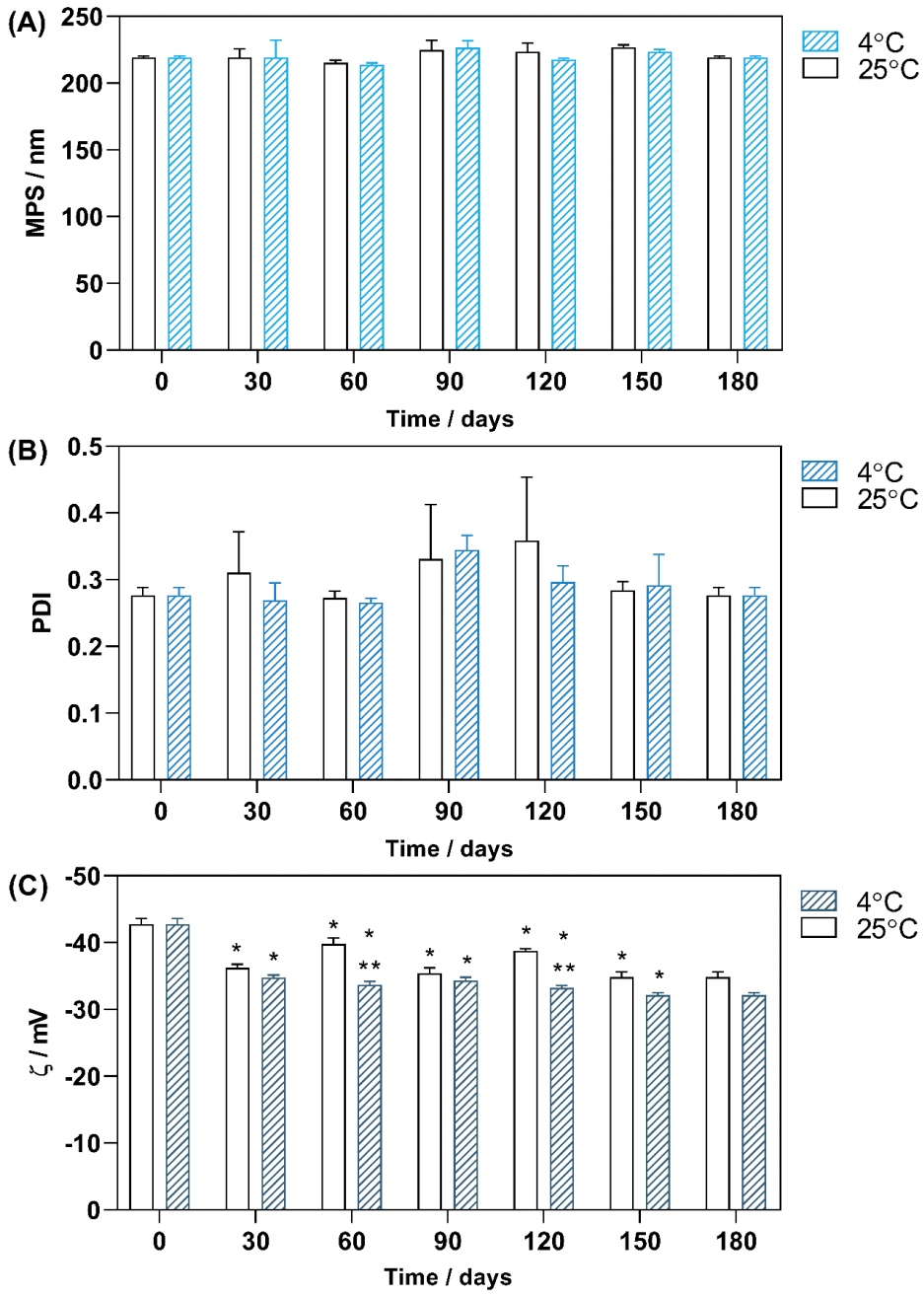
Fizička stabilnost predstavlja jedan od ključnih atributa kvalitete NLC-a koji određuje njihovu primjenjivost i učinkovitost. Kao što je ranije već istaknuto, NLC-i su koloidni sustavi čija stabilnost ovisi o međudjelovanju više fizikalno-kemijskih parametara, uključujući veličinu čestica, raspodjelu veličina i zeta potencijal, koji zajedno određuju sklonost agregaciji i dugoročnu stabilnost disperzije tijekom skladištenja ili pod utjecajem vanjskih čimbenika. Stoga je za pouzdanu procjenu njihove stabilnosti nužna sveobuhvatna karakterizacija primjenom komplementarnih analitičkih tehnika, uključujući metode za određivanje veličine čestica i površinskog naboja u kombinaciji s različitim vanjskim stresom i uvjetima čuvanja (28,79).



Slika 17. Promjena srednjeg promjera (MSD, A), indeksa polidisperznosti (PDI, B) i vrijednosti zeta potencijala (ξ, C) tijekom ubrzanog ispitivanja fizičke stabilnosti optimalne NLC disperzije centrifugiranjem pri 3000 × g u dva ciklusa po 15 minuta. Vrijednost 0 označava inicijalno stanje, dok vrijednosti 1 i 2 odgovaraju uzorcima nakon prvog i drugog ciklusa centrifugiranja.

Ubrzano ispitivanje fizičke stabilnosti NLC-a često se provodi primjenom centrifugiranja kao jednostavne i učinkovite metode za simulaciju dugotrajnog skladištenja u kratkom vremenskom razdoblju. Ova tehnika temelji se na primjeni povećanog centrifugalnog polja, kojim se induciraju procesi destabilizacije disperznih sustava, poput agregacije, flokulacije, koalescencije ili fazne separacije, koji bi se tijekom skladištenja inače odvijali znatno sporije. U skladu s metodologijom opisanom u radu Gonçalves i sur., uzorci optimalne NLC disperzije izloženi su uzastopnim ciklusima centrifugiranja definirane sile i trajanja, pri čemu se nakon svakog ciklusa procjenjuju promjene u fizičkom izgledu sustava te ključni parametri poput veličine čestica, indeksa polidisperznosti i zeta potencijala (74). Izostanak značajnih promjena u tim parametrima

ukazuje na dobru fizičku stabilnost sustava, dok pojava vidljivih ili mjerljivih promjena može signalizirati sklonost destabilizaciji tijekom skladištenja.



Slika 18. Rezultati studije stabilnosti u stvarnom vremenu optimirane NLC-PS80 disperzije pohranjene pri 25 i 4 °C: srednji promjer čestica (MPS, A), indeks polidisperznosti (PDI, B) i zeta potencijal (ζ, C) kao funkcija vremena. Jedna zvjezdica (*) označava statistički značajnu razliku u

odnosu na inicijalni uzorak pohranjen pri istoj temperaturi ($p < 0,0001$), dok dvije zvjezdice (**) označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na uzorak u istom vremenskom trenutku pri 25 °C ($p < 0,0001$).

Rezultati prikazani na Slici 17 pokazuju da su nakon svakog ciklusa centrifugiranja promjene u proučavanim parametrima bile statistički neznačajne u odnosu na početne vrijednosti ($p > 0,05$), što upućuje na očuvanu koloidnu stabilnost disperzije tijekom ubrzanog ispitivanja. Ovi su rezultati dodatno potvrđeni studijama stabilnosti u stvarnom vremenu, koje su pokazale da se vrijednosti srednjeg promjera čestica i indeksa polidisperznosti NLC-PS80 disperzije ne mijenjaju značajno tijekom šestomjesečnog skladištenja, neovisno o primijenjenim uvjetima (Slika 18; $p > 0,05$). Studije stabilnosti u stvarnom vremenu provedene su skladištenjem uzoraka disperzije NLC pri sobnoj temperaturi (25 °C) i u hladnjaku (4 °C). Iako se time djelomično odstupa od standardiziranih uvjeta definiranih ICH smjernicom Q1A(R2), takav je pristup odabran kako bi se simulirali realni uvjeti skladištenja koje krajnji korisnik može ostvariti tijekom uporabe proizvoda. Tijekom skladištenja zabilježen je jedino statistički značajan, ali umjeren pad vrijednosti zeta potencijala ($p < 0,001$, Slika 18, C), što se može pripisati blagom sniženju pH vrijednosti sustava uslijed otapanja CO_2 u vodenoj fazi nepuferirane NLC disperzije (48). Međutim, navedena promjena nije bila praćena pojavom fizikalne nestabilnosti, što potvrđuju održane vrijednosti veličine čestica i indeksa polidisperznosti.

4.4 Priprema i farmaceutsko-tehnološka karakterizacija hidrogelova s uklopljenim NLC-om

Niska viskoznost NLC disperzija predstavlja ograničavajući čimbenik njihove topikalne primjene obzirom da otežava nanošenje te ograničava njezino zadržavanje na koži. Uklapanje NLC sustava u polučvrste nosače, poput hidrogelova, prepoznata je kao prikladna strategija za olakšavanje primjene formulacije i povećanje zadržavanja na površini kože (122,123). Viskoznost hidrogelova omogućuje njihovo prilagođavanje površini tkiva i nepravilnostima kože ili rana, dok elastičnost osigurava mehaničku čvrstoću i otpornost na deformaciju, čime se produljuje vrijeme zadržavanja na mjestu primjene (122). Hidrogelovi temeljeni na polisaharidima od posebnog su interesa zbog svoje biokompatibilnosti i biorazgradivosti te dodatnih povoljnih učinaka na kožu i različite patološke procese, koji ovise o vrsti korištenog polisaharida (122,124).

U ovom radu odabrane su natrijev hijaluronat i ksantanska guma kao ključne komponente hidrogela. Hijaluronska kiselina je linearni, negativno nabijeni glikozaminoglikan sastavljen od ponavljajućih disaharidnih jedinica D-glukuronske kiseline i N-acetil-D-glukozamina, koji u vodenoj sredini stvara hidrogelne mreže putem vodikovih veza i elektrostatičkih interakcija (125). Hijaluronska kiselina je ključna komponenta izvanstaničnog matriksa te sudjeluje u nizu bioloških procesa, uključujući obnovu kože, cijeljenje rana, regeneraciju tkiva te modulaciju upalnih i imunoloških odgovora. Pokazuje izrazitu sposobnost vezanja vode čime doprinosi hidrataciji, elastičnosti i obnovi kože. Zahvaljujući tim svojstvima te izraženoj biokompatibilnosti i mogućnosti kemijske modifikacije, hijaluronska kiselina se široko primjenjuje u razvoju naprednih terapijskih sustava, uključujući hidrogelove i nanonosače (126,127). U polučvrstim formulacijama za topikalnu primjenu se najčešće koristi u obliku natrijeve soli (natrijev hijaluronat), koja pokazuje veću kemijsku stabilnost, bolju topljivost u vodi u širokom pH području te veću otpornost na mikrobnu i oksidativnu razgradnju, čime se osigurava dulji rok valjanosti pripravka (128). U kozmetičkim i topikalnim pripravcima se primjenjuju derivati različitih molekulskih masa, u koncentraciji oko 1% (m/m) (122,129). Molekulska masa hijaluronske kiseline u topikalnim i kozmetičkim pripravcima značajno utječe na njezina funkcionalna svojstva, pri čemu visoko molekularni oblici (≥1000 kDa) primarno djeluju na površini kože stvaranjem hidratacijskog filma, dok spojevi niže molekulske mase pokazuju bolju penetraciju u dublje slojeve kože. U ovom radu korišten je visokomolekularni natrijev hijaluronat, odabran zbog svoje izražene sposobnosti zadržavanja vode, stabilnosti i formiranja zaštitnog hidrirajućeg sloja na površini kože.

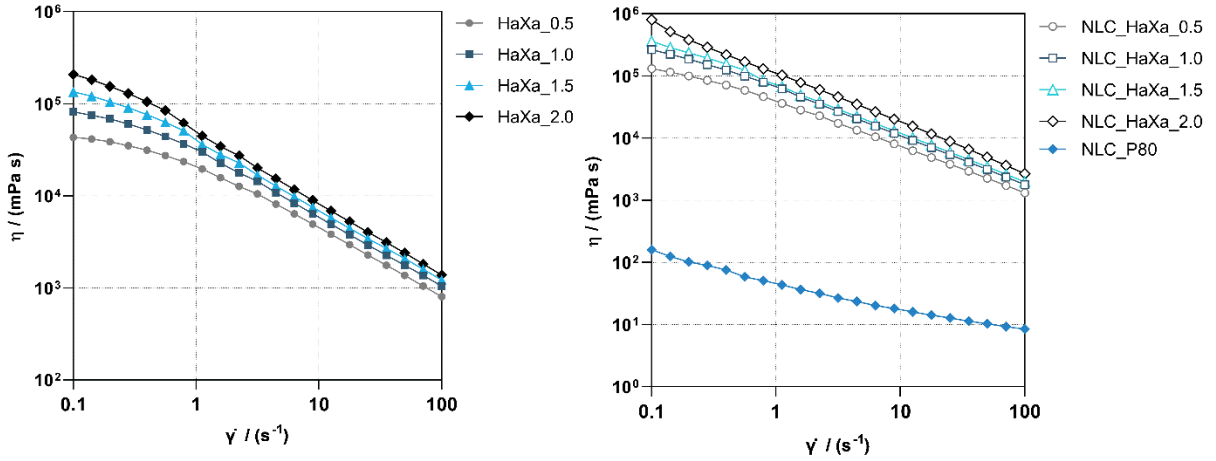
Ksantanska guma je prirodni anionski heteropolisaharid dobiven fermentacijom mikroorganizma *Xanthomonas campestris*, poznat po iznimnim reološkim svojstvima, visokoj toplinskoj i pH stabilnosti te izraženom pseudoplastičnom ponašanju. Sastoji se od ponavljajućih pentasaharidnih jedinica koje uključuju glukozu, manozu i glukuronsku kiselinu u molarnom omjeru 2:2:1. U vodenim sustavima formira stabilne, slabo umrežene strukture koje se reverzibilno reorganiziraju pod utjecajem smičnog naprezanja, što omogućuje jednostavno nanošenje formulacije uz istodobno zadržavanje viskoznosti nakon aplikacije. Ksantanska guma se široko koristi kao ugušćivač, stabilizator i gelirajuće sredstvo u farmaceutskim i topikalnim pripravcima, pri čemu poboljšava razmazivost, fizikalnu stabilnost i zadržavanje formulacije na koži (130). Dodatno, njegova biokompatibilnost, netoksičnost i sposobnost formiranja viskoelastičnih gelova čine ga prikladnim za primjenu u sustavima s kontroliranim oslobađanjem djelatne tvari i dermalnu

dostavu lijekova (131). U ovom istraživanju, ksantanska guma je primijenjena u rasponu koncentracija od 0,5 do 2,0% (m/m) kako bi se reološka svojstva hidrogela dodatno prilagodila dermalnoj primjeni. Očekuje se da će kombinacija natrijevog hijaluronata i ksantana omogućiti pripremu hidrogelova optimalnih reoloških i teksturnih svojstava, u kojima natrijev hijaluronat doprinosi hidrataciji, bioadheziji i biološkim učincima na kožu, dok ksantanska guma primarno regulira viskoznost i stabilnost sustava. Takva sinergija mogla bi omogućiti omogućuje formiranje stabilnog, biofunkcionalnog, hidrogelnog matriksa pogodnog za uklapanje NLC-a i njihovu učinkovitu topikalnu primjenu. Pripremljeni gelovi označeni su kodovima u kojima broj ukazuje na maseni udio ksantanske u formulaciji, dok je u svim koncentracijama udio hijaluronske kiseline 1%. Također, pripremljeni su i kontrolni gelovi bez uklopljenih NLC-a, koji su kao kontinuiranu fazu umjesto NLC-PS80 disperzije koristili 10% vodenu otopinu pentilen glikola. Ovi uzorci označeni su oznakom HaXa_0.5 – HaXa_2.0, dok su uzorci s uklopljenim NLC sadržavali prefiks NLC.

Reološka ispitivanja predstavljaju nezaobilazan dio razvoja i karakterizacije polučvrstih pripravaka jer pružaju informacije o njihovom ponašanju tijekom proizvodnje, skladištenja i primjene. Za procjenu reoloških svojstava najčešće se primjenjuju rotacijski i oscilacijski testovi. Rotacijska mjerenja omogućuju određivanje krivulja tečenja i krivulja viskoznosti te procjenu ponašanja formulacije pri različitim brzinama smicanja, čime se simuliraju uvjeti tijekom proizvodnje i primjene. Nasuprot tome, oscilacijski testovi pružaju informacije o unutarnjoj strukturi sustava i njegovim viskoelastičnim svojstvima, uključujući mehaničku čvrstoću, stupanj strukturiranosti i sposobnost očuvanja fizičke stabilnosti tijekom skladištenja. Zajedno, ove metode omogućuju sveobuhvatnu procjenu kvalitete i funkcionalnosti polučvrstih pripravaka (132,133).

Krivulje viskoznosti pripremljenih kontrolnih i HaXa hidrogelova s uklopljenim NLC-om (Slika 19) ukazuju su njihovo pseudoplastično ponašanje, što ih čini prikladnima za primjenu na koži. Naime, za sve je sustave uočeno smanjenje viskoznosti u zavisnosti o primijenjenom smičnom naprezanju. Smično opterećenje koje nastaje tijekom nanošenja pripravka uzrokuje smanjenje viskoznosti formulacije, čime se olakšava razmazivanje i povećava prihvatljivost pripravka za korisnika (133). Povećanje udjela ksantanske gume dominantno je pridonijelo povećanju viskoznosti praznih hidrogelova, dok je uklapanje NLC-PS80 rezultiralo daljnjim porastom rasta viskoznosti NLC_HaXa hidrogelova. Viskoznosti NLC hidrogelova bile su

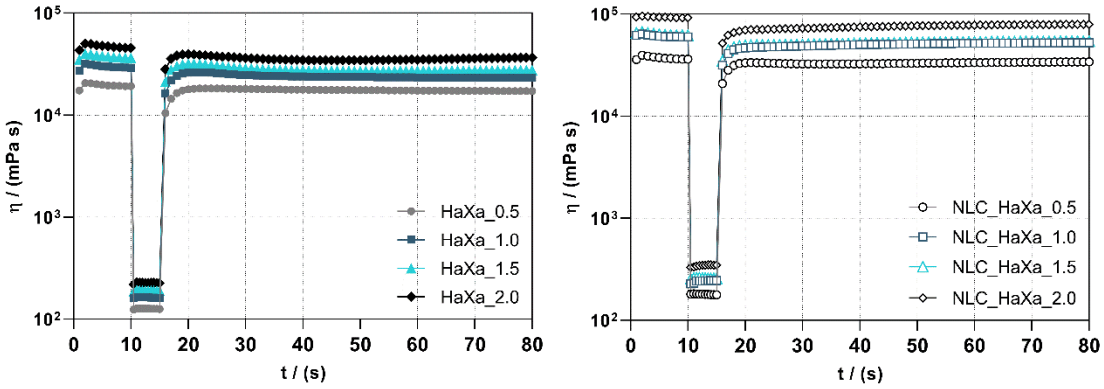
značajno veće od viskoznosti odgovarajućih praznih HaXa hidrogelova, što upućuje na to da NLC-PS80 dodatno doprinosi strukturiranju mreže hidrogela. Sličan je učinak opažen i nakon uklapanja NLC sustava s ibuprofenom hidrogelove na osnovi Carbopola® 934 (134).



Slika 19. Krivulje viskoznosti HaXa hidrogelova bez (lijevo) i sa uklopljenim NLC-ima (desno) koji sadrže 1 % (m/m) natrijevog hijaluronata i različite udjele ksantanske gume (0,5; 1,0; 1,5 i 2,0 % (*m*/*m*)). Radi usporedbe prikazana je i krivulja viskoznosti optimirane NLC disperzije (NLC-PS80, desno).

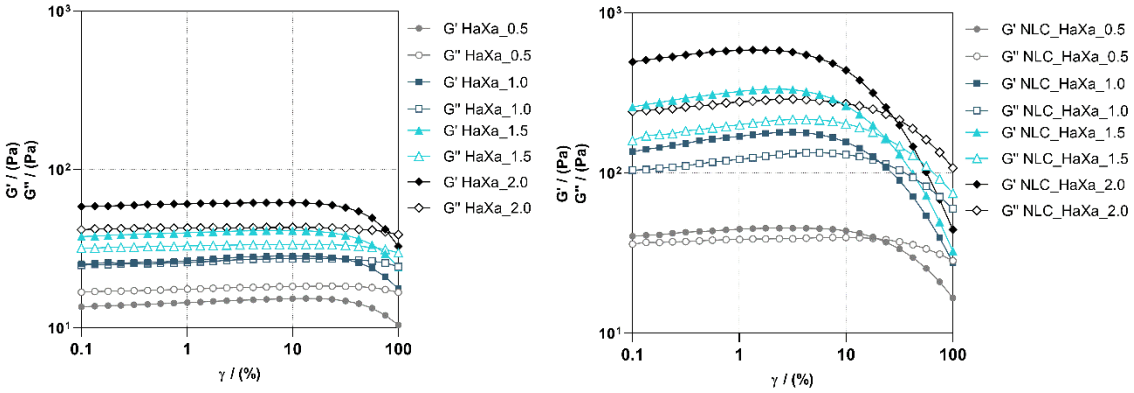
Tiksotropnost hidrogelova dodatno je ispitana je primjenom trostupanjskog testa tiksotoropije (engl. *three-interval thixotropy test, 3-ITT*), kojim se ispituje sposobnost sustava da nakon izlaganja visokom smičnom opterećenju obnovi svoju početnu strukturu. Ovaj test omogućuje procjenu strukturnog oporavka formulacije nakon nanošenja te predstavlja važan pokazatelj njezine prikladnosti za topikalnu primjenu i zadržavanje na mjestu aplikacije. Rezultati ispitivanja su prikazani na Slici 20. Rezultati potvrđuju tiksotropno ponašanje kontrolnih HaXa hidrogelova i HaXa hidrogelova s uklopljenim NLC-om (Slika 20). Kod HaXa hidrogelova s uklopljenim NLC-omm stupanj oporavka viskoznosti 60 sekundi nakon otklanjanja smičnog opterećenja iznosio je od 81,3 % do 86,2 % početne vrijednosti, dok su kod kontrolnih HaXa hidrogelova te vrijednosti nešto niže i kreću se u rasponu od 78,7 % do 80,0 %. Pri tome je uočeno je da hidrogelovi s nižim udjelom ksantanske gume pokazuju veći stupanj oporavka viskoznosti, dok je povećanje koncentracije ksantana bilo povezano s postupnim smanjenjem sposobnosti strukturnog oporavka. Takvo ponašanje vjerojatno je posljedica povećanja viskoznosti i gustoće

polimerne mreže pri višim koncentracijama ksantana, što ograničava pokretljivost polimernih lanaca potrebnu za brzu reorganizaciju strukture nakon prestanka smičnog opterećenja. Dodatno, veći oporavak viskoznosti u sustavima s uklopljenim NLC-om može se povezati s prolaznim i reverzibilnim interakcijama između površine nanočestica i hidrofilnih skupina natrijeva hijaluronata i ksantanske gume, pri čemu NLC čestice aktivno sudjeluju u organizaciji trodimenzionalne hidrogelne mreže. Tijekom izlaganja visokom smičnom opterećenju dolazi do privremenog narušavanja ovih slabih fizičkih interakcija, što uzrokuje smanjenje viskoznosti i olakšava nanošenje pripravka. Nakon prestanka smicanja interakcije se spontano ponovno uspostavljaju, uz reorganizaciju mikrostrukture hidrogela, što rezultira brzim oporavkom mehaničkih svojstava sustava. Sličan je učinak opažen za hidrogelove na osnovi hidroksietilceluloze s uklopljenim NLC-om izrađenim od tripalmitina i Miglyola® 812, gdje je uklapanje nanočestica pridonijelo pseudoplastičnom i tiksotropnom ponašanju sustava te poboljšalo njegovu sposobnost strukturnog oporavka nakon deformacije (135). Takvo reverzibilno, vremenski ovisno smanjenje viskoznosti pod utjecajem smicanja također je važno za postizanje željene razmazivosti i povoljnih senzorskih svojstava formulacije (136).



Slika 20. Vremenski ovisna promjena viskoznosti kontrolnih (lijevo) i HaXa hidrogelova s uklopljenim NLC-om (desno) koji sadrže različite masene udjele ksantanske gume u rasponu od 0,5 do 2,0 %, određena trostupanjskim testom tiksotropnosti (3-ITT).

Za dobivanje detaljnijeg uvida u reološka svojstva pripremljenih hidrogelova provedena su oscilacijska reološka mjerenja. Prvi korak u oscilacijskoj reološkoj karakterizaciji bio je test promjene amplitude (engl. *amplitude sweep test*), kojim je određeno linearno viskoelastično područje (engl. *linear viscoelastic region*, LVE) sustava. U ovom se testu pri konstantnoj frekvenciji postupno povećava amplituda deformacije, pri čemu se prati promjena modula pohrane (G') i modula gubitka (G"). Modul pohrane (G') povezan je s elastičnom komponentom sustava i predstavlja energiju koja se tijekom deformacije pohranjuje te se nakon prestanka djelovanja sile ponovno oslobađa, dok modul gubitka (G") opisuje viskoznu komponentu sustava i energiju koja se disipira u obliku topline. U linearnom viskoelastičnom području (LVE) vrijednosti G' i G" ne ovise o amplitudi deformacije, što ukazuje na očuvanu strukturu sustava tijekom mjerenja, što je preduvjet za provedbu daljnjih oscilacijskih mjerenja, poput frekvencijskog testa, jer omogućuje odabir odgovarajuće amplitude pri kojoj se ispituju intrinzična viskoelastična svojstva sustava bez narušavanja njegove mikrostrukture (132). Rezultati testa promjene amplitude prikazani su na Slici 21.



Slika 21. Ovisnost modula pohrane (G') i modula gubitka (G") o smičnoj deformaciji za kontrolne HaXa hidrogelove (lijevo) i HaXa hidrogelove s uklopljenim NLC (desno) koji sadrže 1 % (*m*/*m*) natrijevog hijaluronata i različite udjele ksantanske gume (0,5; 1,0; 1,5 i 2,0 % (*m*/*m*)).

U linearnom viskoelastičnom području vrijednosti G' bile su veće od vrijednosti modula gubitka G" za sve ispitivane formulacije, osim za kontrolni hidrogel HaXa_0,5. Takav odnos modula upućuje na prevladavajući elastični karakter sustava, odnosno na ponašanje karakteristično

za viskoelastične krutine i formirane hidrogelove (120,137). Nasuprot tome, kod kontrolnog hidrogela HaXa_0,5 vrijednosti modula gubitka (G") bile su veće od vrijednosti modula pohrane (G') u cijelom ispitivanom području deformacije, što ukazuje na dominaciju viskozne komponente i ponašanje karakteristično za viskoelastičnu tekućinu. Navedeni rezultat sugerira da koncentracija ksantanske gume od 0,5 % (m/m) nije bila dostatna za uspostavu dovoljno razvijene hidrogelne mreže u kombinaciji s natrijevim hijaluronatom.

Povećanje koncentracije ksantanske gume na 1,0, 1,5 i 2,0 % (m/m) rezultiralo je značajnim porastom vrijednosti G' i G", pri čemu je porast modula pohrane bio izraženiji od porasta modula gubitka. To upućuje na formiranje mehanički čvršće i strukturiranije hidrogelne mreže s naglašenijim elastičnim svojstvima. Uklapanje NLC-PS80 u hidrogelove dodatno je povećalo vrijednosti oba modula, a posebno modula pohrane, što ukazuje na jaču umreženost i veći stupanj organizacije sustava. Zanimljivo, nakon uklapanja NLC-PS80 čak je i formulacija koja je sadržavala samo 0,5 % (m/m) ksantanske gume pokazivala svojstva gela, pri čemu su vrijednosti G' postale veće od vrijednosti G" (Slika 21).

Povećanje čvrstoće i viskoelastičnosti hidrogelova s uklopljenim NLC-om može se pripisati ravnomjernoj raspodjeli nanočestica unutar polimerne matrice te njihovom sudjelovanju u organizaciji trodimenzionalne mreže hidrogela. Površina NLC čestica može ostvarivati dodatne vodikove veze i elektrostatske interakcije s hidrofilnim skupinama natrijeva hijaluronata i ksantanske gume, čime se povećava kohezivnost sustava i stabilizira njegova mikrostruktura (120). Dodatno, iako je hijaluronska kiselina izrazito hidrofilan polimer, njezina molekulska struktura sadrži hidrofobne domene koje mogu ostvarivati interakcije s lipidnim komponentama NLC sustava, dodatno pridonoseći učvršćenju mikrostrukture hidrogela (129). Posljedično, uklopljene NLC čestice ne djeluju samo kao nosači djelatne tvari, već i kao strukturne komponente koje doprinose mehaničkoj čvrstoći i viskoelastičnim svojstvima hidrogelova.

Čvrstoća hidrogelova dodatno je procijenjena izračunom parametra *tan* δ (G"/G'), koji opisuje odnos između viskozne i elastične komponente sustava, odnosno omjer energije izgubljene tijekom deformacije i energije pohranjene u strukturi gela te često koristi kao pokazatelj stupnja strukturiranosti i mehaničke čvrstoće gelova. Vrijednosti *tan* δ manje od 1 ukazuju na prevladavajući elastični karakter sustava, pri čemu se gelovi s vrijednostima neposredno ispod 1 klasificiraju kao slabi gelovi, sustavi s vrijednostima u rasponu $0,1 < tan\ \delta < 0,5$ kao gelovi srednje

čvrstoće, dok vrijednosti *tan* δ ≤ 0,1 upućuju na formiranje jakih gelova (138). Na temelju vrijednosti *tan* δ određenih pri kutnoj frekvenciji od 1 rad s^{-1} i deformaciji od 1 % (Tablica 4), svi pripremljeni hidrogelovi mogu se klasificirati kao slabi gelovi. Međutim, povećanje udjela ksantanske gume dovelo je do smanjenja vrijednosti *tan* δ, što ukazuje na postupno jačanje mikrostrukture hidrogelne mreže i izraženiji elastični karakter sustava. Posebno je izražen učinak opažen nakon uklapanja NLC-PS80, pri čemu su dodatno snižene vrijednosti *tan* δ te povećan udio pohranjene u odnosu na izgubljenu energiju tijekom deformacije. Navedeni rezultati potvrđuju da povećanje koncentracije ksantanske gume, a osobito uklapanje NLC-a, doprinosi formiranju mehanički čvršće i bolje organizirane hidrogelne mreže.

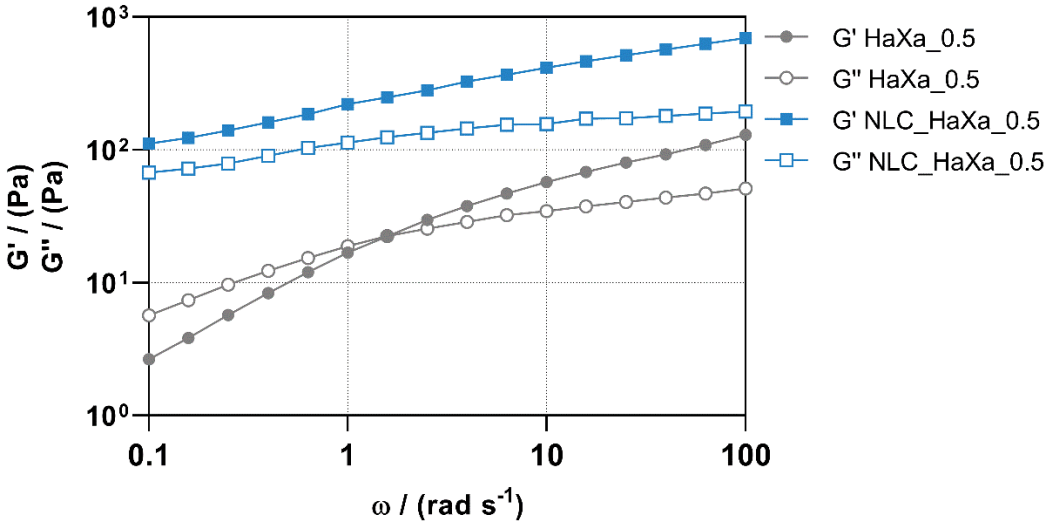
Tablica 4. Utjecaj masenog udjela ksantanske gume i uklapanja NLC-a na vrijednosti *tan* δ HaXa hidrogelova pri 32 °C. Prikazane vrijednosti određene su pri kutnoj frekvenciji od 1 rad s^{-1} i deformaciji od 1 %.

$w_{\text{ksantanska guma}}$ / (%)	*tan δ*	
	HaXa hidrogel	NLC_HaXa hidrogel
0.5	1.214 ± 0.015	0.874 ± 0.014 *
1.0	0.973 ± 0.009	0.734 ±0.024 *
1.5	0.827 ± 0.010	0.635 ± 0.031 *
2.0	0.709 ± 0.007	0.490 ± 0.030 *

(*) - statistički značajna razlika u odnosu na odgovarajući kontrolni HaXa hidrogel ($p < 0{,}0001$).

Budući da su hidrogelovi koji sadrže 1 % (*m*/*m*) natrijeva hijaluronata i 0,5 % (*m*/*m*) ksantanske gume pokazali granična svojstva između gela i viskozne tekućine, odabrani su za test promjene frekvencije. Test promjene frekvencije provodi se unutar linearnog viskoelastičnog područja, pri konstantnoj deformaciji, pri čemu se prati promjena modula pohrane (G') i modula gubitka (G'') u ovisnosti o kutnoj frekvenciji. Ovaj test omogućuje procjenu vremenski ovisnog viskoelastičnog ponašanja sustava, stabilnosti njegove unutarnje strukture te otpornosti na strukturne promjene tijekom skladištenja. Budući da niske frekvencije simuliraju dugotrajna vremenska razdoblja i stanje mirovanja, rezultati testa promjene frekvencije često se koriste za predviđanje dugoročne fizikalne stabilnosti polučvrstih sustava. Rezultati su prikazani na Slici 22.

Kontrolni hidrogel HaXa_0,5 pri višim je frekvencijama pokazuje svojstva gela, pri čemu su vrijednosti modula pohrane (G') bile veće od vrijednosti modula gubitka (G"). Međutim, pri nižim frekvencijama opažena je suprotna pojava (G" > G'), karakteristična za sustave s prevladavajućim viskoznim svojstvima. Presjek modula pohrane i modula gubitka zabilježen je pri kutnoj frekvenciji od 1,5 rad s^{-1}. Takva promjena odnosa između G' i G" ukazuje na narušavanje slabo razvijene hidrogelne mreže i prijelaz sustava iz stanja viskoelastične krutine u stanje viskoelastične tekućine pri dugim vremenskim intervalima. Pojava presjeka modula smatra se pokazateljem ograničene strukturne stabilnosti sustava te upućuje na mogućnost postupne reorganizacije ili slabljenja mikrostrukture hidrogelne mreže tijekom skladištenja (139).



Slika 22. Ovisnost modula pohrane (G') i modula gubitka (G") o smičnoj deformaciji za kontrolne HaXa hidrogelove (lijevo) i HaXa hidrogelove s uklopljenim NLC (desno) koji sadrže 1 % (*m*/*m*) natrijeva hijaluronata i različite udjele ksantanske gume (0,5; 1,0; 1,5 i 2,0 % (*m*/*m*)).

Nasuprot tome, kod HaXa_0,5 hidrogela s uklopljenim NLC vrijednosti *G*' bile su veće od vrijednosti modula gubitka *G*" u cijelom području ispitanih frekvencija, bez pojave presjeka modula. Odsutnost točke presjeka i dominacija elastične komponente neovisno o primijenjenoj frekvenciji ukazuju na formiranje stabilnije i bolje organizirane trodimenzionalne mreže, sposobne

zadržati svoju mikrostrukturu karakter čak i pri vrlo dugim vremenskim periodima. Ovi rezultati potvrđuju da uklapanje NLC-PS80 doprinosi stabilizaciji mikrostrukture hidrogela te poboljšava njezinu reološku stabilnost tijekom skladištenja (140).

Teksturna svojstva predstavljaju važan čimbenik razvoja polučvrstih farmaceutskih i (dermo)kozmetičkih pripravaka jer značajno utječu na njihovu primjenu, prihvatljivost za korisnika i terapijsku učinkovitost. Tekstura obuhvaća skup mehaničkih i strukturnih svojstava koja se primarno percipiraju dodirom i vizualnim opažanjem, a uključuju parametre poput čvrstoće, konzistencije, kohezivnosti i razmazivosti. Navedena svojstva određuju senzorski doživljaj tijekom primjene pripravka te utječu na suradljivost korisnika, budući da povoljna teksturna svojstva mogu povećati prihvaćanje proizvoda i potaknuti njegovu redovitu uporabu (141). Istodobno, tekstura izravno utječe na zadržavanje formulacije na mjestu primjene i ostvarivanje bliskog kontakta između nanočestica i površine kože, što može pridonijeti željenom terapijskom učinku (80). Međutim, pripravci izrazito visoke viskoznosti često pokazuju povećanu kohezivnost i konzistenciju, što može otežati istiskivanje pripravka iz spremnika i njegovo razmazivanje po koži. Stoga je tijekom razvoja formulacije potrebno pažljivo uravnotežiti teksturna i reološka svojstva kako bi se postigla optimalna primjenjivost, ugodno senzorsko iskustvo i odgovarajuće zadržavanje pripravka na mjestu aplikacije (133,142).

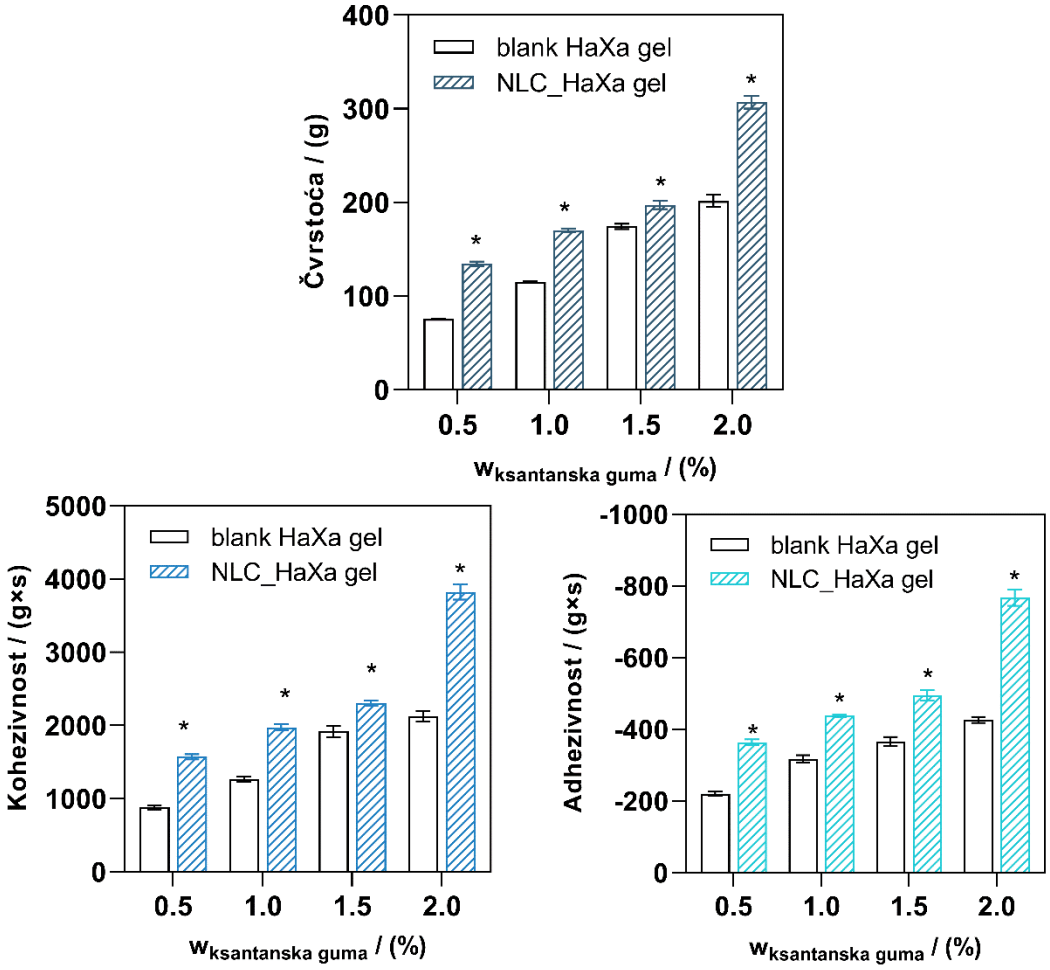
Instrumentalna teksturna analiza omogućuje objektivnu kvantifikaciju navedenih svojstava i predstavlja vrijedan alat za optimizaciju formulacija te predviđanje njihove prihvatljivosti od strane korisnika (141,143). U ovom je radu za procjenu teksturnih svojstava hidrogelova primijenjen test povratne ekstruzije (engl. *backward extrusion test*), kojim su određeni parametri čvrstoće, konzistencije i kohezivnosti. Pritom je potrebno naglasiti da trenutno ne postoje standardizirani protokoli za teksturnu analizu polučvrstih farmaceutskih i (dermo)kozmetičkih pripravaka niti univerzalno prihvaćene referentne vrijednosti pojedinih parametara. Dodatno, uporaba različitih sondi i eksperimentalnih uvjeta u objavljenim istraživanjima otežava izravnu usporedbu rezultata među studijama (141). Rezultati teksturne analize kontrolnih HaXa hidrogelova i HaXa hidrogelova s uklopljenim NLC prikazani su na Slici 23.

Rezultati pokazuju da koncentracija gelirajućeg sredstva ima presudan utjecaj na teksturna svojstva formiranih hidrogelova. Kod kontrolnih HaXa hidrogelova vrijednosti čvrstoće, konzistencije i kohezivnosti povećavale su se približno linearno s porastom koncentracije

ksantanske gume, dok je kod HaXa hidrogelova s uklopljenim NLC porast navedenih parametara bio znatno izraženiji te je pokazivao gotovo eksponencijalni trend. Ovakav rezultat dodatno potvrđuje zaključke dobivene oscilacijskim reološkim mjerenjima, prema kojima uklopljene NLC čestice pozitivno utječu na organizaciju i stabilnost mikrostrukture hidrogela, pridonoseći njezinim mehaničkim svojstvima i ukupnoj strukturnoj čvrstoći.

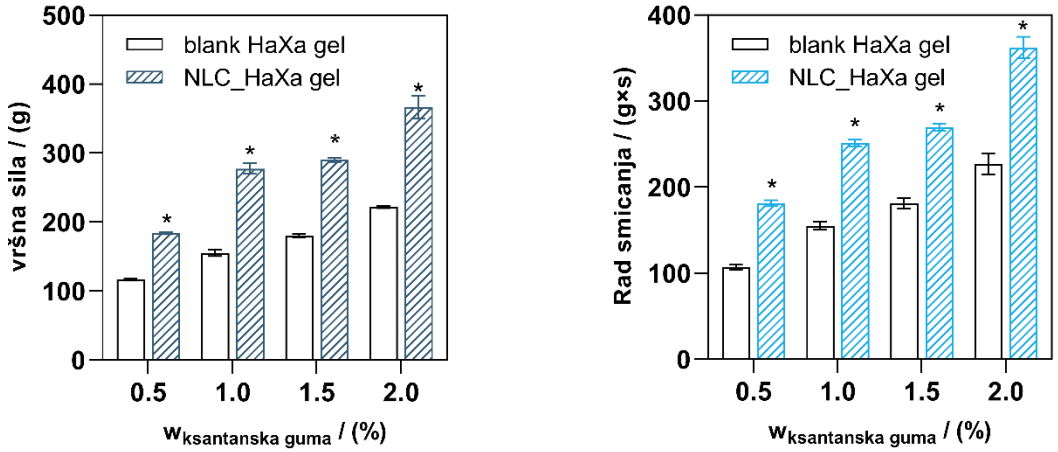
Povećanje teksturnih parametara nakon uklapanja NLC može se objasniti s dodatnim interakcijama između površine nanočestica i polimernih lanaca natrijeva hijaluronata i ksantanske gume. Takve interakcije vjerojatno dovode do formiranja gušće i bolje organizirane trodimenzionalne mreže, što rezultira povećanom otpornošću sustava na deformaciju te višim vrijednostima čvrstoće, konzistencije i kohezivnosti. Sličan pozitivan učinak uklapanja NLC-a na teksturna svojstva hidrogelova opisan je i u drugim istraživanjima (120,144), iako pojedini autori navode suprotan učinak, što se ponajprije pripisuje razlikama u sastavu NLC sustava, vrsti gelirajućeg sredstva te prirodi međusobnih interakcija između nanočestica i polimera korištenih u razvoju hidrogela (145).

Unatoč povećanju teksturnih parametara, razvijeni HaXa hidrogelovi s uklopljenim NLC zadržali su svojstva prikladna za dermalnu primjenu. Naime, vrijednosti čvrstoće i konzistencije bile su usporedive s vrijednostima zabilježenima za komercijalno dostupne polučvrste pripravke za lokalnu primjenu, poput Neoprofen® gela i Ibuactive® kreme, koje su određene u usporedivim eksperimentalnim uvjetima (134). Navedeni rezultati ukazuju da razvijeni hidrogelovi posjeduju odgovarajuću ravnotežu između mehaničke stabilnosti i jednostavnosti primjene, što je važno za osiguravanje dobre razmazivosti, zadržavanja na mjestu aplikacije i prihvatljivosti formulacije za korisnika.



Slika 23. Teksturna svojstva kontrolnih HaXa hidrogelova i HaXa hidrogelova s uklopljenim NLC koji sadrže 1 % (*m*/*m*) natrijeva hijaluronata i različite udjele ksantanske gume (0,5; 1,0; 1,5 i 2,0 % (*m*/*m*)), određena testom povratne ekstruzije pri ambijentalnim uvjetima. Zvjezdica (*) označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajući kontrolni HaXa hidrogel ($p < 0{,}001$).

Razmazivost je jedno od ključnih svojstava topikalnih pripravaka jer značajno utječe na jednostavnost primjene, jednoliku raspodjelu formulacije na površini kože i prihvatljivost pripravka za korisnika. Dobra razmazivost omogućuje ravnomjerno prekrivanje tretirane površine uz primjenu minimalne sile, čime se osigurava učinkovit kontakt formulacije s kožom te potencijalno poboljšava terapijska i kozmetička učinkovitost pripravka (81). Osim toga, razmazivost predstavlja važan čimbenik koji pridonosi suradljivosti korisnika, budući da formulacije koje se lako nanose i ugodno raspoređuju po koži češće rezultiraju boljim pridržavanjem preporučenog režima primjene od strane bolesnika. Razmazivost polučvrstih pripravaka rezultat je složene interakcije brojnih fizikalnih svojstava formulacije. Iako viskoznost predstavlja jedan od najvažnijih čimbenika, na razmazivost značajno utječu i strukturna, viskoelastična i teksturna svojstva sustava, uključujući čvrstoću hidrogelne mreže, kohezivnost te odnos elastične i viskozne komponente materijala (146). Stoga se razmazivost ne može promatrati kao izolirano svojstvo, već kao posljedica ukupne organizacije mikrostrukture formulacije.



Slika 24. Parametri razmazivosti (vršna sila i rad smicanja) kontrolnih HaXa hidrogelova i HaXa hidrogelova s uklopljenim NLC koji sadrže 1 % (*m*/*m*) natrijeva hijaluronata i različite udjele ksantanske gume (0,5; 1,0; 1,5 i 2,0 % (*m*/*m*)), određeni TTC testom razmazivosti pri ambijentalnim uvjetima. Zvjezdica (*) označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajući kontrolni HaXa hidrogel ($p < 0{,}001$).

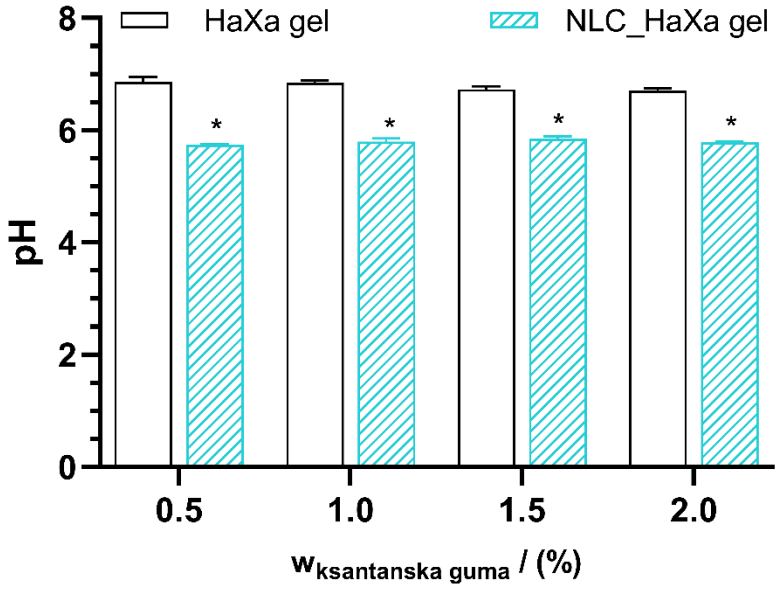
Razvijeni HaXa hidrogelovi s uklopljenim NLC pokazali su niske vrijednosti vršne sile i rada smicanja tijekom testa razmazivosti (Slika 24), što upućuje na njihovu prikladnost za dermalnu

primjenu. Formulacije su se pod djelovanjem relativno male sile lako raspoređivale po površini, što je u skladu s prethodno utvrđenim pseudoplastičnim i tiksotropnim ponašanjem. Manje razlike u vrijednostima razmazivosti između pojedinih formulacija mogu se povezati s različitim udjelima ksantanske gume i prisutnošću uklopljenih NLC-a, koji su utjecali na reološka, viskoelastična i teksturna svojstva hidrogelova. Unatoč povećanoj čvrstoći i konzistenciji opaženoj kod formulacija s višim udjelom ksantanske gume i uklopljenim NLC-om, svi ispitivani hidrogelovi zadržali su zadovoljavajuću razmazivost, što potvrđuje uspješno postignutu ravnotežu između mehaničke stabilnosti sustava i njegove jednostavne primjene na koži.

pH vrijednost predstavlja jedan od ključnih parametara kvalitete pripravaka namijenjenih dermalnoj primjeni jer može utjecati na integritet kožne barijere, aktivnost enzima u rožnatom sloju, sastav kožne mikrobiote te podnošljivost pripravka. Zdrava koža posjeduje blago kiseli zaštitni omotač (engl. *acid mantle*) s pH vrijednošću približno između 4,5 i 6,0, koji je neophodan za održavanje barijerne funkcije, regulaciju procesa deskvamacije i sprječavanje kolonizacije patogenih mikroorganizama. Odstupanja prema višim pH vrijednostima mogu dovesti do narušavanja barijerne funkcije kože, povećane aktivnosti proteolitičkih enzima i razvoja upalnih procesa, zbog čega je poželjno da topikalne formulacije imaju pH kompatibilan s fiziološkim pH kože (10).

Rezultati mjerenja pH vrijednosti kontrolnih HaXa hidrogelova i hidrogelova s uklopljenim NLC prikazani su na Slici 25. pH vrijednost kontrolnih HaXa hidrogelova iznosila je približno 6,5 te se nije značajno mijenjala s promjenom koncentracije ksantanske gume. Iako je NLC_PS80 disperzija pokazivala usporedivu pH vrijednost kao i kontrolni hidrogelovi, njezino uklapanje u hidrogel rezultiralo je sniženjem pH vrijednosti sustava na približno 5,8. Opaženo sniženje pH vrijednosti vjerojatno je posljedica interakcija između NLC čestica i polisaharidnih komponenti hidrogelne mreže, pri čemu dolazi do promjene stupnja ionizacije odnosno disocijacije karboksilnih skupina glukuronske kiseline prisutnih u strukturi natrijeva hijaluronata. Takve interakcije mogu utjecati na ravnotežu protoniranih i deprotoniranih oblika funkcionalnih skupina te posljedično promijeniti pH formulacije. Međutim, unatoč navedenim promjenama, sve formulacije zadržale su pH vrijednosti unutar raspona prihvatljivog za dermalnu primjenu. Dodatno, pH vrijednost hidrogelova s uklopljenim NLC bila je bliža fiziološkoj kiselosti površine

kože, što može doprinijeti očuvanju kožne barijere i dobroj podnošljivosti formulacije pri topikalnoj primjeni (10).



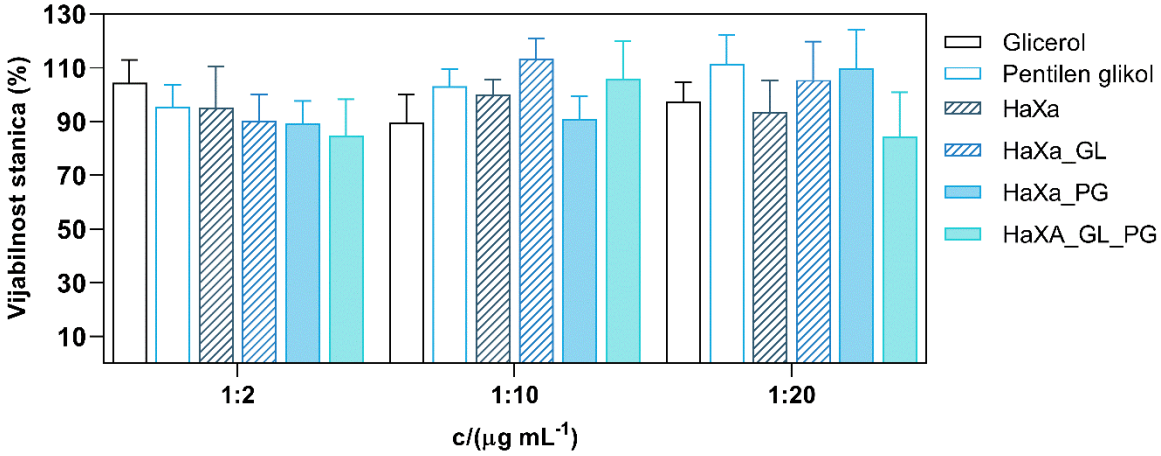
Slika 25. pH vrijednosti kontrolnih HaXa hidrogelova (lijevo) i HaXa hidrogelova s uklopljenim NLC (desno) koji sadrže različite udjele ksantanske gume (0,5; 1,0; 1,5 i 2,0 % (*m*/*m*)). Zvjezdica (*) označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajući kontrolni HaXa hidrogel ($p < 0,0001$).

4.5 Biofarmaceutska karakterizacija NLC disperzija i pripremljenih NLC hidrogelova

Biokompatibilnost predstavlja jedno od ključnih svojstava topikalnih formulacija jer osigurava njihovu sigurnu primjenu na koži bez izazivanja citotoksičnih, iritacijskih ili upalnih reakcija. Prije kliničke primjene nužno je procijeniti potencijal formulacije da očuva vitalnost stanica kože i integritet epidermalne barijere. To je osobito važno kod suvremenih nanosustava, poput SLN-a i NLC-a, koji omogućuju poboljšanu dostavu djelatnih tvari, ali zahtijevaju detaljnu procjenu njihove sigurnosti (58). U procjeni biokompatibilnosti topikalnih formulacija posebno je relevantan stanični model ljudskih keratinocita HaCaT. Keratinociti čine dominantnu staničnu populaciju epidermisa te predstavljaju prvu staničnu barijeru izloženu primijenjenoj formulaciji. Zbog toga

omogućuju pouzdanu procjenu citotoksičnosti, stanične vitalnosti i mogućeg iritacijskog potencijala formulacija. U brojnim istraživanjima HaCaT stanice korištene su za određivanje biokompatibilnosti SLN i NLC sustava primjenom MTT testa (57,147).

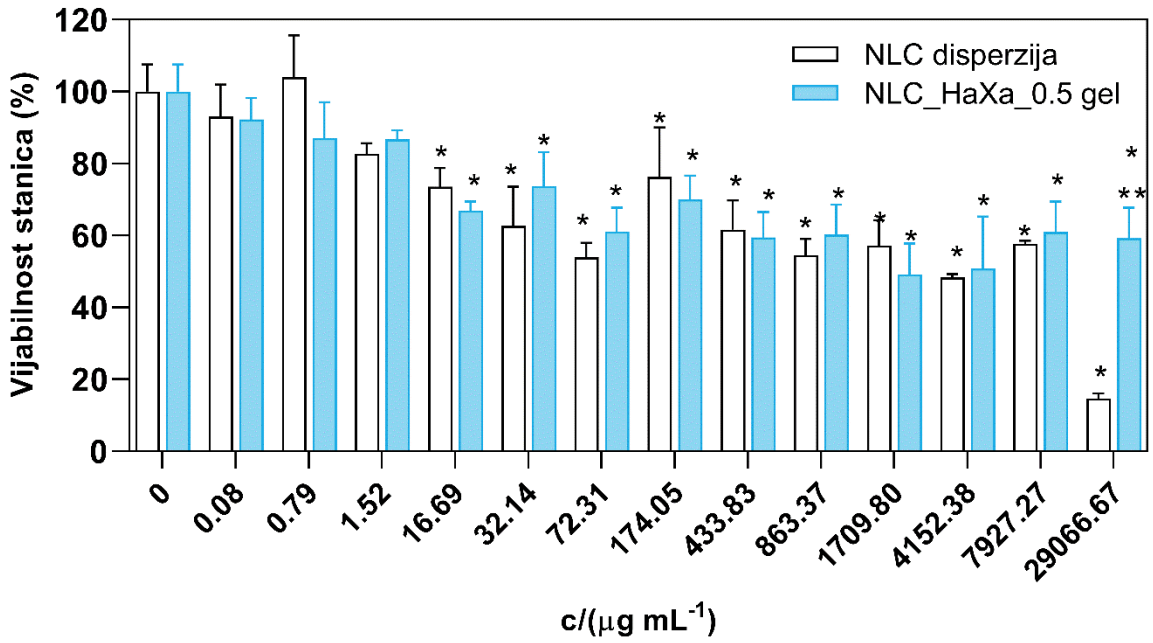
U ovom istraživanju, najprije je procijenjena biokompatibilnost svake od komponenata formulacije. Pri tome, glicerol i pentilen glikol su najprije pomiješani s pročišćenom vodom čime su pripremljene otopine čija koncentracija je odgovarala koncentracijama ovih sastavnica u pripravku. Prije nanošenja na stanice, uzorci su razrijeđeni 2, 10 i 20 puta s HBSS-om . Također, ispitana je i biokompatibilnost kontrolnih HaXa gelova. Obzirom na reološka svojstva, ispitivanje je ograničeno na uzorke koji su sadržavali 0,5 % (m/m) ksantanske gume. Pri tome su pripremljeni gelovi koji su sadržavali samo polimere (HaXa uzorak), zatim gelovi koji su sadržavali polimere i glicerol, odnosno pentilen glikol (uzorci HaXa_GL i HaXa_PG) te kontrolni uzorak gela koji je sadržavao oba poliola u koncentraciji koja je odgovarala onoj u razvijenoj formulaciji HaXa hidrogela. I ovi uzorci su prije nanošenja na stanice bili razrijeđeni s HBSS-om u omjeru 1:2, 1:10 i 1:20. Vrijednosti vijabilnosti HaCaT stanica određene MTT testom za ovako pripremljene uzorke prikazane su na Slici 26.



Slika 26. Biokompatibilnost sastavnica HaXa hidrogela (glicerol, pentilen glikol i kontrolni HaXa gel) te kontrolnih hidrogelovi različitog sastava obzirom na sadržaj glicerola i pentilen glikola (HaXa_GL, HaXa_PG i HaXa_GL_PG hidrogel) ispitana na HaCaT staničnoj liniji primjenom MTT testa.

Rezultati MTT testa na HaCaT staničnom modelu pokazuje da za ispitivane uzorke vijabilnost je u pravilu veća od 90 %. Prema normi ISO 10993-5 uzorak se smatra necitotoksičnim ako vijabilnost stanica iznosi najmanje 70 % u odnosu na negativnu kontrolu (147), dok neki autori vijabilnost veću od 80% ističu kao pokazatelj biokompatibilnosti ispitivanih sustava (148). U tom smislu, ispitivane sirovine i kontrolni HaXa gelovi mogu se smatrati biokompatibilnima, što je u skladu s iskustvima njihove dugogodišnje primjene u razvoju topikalnih formulacija.

U sljedećoj fazi ispitivanja, određena je vijabilnost HaCaT stanica nakon izlaganja uzrocima NLC-PS80 disperzije i NLC_HaXa hidrogela koji je sadržavao 0,5 % (*m*/*m*) ksantanske gume. Ovi uzorci su prije nanošenja na stanice pomiješani s HBSS-om u omjerima 1:2 do 1:100 000, a vijabilnost stanica nakon 2 sata izloženosti tako pripremljenim uzorcima izražena je u ovisnosti o ukupnoj masenoj koncentraciji lipida u ispitivanim uzorcima (Slika 27).



Slika 27. Biokompatibilnost NLC_PS80 disperzije i NLC_HaXa_0.5 hidrogela ispitana na staničnoj liniji HaCaT primjenom MTT testa. Jedna zvjezdica (*) označava statistički značajnu razliku u odnosu na negativnu kontrolu ($p < 0{,}001$), dok dvije zvjezdice (**) označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na disperziju NLC_PS80 pri istoj koncentraciji ($p < 0{,}001$).

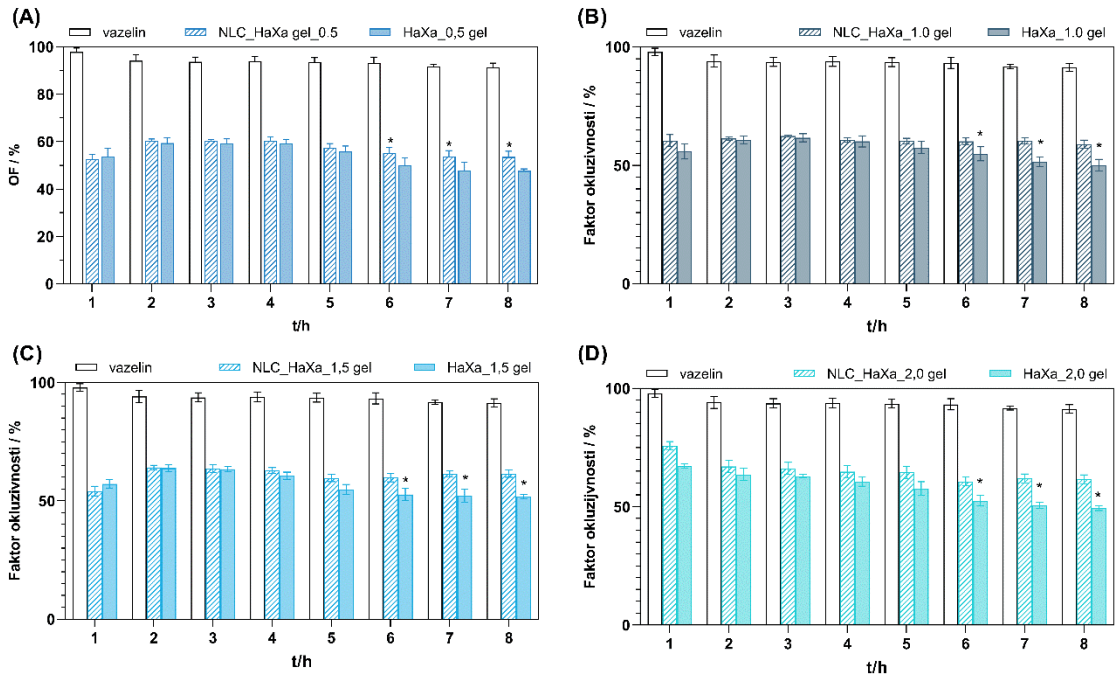
Rezultati MTT testa pokazali su da je vijabilnost keratinocita ovisila o koncentraciji ispitivanih uzoraka te se počela smanjivati pri koncentracijama višim od 16,69 μg mL^{-1} za disperziju NLC_PS80 i hidrogel NLC_HaXa_0.5. Unatoč tome, čak je i pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji hidrogel NLC_HaXa_0.5 pokazao tek slabo izražen citotoksični učinak, pri čemu se vijabilnost stanica zadržala u rasponu od 60 do 80 %, što se prema pojedinim autorima klasificira kao slaba citotoksičnost (148). Važno je istaknuti da su tijekom *in vitro* ispitivanja stanice izložene znatno višim koncentracijama formulacije nego što je to slučaj nakon topikalne primjene na kožu. Naime, samo manji dio lipidnih nanočestica uspijeva proći kroz rožnati sloj i doprijeti do dubljih slojeva epidermisa gdje može doći u kontakt sa živim keratinocitima. Prema tome, premda je pri najvišim ispitivanim koncentracijama zabilježeno određeno smanjenje vijabilnosti HaCaT stanica, dobivene rezultate potrebno je interpretirati u kontekstu ograničenja korištenog modela obzirom da sve sastavnice ispitivanog NLC sustava (pčelinji vosak, arganovo ulje, ceramidi i kolesterol) imaju dobro dokumentiranu sigurnost i dugogodišnju primjenu u topikalnim i kozmetičkim pripravcima.

Nadalje, literatura pokazuje da monoslojne kulture HaCaT keratinocita mogu pokazivati veću osjetljivost na djelovanje kemijskih tvari nego trodimenzionalni modeli kože koji bolje oponašaju strukturu i barijernu funkciju epidermisa. Mini i sur. (149) pokazali su da su citotoksični učinci testiranih spojeva bili izraženiji u HaCaT monosloju nego u trodimenzionalnom modelu epidermisa, dok su Şenkal i sur. (150) utvrdili značajne razlike u odgovoru stanica na kemijske stresore između 2D i 3D HaCaT modela. Stoga se ne može isključiti mogućnost da HaCaT monoslojni model u određenoj mjeri precjenjuje citotoksični potencijal ispitivanih NLC formulacija te da bi procjena provedena na rekonstruiranom višeslojnom epidermisu pokazala još povoljniji sigurnosni profil. Upravo zbog toga su tijekom posljednjih godina razvijeni komercijalno dostupni trodimenzionalni modeli rekonstruiranog humanog epidermisa, poput EpiDerm®, EpiSkin® i SkinEthic® RHE, koji oponašaju morfološka i funkcionalna svojstva ljudske epiderme, uključujući formiranje rožnatog sloja i epidermalne barijere. Ovi modeli danas predstavljaju međunarodno prihvaćene metode za procjenu nadražujućeg potencijala tvari i formulacija te su validirani prema smjernicama OECD-a (engl. *Organisation for Economic Co-operation and Development*). OECD je međunarodna organizacija koja, između ostaloga, razvija i harmonizira smjernice za sigurnosno ispitivanje kemikalija, medicinskih proizvoda i kozmetičkih sastavnica. OECD-ova smjernica 439 (engl. *Test Guideline 439*) prepoznaje rekonstruirane modele humanog

epidermisa kao prihvatljivu alternativu pokusima na životinjama za procjenu iritacije kože (151). Međutim, primjena rekonstruiranih 3D modela kože zahtijeva specijaliziranu infrastrukturu, složenije protokole uzgoja stanica, dulje vrijeme provedbe eksperimenata te dodatna financijska sredstva i stručna znanja za uspostavljanje, održavanje i validaciju modela (58,150), što je izvan okvira ovog doktorskog rada.

Ispitivanje okluzivnosti također predstavlja važan dio biofarmaceutske karakterizacije razvijenih gelova jer pruža uvid u njihovu sposobnost smanjenja transepidermalnog gubitka vode i održavanja hidratacije kože. Okluzivni učinak jedna je od ključnih karakteristika topikalnih formulacija budući da doprinosi očuvanju fizičke barijerne funkcije kože, povećava hidrataciju rožnatog sloja te može poboljšati penetraciju i lokalnu raspoloživost djelatnih tvari u koži. Ovi su učinci osobito važni kod formulacija namijenjenih primjeni na suhu, osjetljivu ili oštećenu kožu, gdje povećana hidratacija može pridonijeti obnovi epidermalne barijere i poboljšanju terapijskog učinka (66,79).

U ovom je istraživanju okluzivnost kontrolnih HaXa gelova i hidrogelova s uklopljenim NLC-om određena i uspoređena s vazelinom, dobro poznatim okluzivnim sredstvom koje se često koristi kao referentni standard za procjenu okluzivnog učinka (79,152). Reprezentativni rezultati prikazani su na Slici 28. Očekivano, vazelin je kao pozitivna kontrola pokazao gotovo potpunu okluziju u korištenom *in vitro* modelu, što je u skladu s njegovom dobro dokumentiranom primjenom u kliničkoj praksi.



Slika 28. Promjena *in vitro* faktora okluzivnosti u ovisnosti o vremenu za kontrolne HaXa hidrogelove i hidrogelove s uklopljenim NLC-om koji sadrže 1 % (*m*/*m*) natrijevog hijaluronata te 0,5 % (*m*/*m*; A), 1,0 % (*m*/*m*; B), 1,5 % (*m*/*m*; C) i 2,0 % (*m*/*m*; D) ksantanske gume (XA). Kao pozitivna kontrola korišten je vazelin. Zvjezdica (*) označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajući kontrolni HaXa hidrogel ($p < 0{,}001$).

Faktori okluzivnosti određeni za kontrolni HaXa hidrogel i hidrogel s uklopljenim NLC-om, koji su sadržavali 1 % (*m*/*m*) natrijevog hijaluronata i 0,5 % (m/m) ksantanske gume (Slika 29A), bili su statistički značajno niži od vrijednosti dobivenih za vazelin ($p < 0{,}05$), dosežući približno 60 % njegova okluzivnog učinka. Nadalje, tijekom prvih pet sati ispitivanja kontrolni HaXa hidrogel i hidrogel s uklopljenim NLC-om pokazivali su usporedive vrijednosti faktora okluzivnosti. Statistički značajno veća okluzivnost hidrogela s uklopljenim NLC-om uočena je tek nakon šest sati trajanja pokusa (Slika 28A).Visoka početna okluzivnost kontrolnog HaXa hidrogela vjerojatno se može pripisati prisutnosti hijaluronske kiseline, koja posjeduje izraženu sposobnost vezanja i zadržavanja vode (129). Posljedično, prolazak vode kroz sloj hidrogela u početnoj je fazi bio ograničen neovisno o prisutnosti NLC-a u formulaciji. Međutim, tijekom vremena dolazi do postupnog isušivanja gela i smanjenja njegovog vlastitog okluzivnog učinka. U toj fazi dolazi do izražaja doprinos NLC sustava, pri čemu lipidne nanočestice na površini membrane stvaraju

koherentan lipidni film koji dodatno ograničava gubitak vode isparavanjem (79). Sličan *in vitro* okluzivni učinak zabilježen je i za hidrogelne formulacije koje su sadržavale više koncentracije ksantanske gume (Slika 28B, C i D).

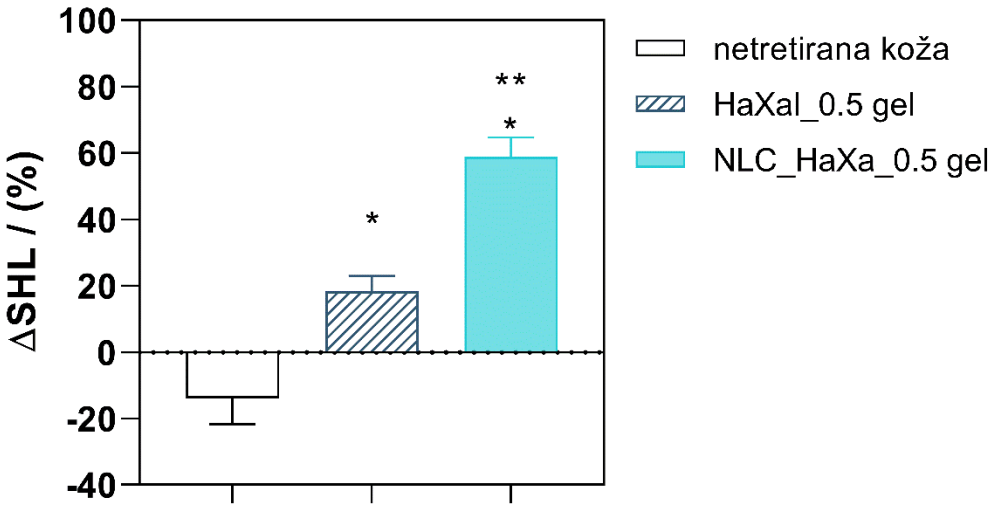
Poznato je da veličina lipidnih nanočestica značajno utječe na njihov okluzivni potencijal. Eksperimentalno je pokazano da lipidne nanočestice veličine veće od 1 μm ostvaruju okluzivni faktor od svega približno 10 %, dok nanočestice veličine oko 200 nm mogu postići vrijednosti bliske 50 % (36). Nanočestice manjih dimenzija učinkovitije ispunjavaju međuprostore i formiraju kompaktniji lipidni film na površini kože, čime se povećava njihov okluzivni učinak. Stoga se može pretpostaviti da bi dodatno smanjenje veličine NLC-a moglo rezultirati još izraženijom okluzivnošću razvijenih HaXa gelova. Osim veličine čestica, važan čimbenik predstavlja i stupanj kristaliničnosti lipidne matrice. Wissing i Müller (153) pokazali su da se okluzivni učinak povećava s porastom kristaliničnosti lipidne faze, dok je kod amorfnih ili slabo kristaliničnih sustava okluzija znatno manje izražena te se nakon nekoliko sati praktički više ne može detektirati. Također, na intenzitet okluzivnog učinka može utjecati i koncentracija NLC-a u formulaciji. Veći udio lipidnih nanočestica pogoduje stvaranju gušćeg i homogenijeg lipidnog sloja na površini kože, čime se dodatno smanjuje transepidermalni gubitak vode. U tom smislu, u budućim istraživanjima trebalo bi razmotriti i povećanje udjela NLC-a u hidrogelu.

Procjena sposobnosti razvijenih formulacija da obnove narušenu epidermalnu barijeru provedena je na *ex vivo* modelu svinjskog uha, koji se smatra jednim od najrelevantnijih i najčešće korištenih modela za istraživanja namijenjena topikalnoj primjeni. Svinjska koža pokazuje visok stupanj morfološke, histološke i fiziološke sličnosti s ljudskom kožom, zbog čega se široko koristi kao prikladan model za procjenu dermalne penetracije, djelovanja topikalnih pripravaka te interakcija formulacija s kožnom barijerom (154,155). Posebna prednost modela intaktnog svinjskog uha jest činjenica da koža tijekom ispitivanja ostaje povezana s hrskavičnim tkivom, čime se održavaju prirodna napetost kože i njezina strukturna organizacija, što omogućuje provođenje ispitivanja u uvjetima koji u znatnoj mjeri oponašaju fiziološko stanje kože *in vivo* (65).

U literaturi je dodatno istaknuto da se za ovakva istraživanja prednost daje svježe izoliranim svinjskim ušima jer se tijekom postmortalnog razdoblja odvijaju brojne biokemijske i fizikalne promjene koje mogu utjecati na svojstva kože. Nakon klanja dolazi do razvoja postmortalne ukočenosti (*rigor mortis*), procesa koji uzrokuje kontrakciju mišićnih vlakana, smanjenje

međustaničnih prostora i smanjenu sposobnost zadržavanja vode u tkivu. Posljedica toga su promjene u hidrataciji kože, transepidermalnom gubitku vode i drugim biofarmaceutskim parametrima važnima za procjenu učinkovitosti topikalnih formulacija (65). Stoga uporaba svježeg tkiva omogućuje dobivanje rezultata koji bolje odražavaju fiziološke uvjete kože.

Epidermalna barijera najprije je narušena primjenom natrijeva lauril sulfata (SLS) (84), nakon čega je njezin oporavak praćen određivanjem stupnja hidratacije kože nakon primjene kontrolnih HaXa hidrogelova i hidrogelova s uklopljenim NLC-om (156). U ispitivanje su uključeni samo uzorci koji su sadržavali 1,0 % (m/m) natrijeva hijaluronata i 0,5 % (m/m) ksantanske gume. Kao referentna vrijednost istodobno je praćena hidratacija netretirane kože. Stupanj hidratacije kože određen je primjenom uređaja Multi Skin Test Center® MC 1000, opremljenog sondom koja sadržaj vode u površinskim slojevima kože procjenjuje mjerenjem električnog kapaciteta kože (64). Budući da je električni kapacitet kože izravno povezan sa sadržajem vode u rožnatom sloju, ova metoda predstavlja široko prihvaćen, neinvazivan pristup za procjenu hidratacijskog statusa kože i učinkovitosti hidratizirajućih topikalnih formulacija. Praćenje promjena u stupnju hidratacije nakon oštećenja epidermalne barijere omogućuje neizravnu procjenu sposobnosti ispitivanih formulacija da obnove barijernu funkciju kože i smanje gubitak vode iz površinskih slojeva kože. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 29.



Slika 29. Relativne promjene stupnja hidratacije kože (Δ*SHL*) nakon primjene kontrolnog HaXa_0.5 hidrogela i hidrogela s uklopljenim NLC-om na *ex vivo* model svinjskog uha s epidermalnom barijerom narušenom tretmanom natrijevim lauril-sulfatom. Netretirana koža korištena je kao kontrola. Jedna zvjezdica (*) označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0{,}001$), dok dvije zvjezdice (**) označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kožu tretiranu kontrolnim HaXa_0.5 hidrogelom ($p < 0{,}001$).

Netretirana (kontrolna) područja kože pokazivala su smanjenje stupnja hidratacije tijekom eksperimenta. Budući da izolirano svinjsko uho nema aktivnu cirkulaciju krvi, tijekom vremena neizbježno dolazi do postupne dehidratacije tkiva i kože. Taj je proces dodatno izražen nakon oštećenja epidermalne barijere izazvanog tretmanom SLS-om. Unatoč tome, primjena kontrolnog HaXa_0.5 hidrogela dovela je do povećanja stupnja hidratacije kože. Taj se učinak može pripisati prisutnosti hijaluronske kiseline i glicerola u formulaciji. Hijaluronska kiselina poznata je po iznimnoj sposobnosti vezanja i zadržavanja vode, dok glicerol djeluje kao humektans te privlači i zadržava vlagu u rožnatom sloju (126,127,157). Dodatno, prethodno utvrđeni okluzivni učinak ove formulacije vjerojatno je pridonio smanjenju gubitka vode s površine kože i posljedičnom povećanju njezine hidratacije.

Još izraženiji učinak zabilježen je nakon primjene hidrogela s uklopljenim NLC-om, koji je pokazao superiornu sposobnost povećanja hidratacije kože u odnosu na odgovarajući kontrolni hidrogel (Slika 29). Takvo djelovanje vjerojatno je posljedica sinergijskog doprinosa komponenti NLC sustava, osobito arganova ulja i ceramida. Obje sastavnice poznate su po svojoj sposobnosti poboljšanja hidratacijskog statusa kože i potpore funkciji epidermalne barijere (9,12,68,88).

Dodatno, moguće je da su se NLC-i nakon primjene djelomično integrirali u međustanični lipidni matriks rožnatog sloja te tako nadomjestili dio lipidnih sastavnica uklonjenih djelovanjem SLS-a. Takva pretpostavka u skladu je s poznatim mehanizmima djelovanja lipidnih nanočestica u dermalnoj primjeni (9,14,67), iako bi njezina potvrda zahtijevala dodatna istraživanja primjenom odgovarajućih strukturnih i biofizičkih metoda, što je izvan opsega ovog doktorskog rada. Dobiveni rezultati u skladu su s opažanjima Tichote i suradnika (86), koji su pokazali da povećanje hidratacije kože nakon primjene NLC formulacija koje sadrže arganovo ulje proizlazi iz kombiniranog djelovanja okluzivnog učinka lipidnih nanočestica i hidratacijskog potencijala samog ulja. U slučaju NLC_PS80 sustava taj je učinak vjerojatno dodatno pojačan prisutnošću ceramida, koji predstavljaju ključne fiziološke sastavnice epidermalne lipidne barijere te imaju važnu ulogu u njezinu održavanju i obnovi (9,12,14). Sveukupno promatrano, rezultati upućuju na to da razvijeni hidrogelovi, posebice oni s uklopljenim NLC-om, mogu učinkovito pridonijeti obnovi funkcije epidermalne barijere nakon njezina oštećenja. Povećanje hidratacije kože, zajedno s prethodno utvrđenim okluzivnim svojstvima formulacija, ukazuje na njihov potencijal za primjenu u topikalnim pripravcima namijenjenima njezi suhe, osjetljive ili oštećene kože, kao i za formulacije usmjerene na obnovu narušene barijerne funkcije rožnatog sloja.

Ipak, iako dobiveni rezultati upućuju na povoljan učinak formulacija na funkcionalni oporavak epidermalne barijere, primijenjene metode ne omogućuju izravnu potvrdu ugradnje ceramida i kolesterola iz formulacije u lipidni matriks rožnatog sloja niti procjenu njihovog utjecaja na njegovu strukturnu organizaciju. Takvi bi se mehanizmi u budućim istraživanjima mogli detaljnije razjasniti primjenom strukturnih analitičkih metoda poput ATR-FTIR spektroskopije i SAXS analize, koje omogućuju praćenje promjena u lateralnom pakiranju lipida, stupnju uređenosti lipidnih lanaca i lamelarnoj organizaciji rožnatog sloja (7). Dodatne informacije o prostornoj raspodjeli egzogeno primijenjenih lipida mogle bi se dobiti Ramanovom mikrospektroskopijom (158), dok bi kombinacija tape-stripping metode i LC-MS/MS analize

omogućila kvantitativno određivanje promjena u sastavu pojedinih lipidnih frakcija rožnatog sloja nakon primjene formulacija (159). Međutim, provedba takvih istraživanja zahtijeva specijaliziranu analitičku infrastrukturu, ekspertizu iz područja strukturne karakterizacije i lipidomike te interdisciplinarne suradnje, zbog čega nadilazi ciljeve i eksperimentalni opseg ovog doktorskog rada. Temeljem navedenoga, detaljno razjašnjavanje interakcija ceramida i kolesterola s lipidnim matriksom rožnatog sloja predstavlja važan smjer budućih istraživanja.

5 ZAKLJUČCI

U ovom radu uspješno je razvijena topikalna nanokompozitna formulacija temeljena na nanostrukturiranim lipidnim nosačima, koja sadrži ceramid NG i kolesterol kao funkcionalne komponente namijenjene obnovi i potpori funkcije epidermalne barijere kože. Kao lipidni matriks korištene su sirovine fiziološkog i prirodnog podrijetla, uključujući pčelinji vosak kao čvrsti lipid te arganovo ulje kao tekući lipid, uz dodatak α-tokoferola i pentilen glikola kao multifunkcionalnih sastavnica formulacije. Među ispitivanim sustavima emulgatora, kombinacija polisorbata 80 i gliceril monostearata pokazala se najprikladnijom za pripravu stabilnih NLC disperzija, omogućujući dobivanje nanočestica prosječne veličine 215,5 ± 0,9 nm, niske polidisperznosti (PDI ≈ 0,20) i izraženo negativnog zeta potencijala (oko –40 mV), uz zadovoljavajuću koncentraciju formiranih čestica.

Povećanjem brzine homogenizacije dodatno je smanjena veličina čestica bez negativnog utjecaja na njihovu koloidnu stabilnost. Uključivanje pentilen glikola u lipidnu fazu tijekom priprave pokazalo se pogodnim pristupom jer je rezultiralo manjim i homogenijim česticama u usporedbi s njegovim dodatkom u vodenu fazu. S druge strane, dodatak glicerola tijekom procesa priprave NLC-a povećavao je veličinu čestica, osobito pri višim koncentracijama, zbog čega nije bio prikladan za uključivanje u formulaciju u fazi formiranja nanočestica.

Optimirana NLC disperzija zadovoljila je zahtjeve Europske farmakopeje za djelotvornost antimikrobnog konzerviranja te je pokazala odgovarajuću mikrobiološku zaštitu tijekom cijelog razdoblja ispitivanja. Također je potvrđena njezina dobra fizička stabilnost tijekom ubrzanih testova centrifugiranja i tijekom šestomjesečnog skladištenja pri 4 °C i 25 °C.

DSC i XRPD analizom utvrđeno je da razvijeni NLC sustav karakterizira lipidni matriks smanjene kristaliničnosti, pri čemu su ceramid NG i kolesterol bili prisutni u amorfnom obliku, dok je ukupna struktura odgovarala NLC-u tipa nesavršene kristalne rešetke. Istodobno, pčelinji vosak kao dominantna čvrsta lipidna komponenta zadržao je obilježja najstabilnije polimorfne modifikacije, što upućuje na dobru strukturnu organizaciju i povoljnu dugoročnu stabilnost razvijenog sustava. Amorfno stanje ceramida NG i kolesterola može se smatrati funkcionalno poželjnim obilježjem formulacije jer povećava njihovu molekulsku dostupnost za interakciju s lipidnim strukturama kože te potencijalno olakšava uklapanje u međustanični lipidni matriks i obnovu narušenih lamelarnih struktura epidermalne barijere.

Uspješno su pripravljeni hidrogelovi na osnovi natrijeva hijaluronata i ksantanske gume s uklopljenim NLC-om. Svi razvijeni hidrogelovi pokazali su pseudoplastično i tiksotropno ponašanje poželjno za topikalnu primjenu. Ksantanska guma imala ključnu ulogu u određivanju reoloških, viskoelastičnih i teksturnih svojstava razvijenih hidrogelova. Povećanjem njezina udjela sustavno su rasle vrijednosti viskoznosti, modula pohrane (G'), modula gubitka (G"), čvrstoće, konzistencije i kohezivnosti hidrogelova, što ukazuje na postupno formiranje gušće i mehanički otpornije polimerne mreže. Istodobno se vrijednost parametra tan δ smanjivala s povećanjem koncentracije ksantana, što potvrđuje izraženiji elastični karakter sustava i veći stupanj strukturiranosti hidrogelne mreže. Posebno je važno istaknuti da je već pri koncentracijama od 1,0 % (m/m) i višim ksantanska guma omogućila formiranje hidrogelova sa stabilnim viskoelastičnim svojstvima, dok je pri koncentraciji od 0,5 % (m/m) dobiven sustav pokazivao granično ponašanje između viskoelastične tekućine i gela.

Uklapanje NLC-a u hidrogelni matriks rezultiralo je dodatnim povećanjem viskoznosti te poboljšanjem viskoelastičnih i teksturnih svojstava formulacija, što se očitovalo porastom vrijednosti modula pohrane, modula gubitka, čvrstoće, konzistencije i kohezivnosti. Dobiveni rezultati upućuju na aktivnu ulogu NLC-a u organizaciji i stabilizaciji hidrogelne mreže, pri čemu lipidne nanočestice ne djeluju samo kao funkcionalni nosači bioaktivnih sastavnica, već i kao strukturne komponente koje pridonose mehaničkoj otpornosti sustava. Unatoč povećanju mehaničke čvrstoće i strukturiranosti sustava, razvijeni hidrogelovi s uklopljenim NLC zadržali su izraženo pseudoplastično i tiksotropno ponašanje te zadovoljavajuću razmazivost. Takva kombinacija svojstava omogućuje jednostavno nanošenje formulacije tijekom primjene, ravnomjernu raspodjelu na površini kože i brzo obnavljanje strukture nakon prestanka smičnog opterećenja, što pogoduje zadržavanju pripravka na mjestu primjene. Dodatno, sve formulacije pokazale su pH vrijednosti unutar fiziološki prihvatljivog raspona za dermalnu primjenu, a hidrogelovi s uklopljenim NLC-om imali su pH bliži vrijednostima tipičnim za površinu kože.

Ispitivanja na HaCaT stanicama pokazala su dobru biokompatibilnost pojedinačnih sastavnica formulacije, kontrolnih hidrogelova, NLC disperzije i hidrogela s uklopljenim NLC-om. Većina ispitivanih uzoraka održavala je visoku vijabilnost stanica, dok je samo pri najvišim ispitivanim koncentracijama NLC sustava zabilježeno umjereno smanjenje stanične vijabilnosti. Posebno je važno istaknuti da su NLC-i uklopljeni u hidrogel pokazali višu biokompatibilnost od

odgovarajuće NLC disperzije, što upućuje na dodatnu zaštitnu i stabilizacijsku ulogu hidrogelnog matriksa. Dobiveni rezultati potvrđuju da razvijeni nanokompozitni sustav uspješno objedinjuje funkcionalnost lipidnih nanočestica s povoljnim sigurnosnim profilom nosača, što je preduvjet za njegovu primjenu na osjetljivoj i oštećenoj koži. Pri tome je potrebno uzeti u obzir da korišteni 2D model HaCaT keratinocita ne oponaša u potpunosti složenu organizaciju i zaštitnu funkciju ljudskog epidermisa. Budući da su u takvom modelu stanice izravno izložene ispitivanim formulacijama, ne može se isključiti mogućnost da 2D kultura keratinocita u određenoj mjeri precjenjuje citotoksični potencijal razvijenih NLC sustava. Stoga bi, radi sveobuhvatnije procjene sigurnosti, podnošljivosti i iritacijskog potencijala formulacija namijenjenih obnovi epidermalne barijere, dobivene rezultate bilo poželjno potvrditi na složenijim modelima rekonstruiranog humanog epidermisa, koji vjernije oponašaju morfološka i funkcionalna svojstva ljudske kože.

Razvijeni hidrogelovi s uklopljenim NLC-om pokazali su izražen *in vitro* okluzivni učinak te su tijekom duljeg vremena ispitivanja ostvarivali značajno više vrijednosti faktora okluzivnosti u odnosu na odgovarajuće kontrolne hidrogelove. Dobiveni rezultati potvrđuju da uklopljeni NLC-i učinkovito doprinose smanjenju gubitka vode iz formulacije, odnosno stvaranju zaštitnog lipidnog sloja koji može ograničiti transepidermalni gubitak vode nakon primjene na kožu. Nadalje, u *ex vivo* modelu svinjskog uha s eksperimentalno narušenom epidermalnom barijerom hidrogel s uklopljenim NLC-om ostvario je statistički značajno veći porast hidratacije kože u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim hidrogelom. Ovakvi rezultati potvrđuju funkcionalnost razvijenog nanokompozitnog sustava te upućuju na sinergijski doprinos hidrogelnog nosača i funkcionalnih lipidnih nanočestica održavanju hidratacijskog statusa kože. Istodobna prisutnost okluzivnog učinka i povećane hidratacije kože ukazuje na potencijal razvijenih NLC hidrogelova za potporu obnovu narušene epidermalne barijere i primjenu u formulacijama namijenjenima njezi suhe, osjetljive i oštećene kože.

Sveukupno, rezultati istraživanja potvrđuju da razvijena nanokompozitna hidrogelna formulacija s funkcionalnim NLC-om posjeduje odgovarajuća fizikalno-kemijska, reološka, teksturna, mikrobiološka i biofarmaceutska svojstva za dermalnu primjenu te pokazuje značajan potencijal za primjenu u pripravcima namijenjenima njezi i obnovi kože s narušenom funkcijom epidermalne barijere. Iako dobiveni rezultati upućuju na povoljan učinak formulacije na obnovu funkcije epidermalne barijere, molekularni mehanizmi povezani s integracijom formulacijskih

lipida u lipidni matriks rožnatog sloja nisu izravno potvrđeni. Stoga bi buduća istraživanja trebala biti usmjerena na detaljnije razjašnjavanje navedenih mehanizama djelovanja te potvrdu kliničke učinkovitosti i terapijske vrijednosti formulacije u ljudi.

6. LITERATURA

1. Proksch E, Brandner JM, Jensen J. The Skin: an Indispensable Barrier. Exp Dermatol. 2008 Dec 11;17(12):1063–72. doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x

2. Rosso J Del, Zeichner J, Alexis A, Cohen D, Berson D. Understanding the Epidermal Barrier in Healthy and Compromised Skin: Clinically Relevant Information for the Dermatology Practitioner: Proceedings of an Expert Panel Roundtable Meeting. J Clin Aesthet Dermatol. 2016 Apr;9(4 Suppl 1):S2–8. PubMed PMID: 28936279.

3. Zhang C, Merana GR, Harris-Tryon T, Scharschmidt TC. Skin Immunity: Dissecting the Complex Biology of Our Body's Outer Barrier. Mucosal Immunol. 2022 Apr;15(4):551–61. doi:10.1038/s41385-022-00505-y

4. Oh J, Voigt AY. The Human Skin Microbiome: From Metagenomes to Therapeutics. Nat Rev Microbiol. 2025 Dec 4;23(12):771–87. doi:10.1038/s41579-025-01211-9

5. Ahmed IA, Mikail MA. Diet and Skin Health: The Good and the Bad. Nutrition. 2024 Mar;119:112350. doi:10.1016/j.nut.2023.112350

6. Abdo JM, Sopko NA, Milner SM. The Applied Anatomy of Human Skin: A Model for Regeneration. Wound Medicine. 2020 Mar;28:100179. doi:10.1016/j.wndm.2020.100179

7. Bouwstra JA, Nădăban A, Bras W, McCabe C, Bunge A, Gooris GS. The Skin Barrier: An Extraordinary Interface With an Exceptional Lipid Organization. Prog Lipid Res. 2023 Nov;92:101252. doi:10.1016/j.plipres.2023.101252

8. Stefanovic N, Irvine AD. Filaggrin and Beyond. Annals of Allergy, Asthma & Immunology. 2024 Feb;132(2):187–95. doi:10.1016/j.anai.2023.09.009

9. Schild J, Kalvodová A, Zbytovská J, Farwick M, Pyko C. The Role of Ceramides in Skin Barrier Function and the Importance of Their Correct Formulation for Skincare Applications. Int J Cosmet Sci. 2024 Aug 7;46(4):526–43. doi:10.1111/ics.12972

10. Baker P, Huang C, Radi R, Moll SB, Jules E, Arbiser JL. Skin Barrier Function: The Interplay of Physical, Chemical, and Immunologic Properties. Cells. 2023 Nov 30;12(23):2745. doi:10.3390/cells12232745

11. Knox S, O'Boyle NM. Skin Lipids in Health and Disease: A Review. Chem Phys Lipids. 2021 May;236:105055. doi:10.1016/j.chemphyslip.2021.105055

12. Uchida Y, Park K. Ceramides in Skin Health and Disease: An Update. Am J Clin Dermatol. 2021 Nov 20;22(6):853–66. doi:10.1007/s40257-021-00619-2

13. Elias PM. Optimizing Emollient Therapy for Skin Barrier Repair in Atopic Dermatitis. Annals of Allergy, Asthma & Immunology. 2022 May;128(5):505–11. doi:10.1016/j.anai.2022.01.012

14. Kahraman E, Kaykın M, Şahin Bektay H, Güngör S. Recent Advances on Topical Application of Ceramides to Restore Barrier Function of Skin. Cosmetics. 2019 Aug 20;6(3):52. doi:10.3390/cosmetics6030052

15. Feeney OM, Crum MF, McEvoy CL, Trevaskis NL, Williams HD, Pouton CW, et al. 50 Years of Oral Lipid-Based Formulations: Provenance, Progress and Future Perspectives. Adv Drug Deliv Rev. 2016 Jun;101:167–94. doi:10.1016/j.addr.2016.04.007

16. Hua S. Physiological and Pharmaceutical Considerations for Rectal Drug Formulations. Front Pharmacol. 2019 Oct 16;10. doi:10.3389/fphar.2019.01196

17. Porter CJH, Trevaskis NL, Charman WN. Lipids and Lipid-Based Formulations: Optimizing the Oral Delivery of Lipophilic Drugs. Nat Rev Drug Discov. 2007 Mar;6(3):231–48. doi:10.1038/nrd2197

18. Driscoll DF. Lipid Injectable Emulsions: Pharmacopeial and Safety Issues. Pharm Res. 2006 Sep 9;23(9):1959–69. doi:10.1007/s11095-006-9092-4

19. Scioli Montoto S, Muraca G, Ruiz ME. Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Pharmacological and Biopharmaceutical Aspects. Front Mol Biosci. 2020 Oct 30;7. doi:10.3389/fmolb.2020.587997

20. Mehta M, Bui TA, Yang X, Aksoy Y, Goldys EM, Deng W. Lipid-Based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery: An Overview of the Production Techniques and Difficulties Encountered in Their Industrial Development. ACS Materials Au. 2023 Nov 8;3(6):600–19. doi:10.1021/acsmaterialsau.3c00032

21. Tenchov R, Bird R, Curtze AE, Zhou Q. Lipid Nanoparticles–From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. ACS Nano. 2021 Nov 23;15(11):16982–7015. doi:10.1021/acsnano.1c04996

22. Viegas C, Patrício AB, Prata JM, Nadhman A, Chintamaneni PK, Fonte P. Solid Lipid Nanoparticles vs. Nanostructured Lipid Carriers: A Comparative Review. Pharmaceutics. 2023 May 25;15(6):1593. doi:10.3390/pharmaceutics15061593

23. Puri A, Loomis K, Smith B, Lee JH, Yavlovich A, Heldman E, et al. Lipid-Based Nanoparticles as Pharmaceutical Drug Carriers: From Concepts to Clinic. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 2009;26(6):523–80. doi:10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v26.i6.10

24. Shah RM, Mata JP, Bryant G, de Campo L, Ife A, Karpe A V., et al. Structure Analysis of Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: A Combined USANS/SANS Study. Particle & Particle Systems Characterization. 2019 Jan 22;36(1). doi:10.1002/ppsc.201800359

25. Gaba B, Fazil M, Ali A, Baboota S, Sahni JK, Ali J. Nanostructured Lipid (NLCs) Carriers as a Bioavailability Enhancement Tool for Oral Administration. Drug Deliv. 2015 Aug 18;22(6):691–700. doi:10.3109/10717544.2014.898110

26. Lancelot A, Sierra T, Serrano JL. Nanostructured Liquid-Crystalline Particles for Drug Delivery. Expert Opin Drug Deliv. 2014 Apr 3;11(4):547–64. doi:10.1517/17425247.2014.884556

27. Haider M, Abdin SM, Kamal L, Orive G. Nanostructured Lipid Carriers for Delivery of Chemotherapeutics: A Review. Pharmaceutics. 2020 Mar 1;12(3):288. doi:10.3390/PHARMACEUTICS12030288 PubMed PMID: 32210127.

28. Subramaniam B, Siddik ZH, Nagoor NH. Optimization of Nanostructured Lipid Carriers: Understanding the Types, Designs, and Parameters in the Process of Formulations. Journal of Nanoparticle Research. 2020 Jun 28;22(6):141. doi:10.1007/s11051-020-04848-0

29. Javed S, Mangla B, Almoshari Y, Sultan MH, Ahsan W. Nanostructured Lipid Carrier System: A Compendium of Their Formulation Development Approaches, Optimization Strategies by Quality by Design, and Recent Applications in Drug Delivery. Nanotechnol Rev. 2022 Apr 22;11(1):1744–77. doi:10.1515/ntrev-2022-0109

30. Gordillo-Galeano A, Mora-Huertas CE. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: A Review Emphasizing on Particle Structure and Drug Release. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2018 Dec;133:285–308. doi:10.1016/j.ejpb.2018.10.017

31. Martins S, Tho I, Souto E, Ferreira D, Brandl M. Multivariate design for the evaluation of lipid and surfactant composition effect for optimisation of lipid nanoparticles. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2012 Apr;45(5):613–23. doi:10.1016/j.ejps.2011.12.015

32. Souto EB, Fangueiro JF, Fernandes AR, Cano A, Sanchez-Lopez E, Garcia ML, et al. Physicochemical and Biopharmaceutical Aspects Influencing Skin Permeation and Role of SLN and NLC for Skin Drug Delivery. Heliyon. 2022 Feb;8(2):e08938. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e08938

33. Lémery E, Briançon S, Chevalier Y, Bordes C, Oddos T, Gohier A, et al. Skin Toxicity of Surfactants: Structure/Toxicity Relationships. Colloids Surf A Physicochem Eng Asp. 2015 Mar;469:166–79. doi:10.1016/j.colsurfa.2015.01.019

34. Sainaga Jyothi VGS, Ghouse SM, Khatri DK, Nanduri S, Singh SB, Madan J. Lipid Nanoparticles in Topical Dermal Drug Delivery: Does Chemistry of Lipid Persuade Skin Penetration? J Drug Deliv Sci Technol. 2022 Mar;69:103176. doi:10.1016/j.jddst.2022.103176

35. Güngör S, Kahraman E. Nanocarriers Mediated Cutaneous Drug Delivery. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2021 Mar;158:105638. doi:10.1016/j.ejps.2020.105638

36. Assali M, Zaid AN. Features, Applications, and Sustainability of Lipid Nanoparticles in Cosmeceuticals. Saudi Pharmaceutical Journal. 2022 Jan;30(1):53–65. doi:10.1016/j.jsps.2021.12.018

37. Ijaz M, Madni A, Khan HMS, Arshad T, Meer S, Ijaz F, et al. Nanostructured Lipid Carrier Based Gel Containing α-Tocopherol and α-Tocopheryl Acetate for Synergistic Cutaneous Antiaging Efficacy. Sci Rep. 2025 Nov 27;15(1):42360. doi:10.1038/s41598-025-26277-6

38. Souza IDL, Saez V, Mansur CRE. Lipid Nanoparticles Containing Coenzyme Q10 for Topical Applications: An Overview of Their Characterization. Colloids Surf B Biointerfaces. 2023 Oct;230:113491. doi:10.1016/j.colsurfb.2023.113491

39. Saez V, Souza IDL, Mansur CRE. Lipid Nanoparticles (SLN & NLC) for Delivery of vitamin E: A Comprehensive Review. Int J Cosmet Sci. 2018 Apr 14;40(2):103–16. doi:10.1111/ics.12452

40. Souto EB, Baldim I, Oliveira WP, Rao R, Yadav N, Gama FM, et al. SLN and NLC for Topical, Dermal, and Transdermal Drug Delivery. Expert Opin Drug Deliv. 2020 Mar 3;17(3):357–77. doi:10.1080/17425247.2020.1727883, PubMed PMID: 32064958.

41. Nguyen VH, Thuy VN, Van TV, Dao AH, Lee BJ. Nanostructured Lipid Carriers and Their Potential Applications for Versatile Drug Delivery via Oral Administration. OpenNano. 2022 Nov;8:100064. doi:10.1016/j.onano.2022.100064

42. Biscaia-Caleiras M, Fonseca NA, Lourenço AS, Moreira JN, Simões S. Rational Formulation and Industrial Manufacturing of Lipid-Based Complex Injectables: Landmarks and Trends. Journal of Controlled Release. 2024 Sep;373:617–39. doi:10.1016/j.jconrel.2024.07.021

43. Das B, Nayak AK, Mallick S. Lipid-Based Nanocarriers for Ocular Drug Delivery: An Updated Review. J Drug Deliv Sci Technol. 2022 Oct;76:103780. doi:10.1016/j.jddst.2022.103780

44. Manisha Dev, Pallavi Chandel. Nanostructured Lipid Carriers in Pulmonary Drug Delivery: Progress and Prospects. Current Pharmaceutical Research. 2025 Apr 30;131–43. doi:10.63785/cpr.2025.1.1.131143

45. Dhiman N, Awasthi R, Sharma B, Kharkwal H, Kulkarni GT. Lipid Nanoparticles as Carriers for Bioactive Delivery. Front Chem. 2021 Apr 23;9. doi:10.3389/fchem.2021.580118

46. Montenegro L, Lai F, Offerta A, Sarpietro MG, Micicchè L, Maccioni AM, et al. From Nanoemulsions to Nanostructured Lipid Carriers: A Relevant Development in Dermal Delivery of Drugs and Cosmetics. J Drug Deliv Sci Technol. 2016 Apr;32:100–12. doi:10.1016/j.jddst.2015.10.003

47. Chauhan I, Yasir M, Verma M, Singh AP. Nanostructured Lipid Carriers: A Groundbreaking Approach for Transdermal Drug Delivery. Adv Pharm Bull. 2020 Feb 18;10(2):150–65. doi:10.34172/apb.2020.021

48. Gordillo-Galeano A, Mora-Huertas CE. Hydrodynamic Diameter and Zeta Potential of Nanostructured Lipid Carriers: Emphasizing Some Parameters for Correct Measurements. Colloids Surf A Physicochem Eng Asp. 2021 Jul;620:126610. doi:10.1016/j.colsurfa.2021.126610

49. Bunjes H, Unruh T. Characterization of Lipid Nanoparticles by Differential Scanning Calorimetry, X-ray and Neutron Scattering☆. Adv Drug Deliv Rev. 2007 Jul 10;59(6):379–402. doi:10.1016/j.addr.2007.04.013

50. Czajkowska-Kośnik A, Szekalska M, Winnicka K. Nanostructured Lipid Carriers: A Potential Use for Skin Drug Delivery Systems. Pharmacological Reports. 2019 Feb;71(1):156–66. doi:10.1016/j.pharep.2018.10.008

51. Mahant S, Rao R, Nanda S. Nanostructured lipid carriers. In: Design of Nanostructures for Versatile Therapeutic Applications. Elsevier; 2018. p. 97–136. doi:10.1016/B978-0-12-813667-6.00003-6

52. Jug M, Hafner A, Lovrić J, Kregar ML, Pepić I, Vanić Ž, et al. An Overview of in vitro Dissolution/Release Methods for Novel Mucosal Drug Delivery Systems. J Pharm Biomed Anal. 2018 Jan;147:350–66. doi:10.1016/j.jpba.2017.06.072

53. Lane ME. In vitro Permeation Testing for the Evaluation of Drug Delivery to the Skin. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2024 Oct;201:106873. doi:10.1016/j.ejps.2024.106873

54. Haq A, Goodyear B, Ameen D, Joshi V, Michniak-Kohn B. Strat-M® Synthetic Membrane: Permeability Comparison to Human Cadaver Skin. Int J Pharm. 2018 Aug;547(1–2):432–7. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.06.012

55. Bajsert J, De Glas V, Faway E, Lambert de Rouvroit C, Pérez-Aso M, Cook PW, et al. Characterization of Reconstructed Human Epidermis in a Chemically-Defined, Animal Origin-Free Cell Culture. JID Innov. 2024 Sep;4(5):100298. doi:10.1016/j.xjidi.2024.100298

56. Bouwer F, Brits M, Viljoen JM. Cracking the Skin Barrier: Models and Methods Driving Dermal Drug Delivery. Pharmaceutics. 2025 Dec 9;17(12):1586. doi:10.3390/pharmaceutics17121586

57. Eiras F, Amaral MH, Silva R, Martins E, Lobo JMS, Silva AC. Characterization and Biocompatibility Evaluation of Cutaneous Formulations Containing Lipid Nanoparticles. Int J Pharm. 2017 Mar 15;519(1–2):373–80. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.01.045 PubMed PMID: 28131849.

58. Doktorovová S, Kovačević AB, Garcia ML, Souto EB. Preclinical Safety of Solid lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Current Evidence from in vitro and in vivo Evaluation. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2016 Nov;108:235–52. doi:10.1016/j.ejpb.2016.08.001

59. Costa Gagosian VS, Coronel R, Buss BC, dos Santos MLF, Liste I, Anta B, et al. In Vitro Skin Models as Non-Animal Methods for Dermal Drug Development and Safety Assessment. Pharmaceutics. 2025 Oct 17;17(10):1342. doi:10.3390/pharmaceutics17101342

60. Bagińska ZH, Szymańska E. Barrier Products for Topical Delivery—Insight into Efficacy Testing and Barrier-Boosting Compounds. Pharmaceutics. 2025 Oct 22;17(11):1361. doi:10.3390/pharmaceutics17111361

61. Klotz T, Ibrahim A, Maddern G, Caplash Y, Wagstaff M. Devices Measuring Transepidermal Water Loss: A Systematic Review of Measurement Properties. Skin Research and Technology. 2022 Jul 12;28(4):497–539. doi:10.1111/srt.13159

62. Plessis J du, Stefaniak A, Eloff F, John S, Agner T, Chou T, et al. International Guidelines for the in vivo Assessment of Skin Properties in Non-Clinical Settings: Part 2. Transepidermal Water Loss and Skin Hydration. Skin Research and Technology. 2013 Aug 19;19(3):265–78. doi:10.1111/srt.12037

63. Berardesca E, Loden M, Serup J, Masson P, Rodrigues LM. The revised EEMCO Guidance for the in vivo Measurement of Water in the Skin. Skin Research and Technology. 2018 Aug 20;24(3):351–8. doi:10.1111/srt.12599

64. Gidado IM, Qassem M, Triantis IF, Kyriacou PA. Review of Advances in the Measurement of Skin Hydration Based on Sensing of Optical and Electrical Tissue Properties. Sensors. 2022 Sep 21;22(19):7151. doi:10.3390/s22197151

65. Keck CM, Abdelkader A, Pelikh O, Wiemann S, Kaushik V, Specht D, et al. Assessing the Dermal Penetration Efficacy of Chemical Compounds with the Ex-Vivo Porcine Ear Model. Pharmaceutics. 2022 Mar 19;14(3):678. doi:10.3390/pharmaceutics14030678

66. Rajkumar J, Chandan N, Lio P, Shi V. The Skin Barrier and Moisturization: Function, Disruption, and Mechanisms of Repair. Skin Pharmacol Physiol. 2023;36(4):174–85. doi:10.1159/000534136

67. Fluhr JW, Moore DJ, Lane ME, Lachmann N, Rawlings A V. Epidermal Barrier Function in Dry, Flaky and Sensitive Skin: A Narrative Review. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. 2024 May 22;38(5):812–20. doi:10.1111/jdv.19745

68. Moore DJ, Rawlings A V. The Chemistry, Function and (Patho)Physiology of Stratum Corneum Barrier Ceramides. Int J Cosmet Sci. 2017 Aug 18;39(4):366–72. doi:10.1111/ics.12399

69. Çetinarslan T, Kümper L, Fölster-Holst R. The Immunological and Structural Epidermal Barrier Dysfunction and Skin Microbiome in Atopic Dermatitis-an Update. Front Mol Biosci. 2023 Aug 16;10. doi:10.3389/fmolb.2023.1159404

70. Chen X. Skin Barrier Repair and Nursing Care in Patients with Atopic Dermatitis: A Narrative Review. Int J Gen Med. 2025 Nov;Volume 18:6803–19. doi:10.2147/IJGM.S542311

71. Nugroho WT, Sawitri S, Astindari A, Utomo B, Listiawan MY, Ervianti E, et al. The Efficacy of Moisturisers Containing Ceramide Compared with Other Moisturisers in the Management of Atopic Dermatitis. Indian J Dermatol. 2023 Jan;68(1):53–8. doi:10.4103/ijd.ijd_991_22

72. Joukhadar R, Nižić Nodilo L, Lovrić J, Hafner A, Pepić I, Jug M. Functional Nanostructured Lipid Carrier-Enriched Hydrogels Tailored to Repair Damaged Epidermal Barrier. Gels. 2024 Jul 16;10(7):466. doi:10.3390/gels10070466

73. Gomaa E, Fathi HA, Eissa NG, Elsabahy M. Methods for Preparation of Nanostructured Lipid Carriers. Methods. 2022 Mar;199:3–8. doi:10.1016/j.ymeth.2021.05.003

74. Gonçalves C, Ramalho MJ, Silva R, Silva V, Marques-Oliveira R, Silva AC, et al. Lipid Nanoparticles Containing Mixtures of Antioxidants to Improve Skin Care and Cancer Prevention. Pharmaceutics. 2021 Nov 30;13(12):2042. doi:10.3390/pharmaceutics13122042

75. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. 5.1.3. Efficacy of Antimicrobial Preservation. In: European Pharmacopeia. 10th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2019.

76. Gilbert L, Picard C, Savary G, Grisel M. Rheological and Textural Characterization of Cosmetic Emulsions Containing Natural and Synthetic Polymers: Relationships Between Both Data. Colloids Surf A Physicochem Eng Asp. 2013 Mar;421:150–63. doi:10.1016/j.colsurfa.2013.01.003

77. Tafuro G, Costantini A, Baratto G, Busata L, Semenzato A. Rheological and Textural Characterization of Acrylic Polymer Water Dispersions for Cosmetic Use. Ind Eng Chem Res. 2019 Dec 26;58(51):23549–58. doi:10.1021/acs.iecr.9b05319

78. Malkin AYa, Derkach SR, Kulichikhin VG. Rheology of Gels and Yielding Liquids. Gels. 2023 Sep 3;9(9):715. doi:10.3390/gels9090715

79. Mahant S, Rao R, Souto EB, Nanda S. Analytical Tools and Evaluation Strategies for Nanostructured Lipid Carrier-Based Topical Delivery Systems. Expert Opin Drug Deliv. 2020 Jul 2;17(7):963–92. doi:10.1080/17425247.2020.1772750

80. Hurler J, Engesland A, Poorahmary Kermany B, Škalko-Basnet N. Improved Texture Analysis for Hydrogel Characterization: Gel Cohesiveness, Adhesiveness, and Hardness. J Appl Polym Sci. 2012 Jul 5;125(1):180–8. doi:10.1002/app.35414

81. Tomić I, Miočić S, Pepić I, Šimić D, Filipović-Grčić J. Efficacy and Safety of Azelaic Acid Nanocrystal-Loaded In Situ Hydrogel in the Treatment of Acne Vulgaris. Pharmaceutics. 2021 Apr 16;13(4):567. doi:10.3390/pharmaceutics13040567

82. Vaz S, Silva R, Amaral MH, Martins E, Sousa Lobo JM, Silva AC. Evaluation of the Biocompatibility and Skin Hydration Potential of Vitamin E-Loaded Lipid Nanosystems Formulations: In vitro and Human in vivo Studies. Colloids Surf B Biointerfaces. 2019 Jul;179:242–9. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.03.036

83. Na YG, Huh HW, Kim MK, Byeon JJ, Han MG, Lee HK, et al. Development and Evaluation of a Film-Forming System Hybridized with Econazole-Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Enhanced Antifungal Activity Against Dermatophytes. Acta Biomater. 2020 Jan;101:507–18. doi:10.1016/j.actbio.2019.10.024

84. Čuříková-Kindlová BA, Vovesná A, Nováčková A, Zbytovská J. In vitro Modeling of Skin Barrier Disruption and its Recovery by Ceramide-Based Formulations. AAPS PharmSciTech. 2021 Dec 14;23(1):21. doi:10.1208/s12249-021-02154-z

85. Wirtu YD. A Review of Environmental and Health Effects of Synthetic Cosmetics. Front Environ Sci. 2024 Oct 22;12. doi:10.3389/fenvs.2024.1402893

86. Tichota D, Silva AC, Amaral MH, Sousa Lobo JM. Design, Characterization, and Clinical Evaluation of Argan Oil Nanostructured Lipid Carriers to Improve Skin Hydration. Int J Nanomedicine. 2014 Aug;3855. doi:10.2147/IJN.S64008

87. Serrafi A, Chegdani F, Bennis F, Kepinska M. The Importance of Argan Oil in Medicine and Cosmetology. Nutrients. 2024 Oct 21;16(20):3573. doi:10.3390/nu16203573

88. Goik U, Goik T, Załęska I. The Properties and Application of Argan Oil in Cosmetology. European Journal of Lipid Science and Technology. 2019 Apr 25;121(4). doi:10.1002/ejlt.201800313

89. Elmowafy M, Shalaby K, Badran MM, Ali HM, Abdel-Bakky MS, Ibrahim HM. Multifunctional Carbamazepine Loaded Nanostructured Lipid Carrier (NLC) Formulation. Int J Pharm. 2018 Oct;550(1–2):359–71. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.08.062

90. Huanbutta K, Chuttong B, Danmek K, Sriamornsak P, Suwanpitak K, Sangnim T. Beeswax in Pharmaceutical Sciences: A Comprehensive Review of its Chemical Composition, Functional Applications, Types, and Formulation Roles. Int J Mol Sci. 2026 Apr 13;27(8):3486. doi:10.3390/ijms27083486

91. Nong Y, Maloh J, Natarelli N, Gunt HB, Tristani E, Sivamani RK. A Review of the Use of Beeswax in Skincare. J Cosmet Dermatol. 2023 Aug 31;22(8):2166–73. doi:10.1111/jocd.15718

92. Johnson W, Bergfeld WF, Belsito D V., Hill RA, Klaassen CD, Liebler D, et al. Safety Assessment of 1,2-Glycols as Used in Cosmetics. Int J Toxicol. 2012 Sep 11;31(5_suppl):147S-168S. doi:10.1177/1091581812460409

93. Steiner A, Kugarajan K, Wullimann M, Ruty B, Kunze G. Margin of Safety of Pentylene Glycol Derived Using Measurements of Cutaneous Absorption and Volatility. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2017 Jul;87:106–11. doi:10.1016/j.yrtph.2017.05.007

94. Azevedo Martins TE, Sales de Oliveira Pinto CA, Costa de Oliveira A, Robles Velasco MV, Gorriti Guitiérrez AR, Cosquillo Rafael MF, et al. Contribution of Topical Antioxidants to Maintain Healthy Skin—A Review. Sci Pharm. 2020 Jun 3;88(2):27. doi:10.3390/scipharm88020027

95. Baek J, Lee MG. Oxidative Stress and Antioxidant Strategies in Dermatology. Redox Report. 2016 Jul 3;21(4):164–9. doi:10.1179/1351000215Y.0000000015

96. Aparecida Sales de Oliveira Pinto C, Elyan Azevedo Martins T, Miliani Martinez R, Batello Freire T, Valéria Robles Velasco M, Rolim Baby A. Vitamin E in Human Skin: Functionality and Topical Products. In. 2021. doi:10.5772/intechopen.98336

97. Moran-Valero MI, Ruiz-Henestrosa VMP, Pilosof AMR. Synergistic Performance of Lecithin and Glycerol Monostearate in Oil/Water Emulsions. Colloids Surf B Biointerfaces. 2017 Mar;151:68–75. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.12.015

98. Severino P, Pinho SC, Souto EB, Santana MHA. Polymorphism, Crystallinity and Hydrophilic–Lipophilic Balance of Stearic Acid and Stearic Acid–Capric/Caprylic Triglyceride Matrices for Production of Stable Nanoparticles. Colloids Surf B Biointerfaces. 2011 Aug;86(1):125–30. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.03.029

99. Bodratti A, Alexandridis P. Formulation of Poloxamers for Drug Delivery. J Funct Biomater. 2018 Jan 18;9(1):11. doi:10.3390/jfb9010011

100. Taylor JM, Scale K, Arrowsmith S, Sharp A, Flynn S, Rannard S, et al. Using Pyrene to Probe the Effects of Poloxamer Stabilisers on Internal Lipid Microenvironments in Solid Lipid Nanoparticles. Nanoscale Adv. 2020;2(12):5572–7. doi:10.1039/D0NA00582G

101. Basso J, Mendes M, Cova T, Sousa J, Pais A, Fortuna A, et al. A Stepwise Framework for the Systematic Development of Lipid Nanoparticles. Biomolecules. 2022 Jan 27;12(2):223. doi:10.3390/biom12020223

102. da Silva JD, Silva FAM, Rodrigues CF. Microbial Contamination in Cosmetic Products. Cosmetics. 2025 Sep 10;12(5):198. doi:10.3390/cosmetics12050198

103. Nadarzynski A, Scholz J, Schröder MS. Skin Barrier Enhancing Alternative Preservation Strategy of O/W Emulsions by Water Activity Reduction with Natural Multifunctional Ingredients. Cosmetics. 2022 Jun 12;9(3):53. doi:10.3390/cosmetics9030053

104. Yoon B, Jackman J, Valle-González E, Cho NJ. Antibacterial Free Fatty Acids and Monoglycerides: Biological Activities, Experimental Testing, and Therapeutic Applications. Int J Mol Sci. 2018 Apr 8;19(4):1114. doi:10.3390/ijms19041114

105. He J, Huang S, Sun X, Han L, Chang C, Zhang W, et al. Carvacrol Loaded Solid Lipid Nanoparticles of Propylene Glycol Monopalmitate and Glyceryl Monostearate: Preparation, Characterization, and Synergistic Antimicrobial Activity. Nanomaterials. 2019 Aug 14;9(8):1162. doi:10.3390/nano9081162

106. Sagrafena I, Morin M, Paraskevopoulos G, Nilsson EJ, Hrdinová I, Kováčik A, et al. Structure and Function of Skin Barrier Lipids: Effects of Hydration and Natural Moisturizers in vitro. Biophys J. 2024 Nov;123(22):3951–63. doi:10.1016/j.bpj.2024.10.006

107. Gunia-Krzyżak A. Aquaporins in the Skin: Molecular Regulators of Hydration and Potential Targets for Cosmetic Applications. Cosmetics. 2025 Nov 17;12(6):263. doi:10.3390/cosmetics12060263

108. Fluhr JW, Muguet V, Christen-Zaech S. Restoring Skin Hydration and Barrier Function: Mechanistic Insights Into Basic Emollients for Xerosis Cutis. Int J Dermatol. 2025 Jun 15;64(S1):5–12. doi:10.1111/ijd.17790

109. Becker LC, Bergfeld WF, Belsito D V., Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, et al. Safety Assessment of Glycerin as Used in Cosmetics. Int J Toxicol. 2019 Nov 16;38(3_suppl):6S-22S. doi:10.1177/1091581819883820

110. Alliod O, Messager L, Fessi H, Dupin D, Charcosset C. Influence of Viscosity for Oil-In-Water and Water-In-Oil Nanoemulsions Production by SPG Premix Membrane Emulsification. Chemical Engineering Research and Design. 2019 Feb;142:87–99. doi:10.1016/j.cherd.2018.11.027

111. Schroën K, de Ruiter J, Berton-Carabin C. The Importance of Interfacial Tension in Emulsification: Connecting Scaling Relations Used in Large Scale Preparation with Microfluidic Measurement Methods. ChemEngineering. 2020 Dec 7;4(4):63. doi:10.3390/chemengineering4040063

112. Gaillard Y, Mija A, Burr A, Darque-Ceretti E, Felder E, Sbirrazzuoli N. Green Material Composites from Renewable Resources: Polymorphic Transitions and Phase Diagram of Beeswax/Rosin Resin. Thermochim Acta. 2011 Jul;521(1–2):90–7. doi:10.1016/j.tca.2011.04.010

113. Kameda T, Tamada Y. Variable-Temperature 13C Solid-State NMR Study of the Molecular Structure of Honeybee Wax and Silk. Int J Biol Macromol. 2009 Jan;44(1):64–9. doi:10.1016/j.ijbiomac.2008.10.004

114. Epand RM, Bach D, Epand RF, Borochov N, Wachtel E. A New High-Temperature Transition of Crystalline Cholesterol in Mixtures with Phosphatidylserine. Biophys J. 2001 Sep;81(3):1511–20. doi:10.1016/S0006-3495(01)75805-5

115. Jin Y, Wen, Garg S, Zhang, Teng LR, Liu, et al. Development of a Novel Niosomal System for Oral Delivery of Ginkgo Biloba Extract. Int J Nanomedicine. 2013 Jan;421. doi:10.2147/IJN.S37984

116. Deli G, Hatziantoniou S, Nikas Y, Demetzos C. Solid Lipid Nanoparticles and Nanoemulsions Containing Ceramides: Preparation and Physicochemical Characterization. J Liposome Res. 2009 Sep 16;19(3):180–8. doi:10.1080/08982100802702046

117. Takahashi H, Takada K, Obata Y, Shimizu N, Ishida K. Structure and Phase Behavior of Synthetic Ceramide 2 ((2 S ,3R)-2-Octadecanoylamino-octadecane-1,3-diol) and its Interaction with Limonene. Transactions of the Materials Research Society of Japan. 2015;40(1):73–6. doi:10.14723/tmrsj.40.73

118. Yajima T, Itai S, Takeuchi H, Kawashima Y. Determination of Optimum Processing Temperature for Transformation of Glyceryl Monostearate. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2002;50(11):1430–3. doi:10.1248/cpb.50.1430

119. Houacine C, Adams D, Singh KamalinderK. Impact of Liquid Lipid on Development and Stability of Trimyristin Nanostructured Lipid Carriers for Oral Delivery of Resveratrol. J Mol Liq. 2020 Oct;316:113734. doi:10.1016/j.molliq.2020.113734

120. Shu X, Liu J, Mao L, Yuan F, Gao Y. Composite Hydrogels Filled with Rhamnolipid-Based Nanoemulsion, Nanostructured Lipid Carrier, or Solid Lipid Nanoparticle: A Comparative Study on Gel Properties and the Delivery of Lutein. Food Hydrocoll. 2024 Jan;146:109264. doi:10.1016/j.foodhyd.2023.109264

121. Windbergs M, Strachan CJ, Kleinebudde P. Investigating the Principles of Recrystallization from Glyceride Melts. AAPS PharmSciTech. 2009 Dec 28;10(4):1224. doi:10.1208/s12249-009-9311-5

122. Pourtalebi Jahromi L, Rothammer M, Fuhrmann G. Polysaccharide Hydrogel Platforms as Suitable Carriers of Liposomes and Extracellular Vesicles for Dermal Applications. Adv Drug Deliv Rev. 2023 Sep;200:115028. doi:10.1016/j.addr.2023.115028

123. Desfrançois C, Auzély R, Texier I. Lipid Nanoparticles and Their Hydrogel Composites for Drug Delivery: A Review. Pharmaceuticals. 2018 Nov 1;11(4):118. doi:10.3390/ph11040118

124. Zagórska-Dziok M, Sobczak M. Hydrogel-Based Active Substance Release Systems for Cosmetology and Dermatology Application: A Review. Pharmaceutics. 2020 Apr 26;12(5):396. doi:10.3390/pharmaceutics12050396

125. Harrer D, Sanchez Armengol E, Friedl JD, Jalil A, Jelkmann M, Leichner C, et al. Is Hyaluronic Acid the Perfect Excipient for the Pharmaceutical Need? Int J Pharm. 2021 May;601:120589. doi:10.1016/j.ijpharm.2021.120589

126. Chylińska N, Maciejczyk M. Hyaluronic Acid and Skin: Its Role in Aging and Wound-Healing Processes. Gels. 2025 Apr 9;11(4):281. doi:10.3390/gels11040281

127. Bukhari SNA, Roswandi NL, Waqas M, Habib H, Hussain F, Khan S, et al. Hyaluronic Acid, a Promising Skin Rejuvenating Biomedicine: A Review of Recent Updates and Pre-Clinical and Clinical Investigations on Cosmetic and Nutricosmetic Effects. Int J Biol Macromol. 2018 Dec;120:1682–95. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.188

128. Caspersen MB, Roubroeks JP, Qun L, Shan H, Fogh J, RuiDong Z, et al. Thermal Degradation and Stability of Sodium Hyaluronate in Solid State. Carbohydr Polym. 2014 Jul;107:25–30. doi:10.1016/j.carbpol.2014.02.005

129. Becker LC, Bergfeld WF, Belsito D V., Klaassen CD, Marks JG, Shank RC, et al. Final Report of the Safety Assessment of Hyaluronic Acid, Potassium Hyaluronate, and Sodium Hyaluronate. Int J Toxicol. 2009 Jul 7;28(4_suppl):5–67. doi:10.1177/1091581809337738

130. Kulkarni VS, Shaw C. Use of Polymers and Thickeners in Semisolid and Liquid Formulations. In: Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages. Elsevier; 2016. p. 43–69. doi:10.1016/B978-0-12-801024-2.00005-4

131. Singhvi G, Hans N, Shiva N, Kumar Dubey S. Xanthan Gum in Drug Delivery Applications. In: Natural Polysaccharides in Drug Delivery and Biomedical Applications. Elsevier; 2019. p. 121–44. doi:10.1016/B978-0-12-817055-7.00005-4

132. Chiarentin L, Cardoso C, Miranda M, Vitorino C. Rheology of Complex Topical Formulations: An Analytical Quality by Design Approach to Method Optimization and Validation. Pharmaceutics. 2023 Jun 24;15(7):1810. doi:10.3390/pharmaceutics15071810

133. Herbig ME, Evers DH, Gorissen S, Köllmer M. Rational Design of Topical Semi-Solid Dosage Forms - How Far Are We? Pharmaceutics. 2023 Jun 26;15(7):1822. doi:10.3390/pharmaceutics15071822

134. Yılmaz Usta D, Teksin ZS, Tugcu-Demiroz F. Evaluation of Emulgel and Nanostructured Lipid Carrier-Based Gel Formulations for Transdermal Administration of Ibuprofen: Characterization, Mechanical Properties, and ex-vivo Skin Permeation. AAPS PharmSciTech. 2024 May 31;25(5):124. doi:10.1208/s12249-024-02831-9

135. Abrantes DC, Rogerio CB, de Oliveira JL, Campos EVR, de Araújo DR, Pampana LC, et al. Development of a Mosquito Repellent Formulation Based on Nanostructured Lipid Carriers. Front Pharmacol. 2021 Oct 11;12. doi:10.3389/fphar.2021.760682

136. Hameed H, Faheem S, Paiva-Santos AC, Sarwar HS, Jamshaid M. A Comprehensive Review of Hydrogel-Based Drug Delivery Systems: Classification, Properties, Recent Trends, and

Applications. AAPS PharmSciTech. 2024 Mar 21;25(4):64. doi:10.1208/s12249-024-02786-x

137. Meena P, Singh P, Warkar SG. Fabrication and Evaluation of Stimuli-Sensitive Xanthan Gum-Based Hydrogel as a Potential Carrier for a Hydrophobic Drug Ibuprofen. Colloid Polym Sci. 2024 Mar 29;302(3):377–91. doi:10.1007/s00396-023-05198-8

138. Amaral CNR, Oliveira PF, Pedroni LG, Mansur CRE. Viscoelastic Behavior of Hydrogel-Based Xanthan Gum/Aluminum Lactate with Potential Applicability for Conformance Control. J Appl Polym Sci. 2021 Jul 15;138(27). doi:10.1002/app.50640

139. Liu B, Zhu S, Zhong F, Yokoyama W, Huang D, Li Y. Modulating Storage Stability of Binary Gel by Adjusting the Ratios of Starch and Kappa-Carrageenan. Carbohydr Polym. 2021 Sep;268:118264. doi:10.1016/j.carbpol.2021.118264

140. Nižić Nodilo L, Perkušić M, Ugrina I, Špoljarić D, Jakobušić Brala C, Amidžić Klarić D, et al. In Situ Gelling Nanosuspension as an Advanced Platform for Fluticasone Propionate Nasal Delivery. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2022 Jun;175:27–42. doi:10.1016/j.ejpb.2022.04.009

141. AL-Smadi K, Ali M, Zhu J, Abdoh A, Phan K, Mohammed Y. Advances in Characterization of Transdermal and Topical Products using Texture Analyzer Systems. AAPS PharmSciTech. 2025 Jun 3;26(5):157. doi:10.1208/s12249-025-03148-x

142. Dejeu IL, Vicaș LG, Vlaia LL, Jurca T, Mureșan ME, Pallag A, et al. Study for Evaluation of Hydrogels after the Incorporation of Liposomes Embedded with Caffeic Acid. Pharmaceuticals. 2022 Jan 31;15(2):175. doi:10.3390/ph15020175

143. Franzol A, Banin TM, Brazil TR, Rezende MC. Textural Analyses and Artificial Neural Network as Optimization Tools to Predict the Sensory Perception of Cosmetic Emulsions. J Sens Stud. 2022 Oct 24;37(5). doi:10.1111/joss.12776

144. Marques AC, Rocha AI, Leal P, Estanqueiro M, Lobo JMS. Development and Characterization of Mucoadhesive Buccal Gels Containing Lipid Nanoparticles of Ibuprofen. Int J Pharm. 2017 Nov;533(2):455–62. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.04.025

145. Garg NK, Sharma G, Singh B, Nirbhavane P, Tyagi RK, Shukla R, et al. Quality by Design (QbD)-Enabled Development of Aceclofenac Loaded-Nano Structured Lipid Carriers (NLCs): An Improved Dermatokinetic Profile for Inflammatory Disorder(s). Int J Pharm. 2017 Jan;517(1–2):413–31. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.12.010

146. Chang RK, Raw A, Lionberger R, Yu L. Generic Development of Topical Dermatologic Products: Formulation Development, Process Development, and Testing of Topical Dermatologic Products. AAPS J. 2013 Jan 9;15(1):41–52. doi:10.1208/s12248-012-9411-0

147. Doktorovova S, Souto EB, Silva AM. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers – A systematic review of in vitro data. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2014 May;87(1):1–18. doi:10.1016/j.ejpb.2014.02.005

148. López-García J, Lehocký M, Humpolíček P, Sáha P. HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. J Funct Biomater. 2014 May 8;5(2):43–57. doi:10.3390/jfb5020043

149. Mini CA, Dorta DJ, Maria-Engler SS, Oliveira DP. Immortalized Equivalent Human Epidermis as a Platform to Evaluation Hair Dyes Toxicity: Efficiency Comparison Between 3D and Monolayer Culture. Chem Biol Interact. 2020 Oct;330:109227. doi:10.1016/j.cbi.2020.109227

150. Şenkal S, BURUKÇU D, HAYAL TB, KIRATLI B, ŞİŞLİ HB, SAĞRAÇ D, et al. 3D Culture OF HaCaT Keratinocyte Cell Line as an in vitro Toxicity Model. Trak Univ J Nat Sci. 2022 Oct 15;23(2):211–20. doi:10.23902/trkjnat.1158811

151. Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. OECD Publishing; 2025. doi:10.1787/9789264242845-en

152. Kamrani P, Hedrick J, Marks JG, Zaenglein AL. Petroleum Jelly: A Comprehensive Eeview of its History, Uses, and Safety. J Am Acad Dermatol. 2024 Apr;90(4):807–13. doi:10.1016/j.jaad.2023.06.010

153. Wissing SA, Müller RH. The Influence of the Crystallinity of Lipid Nanoparticles on their Occlusive Properties. Int J Pharm. 2002 Aug;242(1–2):377–9. doi:10.1016/S0378-5173(02)00220-X

154. Kocsis D, Klang V, Schweiger E, Varga-Medveczky Z, Mihály A, Pongor C, et al. Characterization and ex vivo Evaluation of Excised Skin Samples as Substitutes for Human Dermal Barrier in Pharmaceutical and Dermatological Studies. Skin Research and Technology. 2022 Sep 21;28(5):664–76. doi:10.1111/srt.13165

155. Herbig ME, Houdek P, Gorissen S, Zorn-Kruppa M, Wladykowski E, Volksdorf T, et al. A Custom Tailored Model to Investigate Skin Penetration in Porcine Skin and its Comparison With Human Skin. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2015 Sep;95:99–109. doi:10.1016/j.ejpb.2015.03.030

156. Klang V, Schwarz JC, Haberfeld S, Xiao P, Wirth M, Valenta C. Skin Integrity Testing and Monitoring of in vitro Tape Stripping by Capacitance-Based Sensor Imaging. Skin Research and Technology. 2013 Feb 7;19(1). doi:10.1111/j.1600-0846.2012.00637.x

157. Pinto JR, Monteiro e Silva SA, Leonardi GR. Effects of 1,3-Propanediol Associated, or Not, with Butylene Glycol and/or Glycerol on Skin Hydration and Skin Barrier Function. Int J Cosmet Sci. 2024 Feb 6;46(1):85–95. doi:10.1111/ics.12911

158. Rajarahm P, Bi R, Attia AE, Zhang R, Thng STG, Ng SP, et al. Noninvasive assessment of skin barrier function: evaluating ceramide-based moisturizer using confocal Raman spectroscopy. J Biomed Opt. 2025 Dec 31;30(S3):1–13. doi:10.1117/1.JBO.30.S3.S34117

159. Berdyshev E, Bronova I, Leung DYM, Goleva E. Methodological Considerations for Lipid and Polar Component Analyses in Human Skin Stratum Corneum. Cell Biochem Biophys. 2021 Sep 15;79(3):659–68. doi:10.1007/s12013-021-01016-6

7. PRILOZI

8. ŽIVOTOPIS

Radwan Joukhadar rođen je 17. srpnja 1990. godine u Vukovaru. Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisao je 2008. godine, a diplomirao 2014. godine.

Stručni staž obavio je tijekom 2014. godine u ljekarni Lj. Joukhadar, nakon čega je stekao odobrenje za samostalan rad. Godine 2015. zaposlio se u tvrtki Medical Intertrade d.o.o., isprva na radnom mjestu komercijalista u telefonskoj prodaji, a danas radi na mjestu zamjenika voditelja prodaje.

Doktorski studij farmaceutskih znanosti na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisao je 2015. godine. Doktorski rad pod naslovom „Razvoj funkcionalnih nanostrukturiranih lipidnih nosača za dermalnu primjenu" izradio je na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Maria Juga.

Do sada je objavio dva znanstvena rada u časopisima indeksiranima u bazi Web of Science Core Collection:

1. Joukhadar R, Nižić Nodilo L, Lovrić J, Hafner A, Pepić I, Jug M. Functional Nanostructured Lipid Carrier-Enriched Hydrogels Tailored to Repair Damaged Epidermal Barrier. Gels 2024; 10: 466

   (IF 5,3; Q1 Polymer Science, 15 citata WoS CC).

2. Juretić L., Joukhadar R., Galić E., Jurišić Grubešić R., Jug M. A Natural Antioxidant-Rich Hydrogel Formulation with Laurus nobilis Hydrosol: Physicochemical and Cosmeceutical Evaluation. Gels 2026; 12: 165

   (IF 6,4; Q1 Polymer Science, 1 citat WoS CC).

Oženjen je i otac dvojice sinova.