

Priprava i karakterizacija termoosjetljivog hidrogela s ekstraktom vrste *Centella asiatica* L. Urban

Naletilić, Gordana

Professional thesis / Završni specijalistički

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:080847>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-31**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Gordana Naletilić

**Priprava i karakterizacija termoosjetljivog hidrogela s
ekstraktom vrste *Centella asiatica* L. Urban**

Specijalistički rad

Zagreb, 2018.

POSILIJEDIPLOMSKI SPECIJALISTIČKI STUDIJ DERMATOFARMACIJA I
KOZMETOLOGIJA

Mentor rada: prof. dr. sc. Jelena Filipović-Grčić

**Završni specijalistički rad obranjen je 17.07.12. u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pred povjerenstvom u sastavu:**

prof. dr. sc. Sanda Vladimir Knežević

prof. dr. sc. Jelena Filipović-Grčić

dr. sc. Biserka Cetina Čižmek, znanstvena savjetnica

Rad ima 36 listova.

PREDGOVOR

Ovaj rad izrađen je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u sklopu poslijediplomskog specijalističkog studija Dermatofarmacija i kozmetologija pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Jelene Filipović-Grčić.

SAŽETAK

Tehnološko pitanje je bilo mogu li se pripremiti stabilni i kozmetički prihvatljivi temperaturno osjetljivi hidrogelovi na bazi poloksamera i hijaluronske kiseline s dodatkom ekstrakata biljke *Centella asiatica* i/ili ekstrakta crvene alge, *Coralline extract*. Biološko pitanje je bilo hoće li hidrogelovi i kako utjecati na hidrataciju kože.

Hidrogelovi su pripremljeni jednostavnom metodom otapanja polimera i dodatka ekstrakata. Karakterizirani su s obzirom na veličinu čestica i reološka svojstva te je pokazano da se kombiniranjem 10 % poloksamera s 1 % hijaluronske kiseline mogu pripremiti stabilni hidrogelovi čija je kritična temperatura geliranja između 27 i 35 °C te mogu uklapati 5 ili 10 % ekstrakata bez da im se značajno promijeni svojstvo geliranja i viskoznost.

Hidratacijska svojstva hidrogelova su ispitana na koži podlaktice zdravih dobrovoljaca korištenjem neinvazivne biometrijske metode pomoću MoisturMap MM100 uređaja. Analizirane su slike površine kože na koju jesu ili nisu primijenjeni uzorci hidrogelova s obzirom na razinu sivog (*Gray Index*).

Rezultati su pokazali da već i sam kombinirani hidrogel poloksamera i hijaluronske kiseline posjeduje hidratacijska svojstva a najbolja hidratacijska svojstva su pokazali hidrogelovi s ekstraktom crvene alge i kombinacijom ekstrakta crvene alge i ekstrakta *C. asiatica* u kojem je bio prisutan glicerol.

Rezultati predstavljaju doprinos razvoju temperaturno osjetljivih hidrogelova za hidrataciju kože i normalno funkcioniranje epidermalne barijere.

SUMMARY

The technological question was whether stable and cosmetically acceptable temperature-sensitive hydrogels based on poloxamer and hyaluronic acid with the addition of extracts of *Centella asiatica* plant and/or red algae extract, Coralline extract could be prepared. The biological question was whether and how hydrogels affect skin hydration.

Hydrogels were prepared by a simple polymer dissolution method and addition of extracts. They were characterized by particle size distribution and rheological properties and it has been demonstrated that by combining 10% of poloxamer and 1% of hyaluronic acid, stable hydrogels with a critical gelling temperature between 27 and 35 ° C can be prepared. The addition of 5 or 10% of the extracts didn't significantly changed their properties of gelation and viscosity.

Hydration hydrogel properties were tested on the forearms of healthy volunteers by non-invasive biometric methods using MoisturMap devices. Skin images were analyzed with regard to the level of the gray surface of the skin to which hydrogel samples were or were not applied.

Results have shown that the combined poloxamer and hyaluronic acid hydrogel have hydration properties and the best hydration properties have been demonstrated by hydrogels with red algae extracts and a combination of red algae extracts and *C. asiatica* extract in which glycerol was present.

The results represent a contribution to the development of temperature-sensitive hydrogels for skin hydration and normal functioning of the epidermal barrier.

SADRŽAJ

PREDGOVOR	3
SAŽETAK	4
SUMMARY	5
UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	7
CILJ ISTRAŽIVANJA	10
MATERIJALI I METODE	11
MATERIJALI	11
FORMULACIJE HIDROGELOVA	11
KARAKTERIZACIJA HIDROGELOVA	13
ODREĐIVANJE VELIČINE I RASPODJELE VELIČINA ČESTICA	13
REOLOŠKA MJERENJA	13
PROCJENA DJELOTVORNOSTI HIDRATACIJE <i>IN VIVO</i>	13
REZULTATI I RASPRAVA	15
FORMULACIJE HIDROGELOVA	15
KEMIJSKI SASTAV <i>CENTELLA ASIATICA</i> (L.)	15
MEHANIZAM DJELOVANJA <i>CENTELLA ASIATICA</i> (L.)	16
KARAKTERIZACIJA HIDROGELOVA	19
HIDRODINAMIČKI PROMJER MICELA HIDROGELOVA	19
REOLOŠKA MJERENJA	21
PROCJENA DJELOTVORNOSTI HIDRATACIJE <i>IN VIVO</i>	29
ZAKLJUČCI	33
LITERATURA	34
ŽIVOTOPIS	36

UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Koža ima mnogobrojne funkcije, osobito u obrani od fizičkih, kemijskih ili bioloških čimbenika. Koža sudjeluje u regulaciji homeostaze vode i elektrolita i sekrecijski je organ. Uključena je u percepciju i imunološki odgovor cijelog organizma (1). Poremećaji ili oštećenja tako opsežnog i višenamjenskog organa kao što je koža mogu biti ozbiljna prijetnja zdravlju pa čak i životu. Koža prosječne odrasle osobe zauzima površinu od približno 1,5-2,0 m² i čini jednu desetinu tjelesne mase. Sačinjena je od dva različita sloja, epidermisa i dermisa, međusobno odvojena bazalnom membranom, ispod kojih se nalazi potkožno masno tkivo (hipodermis). Druge komponente kože su žlijezde znojnice i lojnice, folikuli dlaka i nokti. Epidermis sadrži nekoliko vrsta stanica, među kojima su dominantni keratinociti. Druge epidermalne stanice su melanociti, Merkelove stanice i Langerhansove stanice. Dermis je načinjen od kolagenskih vlakana i elastina, fibronektina, proteoglikana i glikozaminoglikana. Međutim, glavna komponenta ovog sloja su fibroblasti (1).

Keratinociti formiraju epidermalnu barijeru prolazeći vrlo složenim procesom diferencijacije, koji uključuje promjenu njihove morfologije i strukturne cjelovitosti, koji se naziva keratinizacija ili kornifikacija. Promjene u procesu keratinizacije epidermisa utječu na formiranje kožne barijere te najčešće rezultiraju poremećenom barijerom koja omogućava unos imunoreaktivnih tvari u kožu. To doprinosi i potiče upalne procese kože ali također utječe i na druge organe. U mnogim uobičajenim kožnim bolestima, uključujući atopijski dermatitis i psorijazu, opaženi su nedostaci u formiranju kožne barijere (2).

Najvažnija i najučestalija posljedica oslabljene funkcije kožne barijere je smanjena hidratacija rožnatog sloja (stratum corneum, SC) epidermisa odnosno prekomjerno gubljenje vode (engl. *TransEpidermal Water Loss*, TEWL) iz epidermisa (3).

Hidratiziranost SC određuje izgled i fizička svojstva kože. Smanjena hidratacija površine kože rezultira njezinim suhim, grubim i obješenim izgledom uz gubitak elastičnosti. Drugi vidljivi znakovi uključuju pigmentaciju i pojavu benignih tumora kože (3).

Na funkciju i obnavljanje kožne barijere, te time i na svojstva hidratacije kože, mogu utjecati brojni vanjski (ekstrinzični) i unutarnji (intrinzični) faktori. Od unutarnjih faktora je najznačajnije starenje (4).

Starenje kože je složen proces koji kontrolira genetika (kronološko starenje) i/ili utjecaj vanjskih čimbenika (ekstrinzično starenje). Starenjem kože događaju se različite modifikacije stanica i tkiva. Nekoliko je studija pokazalo da proces starenja rezultira smanjenom proliferacijskom aktivnošću i keratinocita i fibroblasta. Tijekom godina prirodno se smanjuje brzina obnavljanja stanica i sinteza kolagena tipa I i tipa III te hijaluronske kiseline (HA) u kožnim fibroblastima. Epidermis postaje tanji s dobi i kao rezultat se razvijaju bore.

Gubitak sposobnosti regeneracije je i uzrok i mjera starenja kože (5,6).

Formulacije protiv starenja kože trebaju, uz aktivne sastojke za poticanje regeneracije, svakako sadržavati tvari koje hidratiziraju kožu odnosno održavaju funkcionalnost epidermalne barijere. To je neophodno i za postizanje lokalnog terapijskog učinka i za dostavu/penetraciju aktivnih sastojaka do ciljnih stanica. Također, formulacije ne bi trebale imati štetne lokalne i/ili sustavne nuspojave. Stoga se stalno istražuju i razvijaju inovativne topikalne formulacije za hidrataciju i protiv starenja kože s djelatnim sastojcima koji su djelotvorni i stabilni te istovremeno sigurni i netoksični (7).

Kako je prije rečeno, prirodni proces starenja rezultira gubitkom hijaluronske kiseline (HA), jedne od najvažnijih komponenata izvanstaničnog matriksa uz kolagen i elastin. HA je glikozaminoglikan velike molekulske mase (10-104 kDa) sastavljen od ponavljajućih disaharidnih jedinica N-acetilglukozamina i glukuronske kiseline. HA igra ključnu ulogu u hidrataciji tkiva i zadržavanju vlage zbog sposobnosti vezanja molekula vode čime može doseći do 1000 puta veću molekulsku masu. U koži se HA nalazi u dermisu i u epidermalnim međustaničnim prostorima, a sintetiziraju je fibroblasti, keratinociti i ostale stanice kože. HA se vrlo brzo obnavlja, tijekom 0,5 do nekoliko (2-3) dana a njezina se količina smanjuje s dobi. HA je vrlo često korišten sastojak kozmetičkih pripravaka za hidrataciju i protiv starenja kože, osobito hidrogelova (8).

Hidrogelovi su trodimenzionalne polimerne mreže za koje je poznato da imaju djelotvorna svojstva vlaženja zbog visokog sadržaja vode. Njihova hidrofilna baza stvara na koži vrlo djelotvorni matriks za isporuku aktivnih sastojaka u kožu. Termoosjetljivi hidrogelovi se posebno koriste za lokaliziranu, kontroliranu i kontinuiranu dostavu aktivnih sastojaka, temeljeno na pomaku u konformaciji, topljivosti i hidrofilnoj/hidrofobnoj ravnoteži zbog toplinskih podražaja (9,10). Njihova formulacija i svojstva mogu se podesiti tako da odgovaraju kinetici oslobađanja bioaktivnog sastojka te su stoga od velikog interesa za njegu i terapiju kože kao transdermalni terapijski sustavi (11-13). Ustanovljeno je da se HA resorbira s površine kože i brzo prolazi kroz epidermis. Stoga se može očekivati da HA može potaknuti unos lijekova/aktivnih sastojaka u kožu, barem što se tiče dubljih slojeva dermisa (14).



Jedna od biljaka koje se koriste u dermatologiji je *Centella asiatica* (L.) Urban iz obitelji Apiaceae, također poznata po imenu Gotu kola. Raste u tropskim regijama Azije, Oceanije, Afrike i Amerike. Ekstrakt *C. asiatica* (CA; Međunarodna nomenklatura kozmetičkih sastojaka, INCI) koristi se kao sastojak kozmetike (15).

Primarni aktivni sastojci CA su saponini (koji se nazivaju i triterpenoidi), koji uključuju aziatikozide, u kojima je trisaharidni dio povezan s aglikonom azijskom kiselinom,

madekazoziidom i madazijskom kiselinom. (Aglikon je nešećerni spoj koji ostane nakon što se glikozidna skupina u glikozidu zamijeni atomom vodika. Veza između glikona i aglikona naziva se glikozidna veza.) Ti triterpenski saponini i njihovi sapogenini uglavnom su odgovorni za zacjeljivanje rana i vaskularne učinke. Osim toga, ukupni ekstrakt sadrži biljne sterole, flavonoide i druge komponente bez poznate farmakološke aktivnosti, to jest, obilno tanine (20-25%), esencijalne kiseline (0,1% s beta-kariofilenom, trans-beta-farnezinom i germakrenom D), fitosterole (kampesterol, sitosterol, stigmasterol), mucilagene smole, aminokiseline (alanin, serin, aminobutirat, aspartat, glutamat, lizin i treonin), flavonoide (derivate kvercetina i kempferola), alkaloida (hidrokotin), gorke komponente (valerin), masne kiseline (linolnu, linolensku, oleinsku, palmitinsku i stearinsku) (15).

Kozmetičke formulacije koje sadrže ekstrakt CA imaju hidratantna i protuupalna svojstva. Stoga se CA ekstrakti mogu koristiti u hidratantnim kozmetičkim pripravcima i također nadopuniti tretman suhe i osjetljive kože (16).

Mehanizam djelovanja uključuje promicanje proliferacije fibroblasta i povećanje sinteze kolagena, kao i kiselih mukopolisaharida, povećanje intracelularnog sadržaja fibronektina i mitotičke aktivnosti u germinativnom sloju epidermisa, značajno poboljšanje čvrstoće novoformirane kože kao i inhibiciju upalne faze hipertrofičnih ožiljaka i keloida (15,16).

CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je bio priprava i karakterizacija termoosjetljivih hidrogelova s hijaluronskom kiselinom i različitim ekstraktima CA te ispitivanje njihove hidratacijske djelotvornosti.

MATERIJALI I METODE

MATERIJALI

Korištene su dvije vrste ekstrakata biljke *C. asiatica*: **E1** = Phytoliquid Centella P (INCI: Aqua (and) Butylene Glycol (and) Centella Asiatica Leaf Extract) i **E2** = Phytexcell Centella Asiatica (INCI: Glycerin (and) Butylene Glycol (and) Aqua (and) Centella Asiatica Leaf Extract). Potom **C** = Crodarom Coralline (INCI: Aqua (and) Glycerin (and) Corallina Officinalis Extract) koji je prirodni ekstrakt crvene alge bogat magnezijem i kalcijem. Te ekstrakte je kao besplatne uzorke ljubazno ustupila CRODAROM, francuska podružnica Croda grupe (Ujedinjeno Kraljevstvo). Hijaluronska kiselina (**HA**) nabavljena je od Kemiga (Hrvatska). Pluracare® F 127 NF Prill (INCI: Poloxamer 407) nabavljen je od tvrtke BASF Care Creations (Njemačka). Za sve pokuse korištena je pročišćena voda. Ostali korišteni reagensi bili su analitičkog stupnja čistoće.

FORMULACIJE HIDROGELOVA

Poloksamerski (P) gelovi pripremljeni su hladnom metodom, jednostavnim miješanjem magnetnom mješalicom. Korišten je Pluracare F-127(P-407) u određenoj koncentraciji i redestilirana voda (Aqua redestillata; qs). Otopine poloksamera držane su u hladnjaku pri 5° C tijekom 6-12 h, nakon čega su bile potpuno bistre.

Hidrogel poloksamera i hijaluronske kiseline (PHA) pripremljen je hladnim postupkom. Dio redestilirane vode korišten je za otapanje P, a drugi dio za otapanje HA pri sobnoj temperaturi, uz miješanje magnetnom mješalicom. Nakon što je otopina HA postala bistra gel-otopina, pomiješana je s otopinom P i ostavljena u hladnjaku 6-12 h.

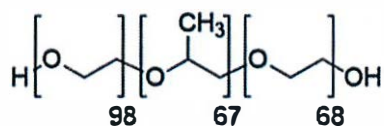
PHA hidrogel je viskozni gel i pri sobnoj temperaturi i pri temperaturi hladnjaka.

Formulacija PHA hidrogela:

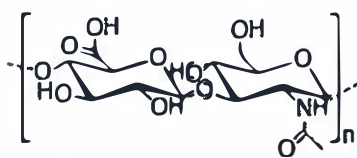
	% (m)
P 407	10
HA1	1
Aqua redestillata	89



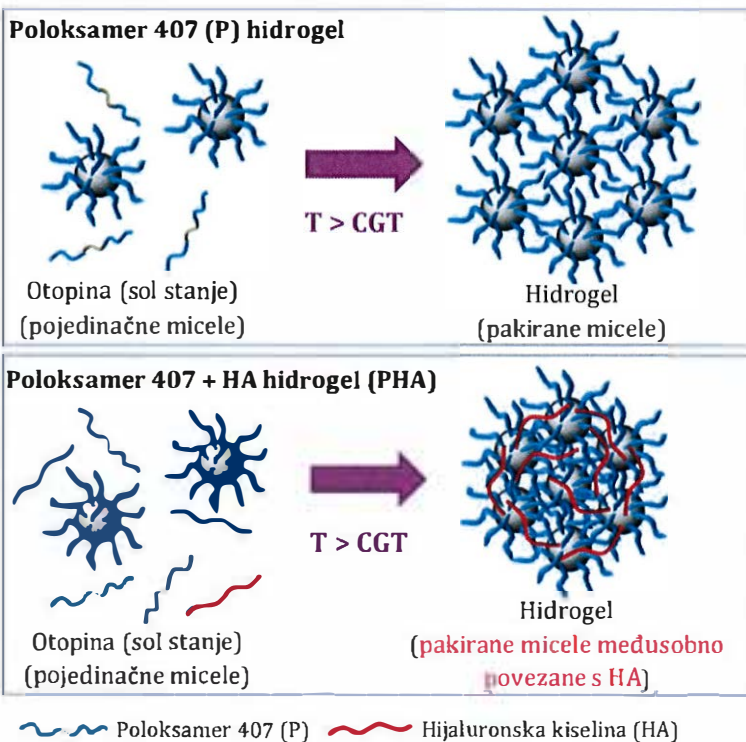
(a)



Poloksamer 407 (P)

Hijaluronska kiselina
(HA)

(b) Poloksamer 407 (P) hidrogel



Slika 1.

Strukturne formule poloksamera 407 i hijaluronske kiseline (a) te shematski prikaz nastajanja P i PHA gela iznad kritične temperature geliranja (b) (17).

Otopine poloksamera s ekstraktima C, E1 i E2 pripremljene su jednostavnim dodavanjem pojedinog ekstrakta ili kombinacije dva ekstrakta hladnim postupkom u P ili PHA otopinu, da bi se dobila 5 % ili 10 % koncentracija ekstrakta.

Formulacija PHAE1 hidrogela

	%(m)
P 407.....	10
HA.....	1
Phytoliquid CA.....	5
Aqua redestillata.....	84

Formulacija PHACE2 hidrogela

	%(m)
P 407.....	10
HA.....	1
Corallina	5
Phytexcell CA.....	5
Aqua redestillata	79

KARAKTERIZACIJA HIDROGELOVA

ODREĐIVANJE VELIČINE I RASPODJELE VELIČINA ČESTICA

Analiza veličina čestica u P i PHA gelovima je provedena mjerenjem dinamičkog raspršenja svjetlosti (Dynamic Light Scattering (DLS)) na uređaju Zetasizer 3000 HAS (Malvern Instruments, UK). Promjer čestice dobiven ovom metodom vrijednost je koja govori o difuziji čestice i naziva se hidrodinamičkim promjerom (d_h). To je promjer kugle (sfere) s jednakim translacijskim difuzijskim koeficijentom kao promatrana (nepravilna) čestica. Rezultati su prikazani s $d_h \pm SD$ i indeksom polidisperznosti ($PDI \pm SD$). Analiza je provedena barem tri puta na svakom uzorku.

REOLOŠKA MJERENJA

Krivulje viskoznosti (ovisnost viskoznosti o brzini smicanja) mjerene su na reometru (Anton Paar Physica MCR 102) korištenjem konusnog mjernog tijela (50 mm) u kombinaciji s pločom pri 32 °C i rasponu smičnih brzina od 0,01-100 s⁻¹.

Viskoelastična svojstva izrađenih sustava provedena su u linearnom viskoelastičnom području (Anton Paar Physica MCR 102) korištenjem metode paralelnih ploča (promjera 50 mm; razmak 0,5 mm) pri kutnoj frekvenciji 1 rad/s. Mjerene su promjene viskoznosti modula pohrane (G') i modula gubitka (G'') ovisno o promjeni temperature (15-45 °C). Iz sjecišta krivulja modula pohrane (G') i modula gubitka (G'') određene su temperature geliranja izrađenih formulacija.

PROCJENA DJELOTVORNOSTI HIDRATACIJE *IN VIVO*

Za ovaj dio istraživanja dobiveno je odobrenje Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta (29. ožujka 2018.).

U istraživanje se uključilo ukupno 18 zdravih ispitanika s rasponom dobi od 20 do 65 godina starosti, bez prethodne bolesti kože, nakon što su dali svoj pisani pristanak. Studija je dizajnirana kao jednostrana slijepa, placebo-kontrolirana studija. Ispitanici su upućeni da ne koriste kozmetičke proizvode dva tjedna prije i na dan pokusa, osim proizvoda za pranje poput sapuna. Prije svih mjerenja ispitanici su proveli u sobi najmanje 30 minuta kako bi se omogućila puna prilagodba kože na sobnu temperaturu (21 ± 2 °C) i relativnu vlažnost ($60\% \pm 5\%$).

Odabrana su područja (3-5) (svako od 9 cm²) na koži podlaktice obje ruke svakog dobrovoljca: jedno polje je služilo kao kontrola i na njega se nisu primjenjivali uzorci hidrogelova a na ostala područja su se primijenile različite formulacije. Sadržaj vlage u rožnatom sloju je određen neinvazivnim biometrijskim mjerenjima pomoću uređaja s kapacitivnim senzorom za snimanje raspodjele vlage u rožnatom sloju (MoistureMap MM 100-Courage & Khazaka Electronic GmbH, Köln, Njemačka). Mjerenja su provedena 1, 2, 3, 4 i 5 h nakon jednokratne primjene formulacija.

MoistureMap slike omogućuju vrlo precizno pregledavanje topografije kože koja se lako može kvantificirati u smislu gustoće i orijentacije linija. Hidratacija kože procijenjena je statističkom analizom razine sivog u području interesa.

Statistička analiza podataka dviju skupina provedena je pomoću Studentovog t-testa. Za usporedbu tri ili više skupina, primijenjena je jednosmjerna ANOVA i Tukeyova višestruka usporedba. Značajnim se smatrao $P < 0,05$. Analize su provedene pomoću programa GraphPad 5 Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

REZULTATI I RASPRAVA

FORMULACIJE HIDROGELOVA

Dizajnirani su temperaturno osjetljivi hidrogelovi (**PHA**) sastavljeni od hijaluronske kiseline (**HA**) i poloksamera 407 (**P**) za dugotrajnu isporuku sastojaka za hidrataciju kože. Kao sastojci s hidratizirajućim učinkom u ovoj su studiji ispitivni biljni ekstrakti *Centella asiatica* (L.) Urban: **E1** = Phytoliquid Centella P (INCI: Aqua (and) Butylene Glycol (and) Centella Asiatica Leaf Extract) i **E2** = Phytexcell Centella Asiatica (INCI: Glycerin (and) Butylene Glycol (and) Aqua (and) Centella Asiatica Leaf Extract). Također je ispitan dodatak **C** = Crodarom Coralline (INCI: Aqua (and) Glycerin (and) Corallina Officinalis Extract) koji je prirodni ekstrakt crvene alge bogat magnezijem i kalcijem. Ovi minerali su esencijalni za staničnu komunikaciju i koheziju pa pomažu zadržati hidrolipidnu ravnotežu i očuvati elastičnost kože. Corallina djeluje hidratacijski, antioksidacijski i regenerativno stoga je idealan hidratizirajući i revitalizirajući sastojak za kožu (18).

Centella asiatica se kao ljekovita biljka koristi u narodnoj medicini već stoljećima za širok spektar indikacija. Smatra se dijelom ajurvedske, tradicionalne kineske medicine, kao i afričke i indijske medicine (19,20).

Uvrštena je u Indian Pharmacopoeia, te u Martindale European Pharmacopoeia, British Herbal Pharmacopoeia, German Pharmacopoeia, Chinese Pharmacopoeia, Pharmacopoe française, Dutch Pharmacopoeia, La Farmacopea Italiana X, European Pharmacopoeia VI, Polish Pharmacopoeia IX edition.

Po europskoj farmakopeji oficinalna je Centellae asiaticae herba, a sastoji se od osušenih, usitnjenih nadzemnih dijelova *Centella asiatica* (L.) Urban, koji trebaju sadržavati najmanje 6 % ukupnih triterpenoidnih sastojaka izraženih kao aziatikozidi (21).

KEMIJSKI SASTAV *CENTELLA ASIATICA* (L.)

Najvažniji spojevi izolirani iz CA su:

- **centeloidi**, triterpenski saponini; saponini mogu iznositi 1 % do 8 % svih sastojaka biljke, ovisno o porijeklu CA
- **centellosidi**, pentaciklički triterpenoidni saponini koji su farmakološki aktivni i najvažniji su: aziatikozid, madekasozid, azijska kiselina, madekazijska kiselina

Ostali centellosidi zastupljeni u CA su: triterpenske kiseline (brahminska, madazična, terminolska kiselina i centelna kiselina), kao i njihovi glikozidi (brahmino zid, madaziatiko zid, centelozid). CA ima još neke sastojke kao što su: flavonoidi (kvercetin, kemferol) seskviterpeni (cariofolen), fitosterole (sitosterol, stigmasterol), aminokiseline, tanine, šećere i esencijalna ulja (0,1 %). Listovi CA su bogati vitaminima B i C, a u suhoj tvari nađeni su: Fe, Ca, Mg, Na, K, kloridi, sulfati i fosfati.

MEHANIZAM DJELOVANJA *CENTELLA ASIATICA* (L.)

Glavne aktivne tvari su aziatiko zidi i madekaso zidi, te njihovi aglikoni azijska i madekazijska kiselina.

Djelovanje centella asiatica ekstrakta je:

- poboljšano zacjeljivanje (cikatrizant)
- poboljšana hidratacija kože
- protuupalno uključujući sunčane opekline
- antioksidacijsko
- antaging
- antivirusno
- antibakterijsko
- na varikozitete

Ekstrakt CA potiče proliferaciju fibroblasta i povećava sintezu kolagena tipa I i unutarstaničnog fibronektina. Također inhibira upalnu fazu tijekom zarastanja, te poboljšava svojstva i strukturu novoformirane kože, prevenirajući stvaranje hipertrofiranih ožiljaka i keloida. Odavno se koristi u liječenju malih rana, opekline, ožiljaka, psorijaze, skleroderme (22–25).

Terapijski potencijal CA predmet je brojnih eksperimentalnih i kliničkih istraživanja. Znanstvene studije su dokazale da ima pozitivan učinak u liječenju venske insuficijencije, striae gravidarum, rana, opekline i kroničnih vrijedova (26–28).

U kozmetologiji se ekstrakt CA primjenjuje u tretmanima celulita, strija i fotostarenja kože, te je vrlo često sastojak u kozmetičkim proizvodima za usporavanje starenja kože. U složenom procesu starenja kože jedan od faktora je i izloženost suncu. Učinci fotostarenja kože upravo se najviše ispoljavaju u dermisu i epidermisu. CA može poboljšati strukturu i elastičnost kože oštećene suncem. Madekaso zid, aktivni sastojak iz CA inducira ekspresiju kolagena i modulira medijatore upale, te daje bolju hidrataciju kože. Time može spriječiti i ispraviti neke znakove fotostarenja kože. To može biti rezultat sinergističkog učinka poboljšane hidratacije, zahvaljujući

madekasoziidu, antioksidativnog i protuupalnog djelovanja te UV zaštitnog djelovanja na kožu i popravka već nastalih fotooštećenja (15,29).

U dermatologiji je primjena *Centella asiatica* posebno ispitana kod ožiljaka, opekline, zacjeljivanja rana i za liječenje ulcus cruris (30,31).

Aziatikozyd, aktivni sastojak CA ima učinak protiv stvaranja ožiljka stoga jer povećava sintezu kolagena tipa I u humanim fibroblastima, stimulira angiogenezu te poboljšava elastičnost krvnih žila, povećava razinu hidroksiprolina te povećava razinu antioksidansa u novostvorenim tkivima (32).

EMA (Europska agencija za lijekove) izvještava o upotrebi i djelotvornosti pripravaka sa ekstraktom CA (33):

- krema/mast koja sadrži 1 % titiranog CA ekstrakta (TECA) odobrena za upotrebu na koži u liječenju rana, vrijedova i opekline.
- prah 2 % TECA – odobren za uporabu u liječenju ožiljaka, opekline i keloidnih ožiljaka.

Medicinski proizvodi sa ekstraktima *Centella asiatica* (L.) Urban odobreni su u Belgiji (od 1968.) Francuskoj, Grčkoj, Portugalu, Italiji i Španjolskoj (EMA).

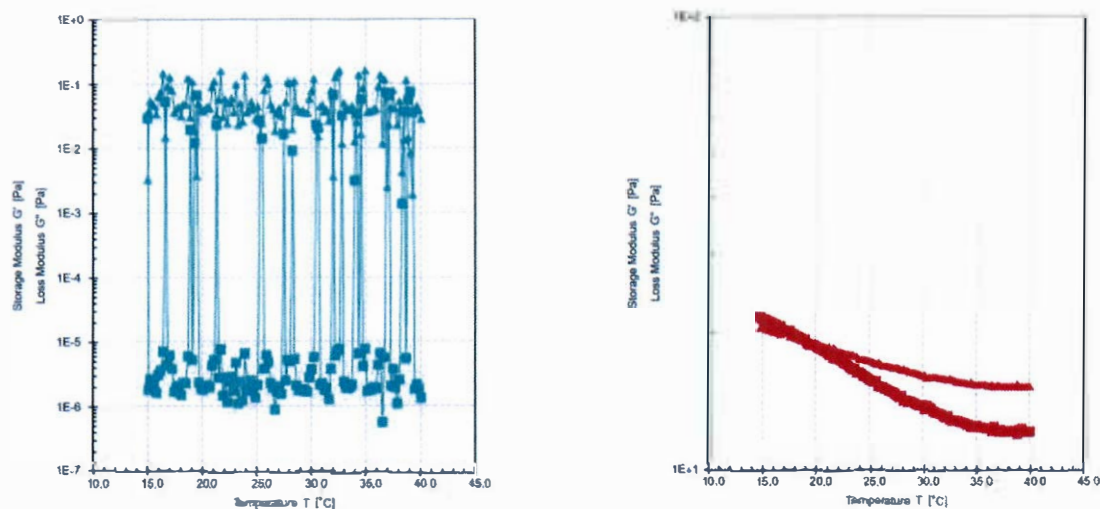
Klinička istraživanja za CA ekstrakt rađena su za:

- pripravke CA (1 % mast i 2 % prah)–ubrzano zacjeljivanje rana
- formulaciju koja sadrži aziatikozyd kao glavni aktivni sastojak te je pokazano izlječenje 64 % inficiranih rana
- topikalnu primjenu CA na opeklina 2. ili 3. stupnja te je pokazano sprječavanje infekcije, ubrzano zacjeljivanje i inhibicija nastanka hipertrofiranih ožiljaka
- kremu s 1 % standardiziranog ekstrakta CA te je dokazano uspješno liječenje Ulcus cruris
- klinički je dokazan pozitivan terapijski učinak kod venske insuficijencije (značajno manje proširenih vena i edema).

Brojne primjene CA za koje još ne postoje klinička istraživanja opisane su u farmakopejama i tradicionalnim priručnicima (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal/List_of_references_supporting_the_assessment_report/2012/06/WC500128146.pdf)

Biokompatibilni polimer, poloksamer 407, primijenjen je kao temperaturno osjetljiva komponenta zbog svojstva brze i reverzibilne sol-gel tranzicije te stabilizacije hidrofobnih tvari u vodenim otopinama. HA, biokompatibilni polisaharid, je korištena za kontroliranje oslobađanja djelatnih hidratizirajućih sastojaka te smanjenje koncentracije P potrebne za geliranje uz to što i sama posjeduje hidratizirajuća svojstva. Prije je pokazano da dodatak visoko molekularne HA u poloksamersku otopinu potiče stvaranje gušće pakiranih micela pri temperaturi geliranja zbog hidrofobnih interakcija između acetilnih skupina HA i metilnih skupina na P407. To umrežavanje unutar micela, potaknuto HA, povećava čvrstoću temperaturno osjetljivog hidrogela (17,34).

Cilj je bio pripremiti temperaturno osjetljive hidrogelove s minimalnom količinom poloksamera u kombinaciji s hijaluronskom kiselinom i biljnim ekstraktima s hidratizirajućim svojstvima. Stoga su najprije ispitana svojstva geliranja uzoraka s rasponom koncentracija P između 5 i 15 %. Rezultati reoloških mjerenja svojstava geliranja i temperature sol-gel prijelaza uzoraka P 5 % i P 5% + HA 1% prikazani su na slici 2.



Slika 2:

Rezultati ispitivanja viskoelastičnih svojstava uzorka s 5 % poloksamera 407 (lijevo) i uzorka s 5 % poloksamera 407 i 1 % hijaluronske kiseline (desno). Promjene modula pohrane (G') i gubitka (G'') u ovisnosti o promjeni temperature bilježene su pri kutnoj frekvenciji od 1 rad/s i napreznju $\gamma=0,1$ %.

Može se vidjeti da uzorak 5% P ne gelira pri temperaturi nižoj od 40 °C. Također, uzorku s 5 % P i 1 % HA viskoelastična svojstva smanjuju se s povećanjem temperature. Stoga su uzorci koji su korišteni u daljnjim ispitivanjima i za *in vivo* procjenu djelotvornosti hidratacije pripremljeni s 10 % P.

Pripravljeno je 11 uzoraka hidrogelova kombiniranjem 10 % P, 1 % HA te 5 % C, E1 ili E2. Za usporebu su pripremljeni uzorci (5) sačinjeni od 1 % HA te 5 % C, E1 ili E2 i uzorci samo 10 % P i 1 % HA. Sastav i oznake pripremljenih uzoraka su prikazani u tablici 1.

Tablica 1: Formulacije hidrogelova i njihov sastav.

Sastojak	Formulacija																	
	P	PHA	PC	PE1	PE2	PCE1	PCE2	PHAC	PHAE1	PHAE2	PHACE1	PHACE2	HA	HAC	HAE1	HAE2	HACE1	HACE2
P (10%)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
HA (1%)		X						X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
C (5%)			X			X	X	X			X	X		X			X	X
E1 (5%)				X		X			X		X				X		X	
E2 (5%)					X		X			X		X				X		X

KARAKTERIZACIJA HIDROGELOVA

Hidrogelovima je određena veličina čestica/micela, odnosno mjeren je hidrodinamički promjer na ZetaSizer-u. Određena su reološka svojstva, odnosno izmjerene krivulje/profil viskoznosti te je mjerenjem promjena viskoznosti modula pohrane (G') i modula gubitka (G'') ovisno o promjeni temperature, iz sjecišta krivulja modula pohrane (G') i modula gubitka (G'') određena temperatura geliranja izrađenih formulacija hidrogelova. Potom je procijenjena njihova djelotvornost hidratacije *in vivo*.

HIDRODINAMIČKI PROMJER MICELA HIDROGELOVA

Za poloksamer 407 je poznato da u vodenim otopinama pokazuje termoreverzibilno geliranje. S povećanjem temperature P agregira u micela da bi se smanjila slobodna energija otopine. Dakle, zagrijavanjem vodene otopine poloksamera 407 stvara se ravnoteža između monomera i micela te pri temperaturi geliranja nastaju agregati.

Analiza veličine čestica u P i PHA gelovima je provedena mjerenjem dinamičkog raspršenja svjetlosti na uređaju Zetasizer. Tim mjerenjima se je željelo potvrditi i pakiranje/smiještanje dodane HA u P micela. Mjerenja su provedena pri 32 °C. Rezultati su prikazani u tablici 2.

Kao što se može vidjeti iz tablice 2., veličina čestica se u formulacijama P i PHA kreće između 18 i 50 nm. Otopini samog poloksamera je izmjerena veličina micela od $23,9 \pm 6,1$ (PDI = $0,649 \pm 0,014$). PHA formulaciji je izmjerena veličina micela od ≈ 50 nm što je ujedno najveća izmjerena vrijednost. Iako je izmjerena veličina oko 10 puta manja od one koju su objavili Jung i suradnici (17) koji su pokazali da se HA ugrađuje u P micela i povećava čvrstoću hidrogela, može se zaključiti da i u našem slučaju postoji određena interakcija između P i HA.

Tablica 2: Rezultati analize veličine čestica formulacija hidrogelova provedene mjerenjem dinamičkog raspršenja svjetlosti pri 32 °C.

Formulacija	$d_h \pm SD$ (nm)	PDI $\pm SD$
P	$23,9 \pm 6,1$	$0,649 \pm 0,014$
PHA	$49,9 \pm 5,9$	$0,603 \pm 0,062$
PC	$21,6 \pm 3,6$	$0,321 \pm 0,143$
PE1	$24,7 \pm 2,4$	$0,422 \pm 0,049$
PE2	$23,7 \pm 1,7$	$0,448 \pm 0,050$
PCE1	$18,2 \pm 1,5$	$0,557 \pm 0,016$
PCE2	$18,1 \pm 0,4$	$0,534 \pm 0,015$
PHAC	$22,0 \pm 7,6$	$0,290 \pm 0,085$
PHAE1	$23,0 \pm 3,3$	$0,552 \pm 0,030$
PHAE2	$21,4 \pm 2,4$	$0,558 \pm 0,068$
PHACE1	$24,4 \pm 5,7$	$0,563 \pm 0,051$
PHACE2	$22,3 \pm 1,7$	$0,586 \pm 0,011$

Dodatak različitih vrsta biljnih ekstrakata u P ne mijenja značajno veličinu micela (PC, PE1, PE2), osim u slučaju kombinacije ekstrakata (PCE1, PCE2) gdje je veličina micela oko 18 nm. Uzorci koji sadrže kombinaciju ekstrakata su pripremljeni s po 5 % svakog ekstrakta, dakle sadrže ukupno 10 % ekstrakata, pa se njihova različita svojstva mogu tumačiti i na osnovu razlike u koncentraciji a ne samo na osnovu razlike u sastavu ekstrakata.

Uzorci koji sadrže kombinaciju P i HA i različite vrste ekstrakata ili njihove kombinacije imaju veličinu micela između 21 i 25 nm, dakle vrlo sličnu veličini P ($23,9 \pm 6,1$ nm) hidrogela i značajno manju od PHA formulacije ($49,9 \pm 5,9$ nm). Iz toga bi se moglo zaključiti da dodatak ekstrakata utječe na strukturu micela i to izraženije na PHA nego na P formulacije.

REOLOŠKA MJERENJA

Osnovna reološka svojstva **krutih materijala** su elastičnost i plastičnost, a **tekućih** (fluida) viskoznost.

Biološki materijali, uključujući farmaceutske proizvode, zbog svog složenog sastava rijetko pokazuju samo jedno od navedenih svojstava, iako se najčešće opisuju samo jednim od njih.

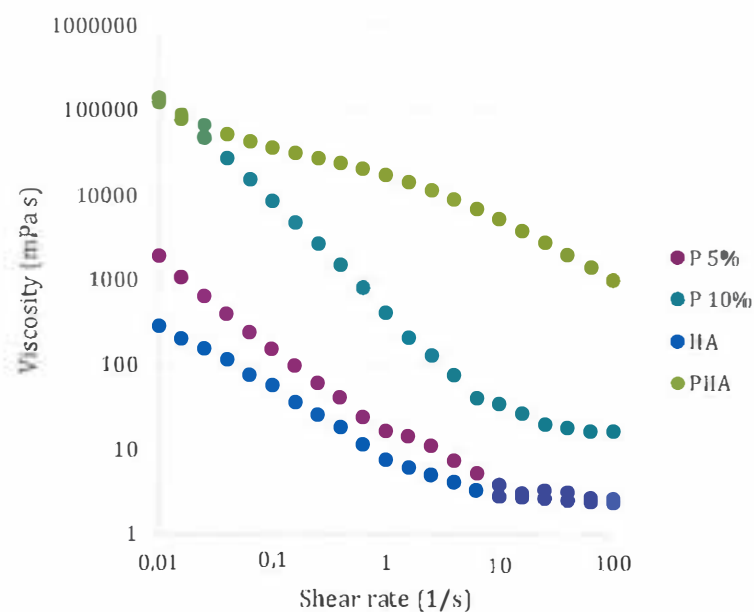
Materijal je **idealno elastičan** kada se deformacija pojavi trenutačno s djelovanjem sile, a nestaje nakon prestanka djelovanja sile. Ako materijal podliježe trajnoj deformaciji kada se postigne određeni **prag naprezanja**, za njega se kaže da pokazuje **plastično ponašanje**.

Pojedini koloidni sustavi, pod određenim uvjetima, pokazuju svojstva i tekućih i krutih materijala u različitom omjeru, pa se zbog toga nazivaju **viskoelastični sustavi**.

Osim kemijskog sastava, na stanje nekog reološkog sustava utječu još neki čimbenici, kao što su: temperatura, udio suhe tvari, pH, brzina smicanja, vrijeme smicanja, uvjeti pripreme i pohrane/čuvanja materijala, kao i primijenjena metoda određivanja reoloških svojstava.

Određivana je ovisnost viskoznosti o smičnom naprezanju pri 32 °C.

Na slici 3. je prikazana usporedba krivulja viskoznosti uzoraka samog poloksamera, P 5 % i 10 %, same HA (1 %) te PHA formulacije.



Slika 3.

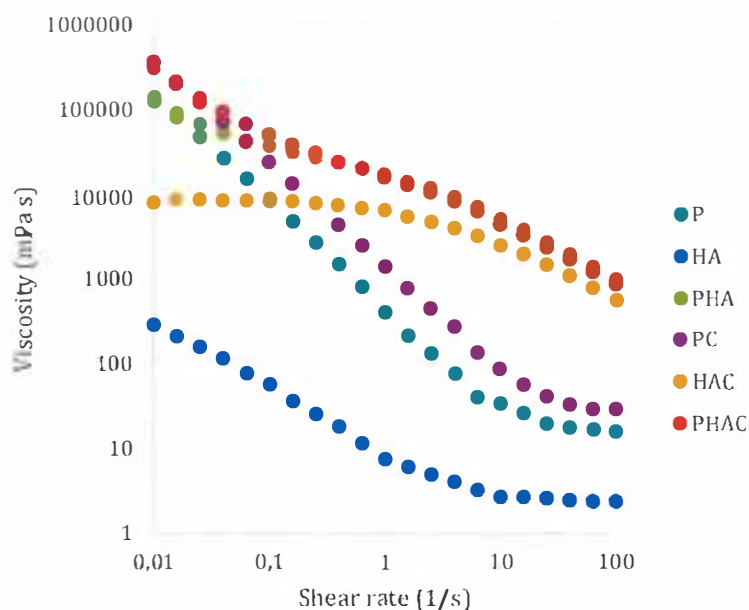
Krivulje viskoznosti P (5 % i 10 %) u usporedbi s krivuljama viskoznosti HA (1%) i PHA pri 32 °C.

Iz slike 3. se može vidjeti da se svim uzorcima viskoznost smanjuje s povećanjem brzine smicanja, odnosno da su svi sustavi pri 32 °C i niskom smičnom naprežanju gelovi. Čvrstoća P gelova se povećava s povećanjem koncentracije. Kombiniranjem P i HA nastaje gel koji, pri niskim brzinama smicanja ima sličnu viskoznost kao P gel ali je pri većim brzinama smicanja viskoznost a time i čvrstoća kombiniranog gela značajno veća od viskoznosti samog P gela.

Na slici 4. su prikazane krivulje viskoznosti formulacija koji sadrže ekstrakt crvene alge (C) u koncentraciji od 5 % u usporedbi s krivuljama viskoznosti samih P i HA te krivuljom viskoznosti PHA formulacije. Profili viskoznosti P i PC uzoraka su slični ali su vrijednosti viskoznosti PC uzorka oko 2,5 puta veće od viskoznosti samog P.

Profili viskoznosti HA i HAC uzoraka su različiti. Na HAC profilu viskoznosti može se vidjeti plato viskoznosti (*zero shear viscosity*) kako se brzina smicanja približava nuli, odnosno idealno tečenje sustava. S povećanjem brzine smicanja viskoznost HAC uzorka naglo opada. Vrijednosti viskoznosti HAC uzorka u odnosu na HA uzorak su značajno veće.

Kad se C doda u kombinirani, PHA sustav, viskoznost PHAC sustava je pri mirovanju, odnosno malom smičnom naprežanju veća od viskoznosti PHA sustava i jednaka viskoznosti PC, dok je pri većim smičnim naprežanjima gotovo jednaka viskoznosti PHA sustava.



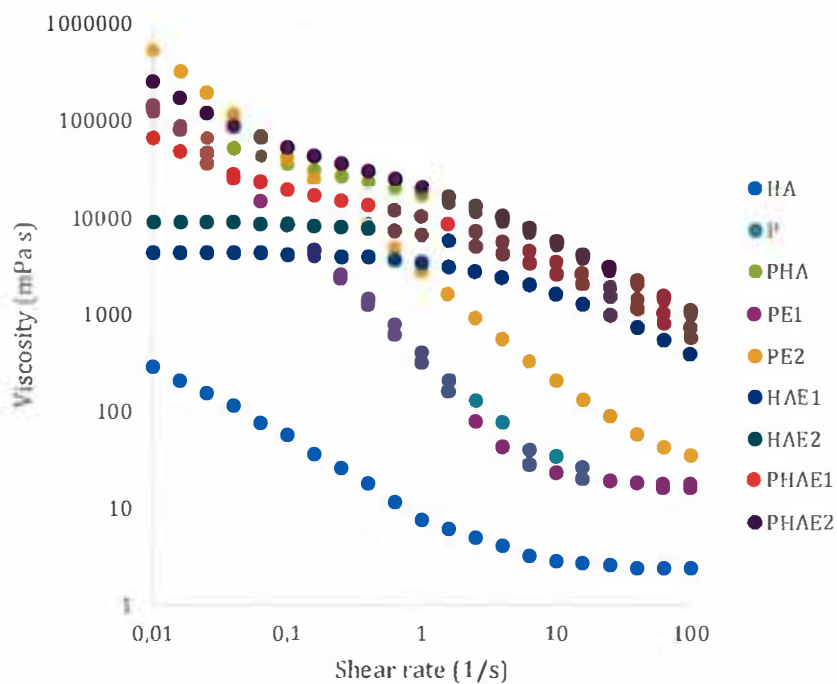
Slika 4.

Usporedba krivulja viskoznosti HA, P i PHA formulacija s analognim formulacijama s C ekstraktom (HAC, PC, PHAC). Mjerenja su provedena pri 32 °C; konus-ploča metoda.

Na slici 5. su prikazane krivulje viskoznosti uzoraka koji sadrže CA ekstrakte (E1 i E2) u koncentraciji od 5% u usporedbi s krivuljama viskoznosti samih P (10%) i HA (1%) te krivuljom viskoznosti kombiniranog PHA uzorka. Dodatak E1 u P (PE1) gotovo uopće ne mijenja ni vrijednosti niti profil viskoznosti samog P. Dodatak E2 u P (PE2) povećava viskoznost sustava i mijenja profil viskoznosti samog P. Ekstrakti E1 i E2 razlikuju se s obzirom na glicerol koji je prisutan u E2 ekstraktu.

Dodatak ekstrakata E1 i E2 u HA (PHAE1 i PHAE2) mijenja profil viskoznosti HA i vrijednosti viskoznosti su značajno veće. Na HAE1 i HAE2 profilima viskoznosti može se vidjeti plato viskoznosti (*zero shear viscosity*) kako se brzina smicanja približava nuli, odnosno idealno tečenje sustava. S povećanjem brzine smicanja viskoznost naglo opada.

Kad se ekstrakti kombiniraju s PHA sustavom (PHAE1 i PHAE2), ne mijenjaju značajno PHA profil viskoznosti. PHAE2 sustavi su u stanju mirovanja nešto viskozniiji od PHA dok su PHAE1 sustavi manje viskozni u stanju mirovanja od PHA sustava.



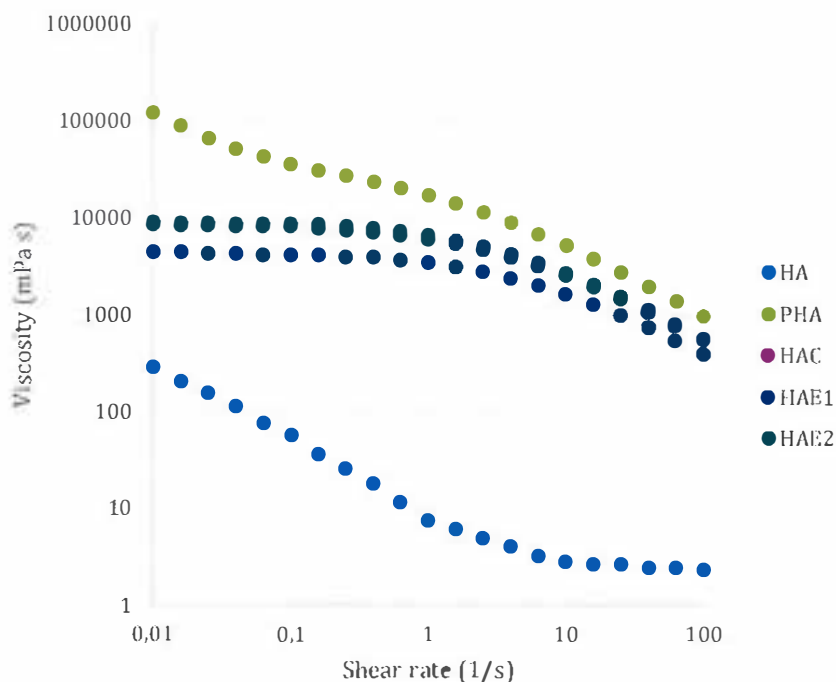
Slika 5.

Usporedba krivulja viskoznosti HA, P i PHA formulacija s analognim formulacijama s E1 ili E2 ekstraktom (HAE1, HAE2, PE1, PE2, PHAE1, PHAE2). Mjerenja su provedena pri 32 °C; konus-ploča metoda.

Može se zaključiti da kombiniranje HA bilo s P, C, E1 ili E2 značajno mijenja viskoznost i profil viskoznosti HA (slika 6.). Pritom najveću viskoznost pokazuju PHA uzorci u cijelom profilu viskoznosti, te time i najveću čvrstoću.

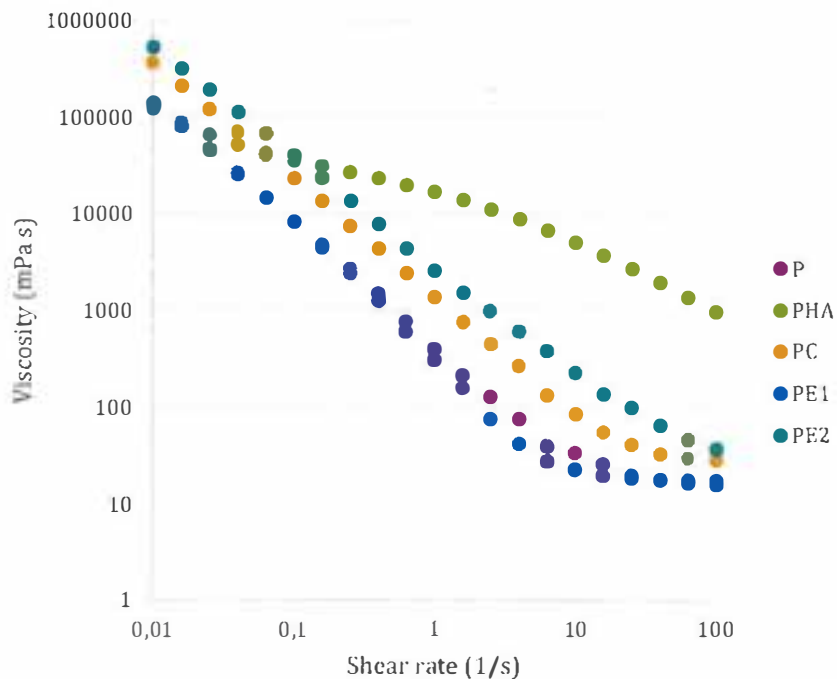
Profili viskoznosti HAC i HAE2 uzoraka su gotovo identični, a HAE1 profil pokazuje nešto manje vrijednosti viskoznosti od oba. E1 ekstrakt ne sadrži glicerol, za razliku od E2 i C ekstrakata, pa se može zaključiti da su HAC i HAE2 uzorci viskozniji/čvršći od HAE1 uzorka zbog glicerola.

Krivulja i vrijednosti viskoznosti PHA i P uzoraka značajno su različite pri većim smičnim napreznjima, dok su u stanju mirovanja i jako malim smičnim napreznjima gotovo jednake (slika 7.). Krivulje viskoznosti PE1 i P uzoraka se gotovo ne razlikuju, pa se može zaključiti da ekstrakt E1 (bez glicerola) ne utječe na viskoznost P. Viskoznosti PE2 uzorka su u stanju mirovanja i pri malim smičnim napreznjima značajno veće od P i PE1, ali i od PHA, dok su pri većim smičnim napreznjima manje od PHA te i dalje veće od P i PE1. Isto vrijedi i za PC uzorak s tim da je u cijelom profilu manje viskozan od PE2.



Slika 6.

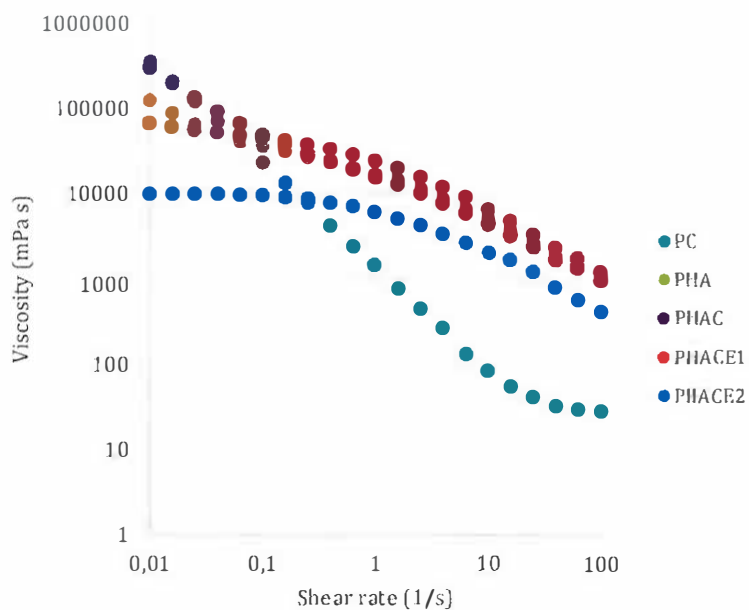
Usporedba krivulja viskoznosti HA formulacije s analognim formulacijama s P te C, E1 ili E2 ekstraktom (PHA, HAC, HAE1, HAE2). Mjerenja su provedena pri 32 °C; konus-ploča metoda.



Slika 7.

Usporedba krivulja viskoznosti P formulacija s analognim formulacijama s HA te C, E1 ili E2 ekstraktom (PHA, PC, PE1, PE2). Mjerenja su provedena pri 32 °C; konus-ploča metoda.

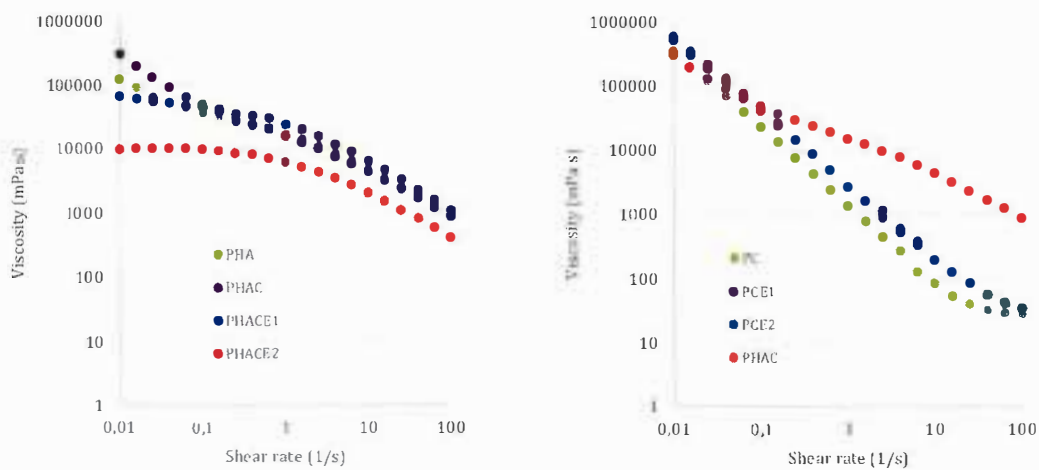
Profili viskoznosti PHACE1 i PHACE2 sustava u usporedbi s PHA, PC i PHA su prikazani na slici 8.



Slika 8.

Usporedba krivulja viskoznosti PHA i PC uzoraka s analognim uzorcima s C, CE1 ili CE2 ekstraktom (PHAC, PHACE1, PHACE2). Mjerenja su provedena pri 32 °C; konus-ploča metoda.

Profili viskoznosti formulacija sa i bez hijaluronske kiseline značajno se razlikuju. PHACE1 i PHACE2 profili viskoznosti pokazuju plato viskoznosti (*zero shear viscosity*) kako se brzina smicanja približava nuli, odnosno idealno tečenje sustava. Pokazuju dakle isti profil viskoznosti kao HACE1 i HACE2 sustavi (slika 6.) te manju viskoznost u mirovanju i pri manjim smičnim naprezanjima od PC i PHAC. Tijekom cijelog profila je viskoznost PHACE2 manja od viskoznosti PHACE1. To bi upućivalo na zaključak da se povećanjem udjela glicerola smanjuje viskoznost sustava jer C i E2 sadrže glicerol. To vrijedi samo za kombinirane uzorke s HA (slika 9. lijevo). Kombinacija ekstrakata s glicerolom u sustavima bez HA, PCE2, ne utječe na profil niti vrijednosti viskoznosti (slika 9. desno).



Slika 9.

Usporedba krivulja viskoznosti PHA s analognim uzorcima s C, CE1 ili CE2 ekstraktom (PHAC, PHACE1, PHACE2) – lijevo te usporedba krivulja viskoznosti PC s analognim uzorcima s HA, CE1 ili CE2 ekstraktom (PHAC, PCE1, PCE2) – desno. Mjerenja su provedena pri 32 °C; konus-ploča metoda.

Temperatura faznog prijelaza, sol-gel temperatura, je jedan je od glavnih parametara koji treba procijeniti u temperaturno osjetljivim sustavima. Geliranje poloksamerskog sustava javlja se zbog geometrijske organizacije (pakiranja) micela nastalih dehidracijom blokova PPO, koja ovisi o temperaturi i kritičnoj koncentraciji micela (35–37).

Kvocjent elastičnog (G' ; modul pohrane) i viskoznog (G'' ; modul gubitka) modula ovisno o kutnoj frekvenciji (tj. vremenu trajanja deformacije) pokazuje prevladavajuća svojstva (elastična ili plastična) viskoelastičnog materijala.

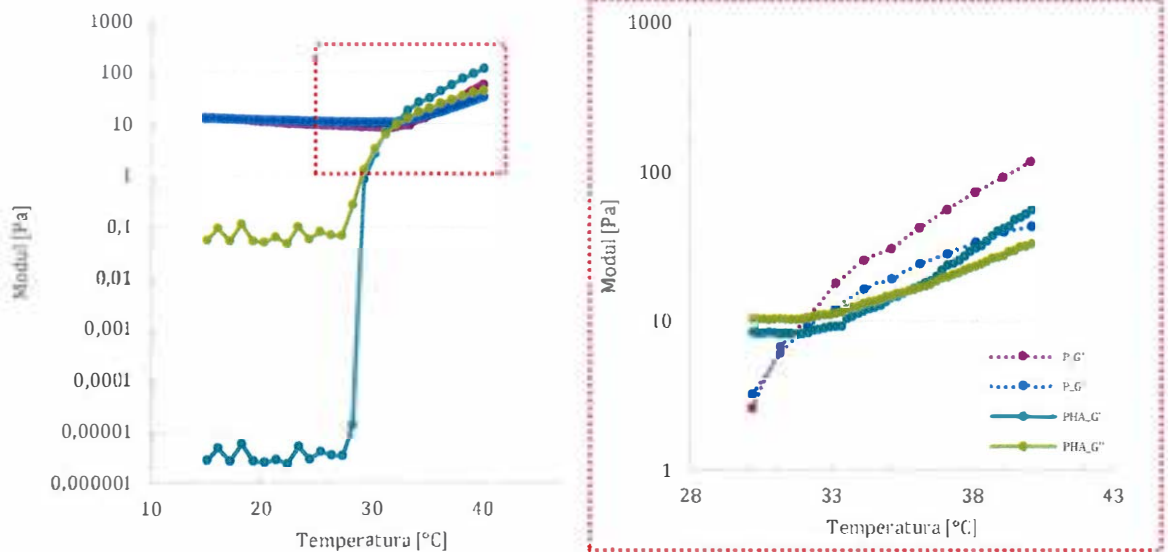
Temperatura sol-gel prijelaza poloksamerskih otopina je određena temeljem oscilacijskih reoloških mjerenja pri kutnoj brzini (frekvenciji) $\omega=1$ rad/s i napreznju $\gamma=0,1$ %. Temperatura

je povećavana za po 0,25°C u rasponu od 15-40 °C. Temperatura faznog prijelaza je definirana kao točka u kojoj se sijeku G' i G'' .

Sam P uzorak pokazuje dominantno viskozno ponašanje pri nižim temperaturama jer je modul gubitka (G'') veći od modula pohrane (G'). Iznad temperature geliranja ($T_{\text{sol-gel}} = 28,5 \text{ °C}$) gel pokazuje elastično ponašanje i pri temperature od 40 °C maksimalna vrijednost elastičnog modula (G') iznosi 115 Pa (Slika 10.).

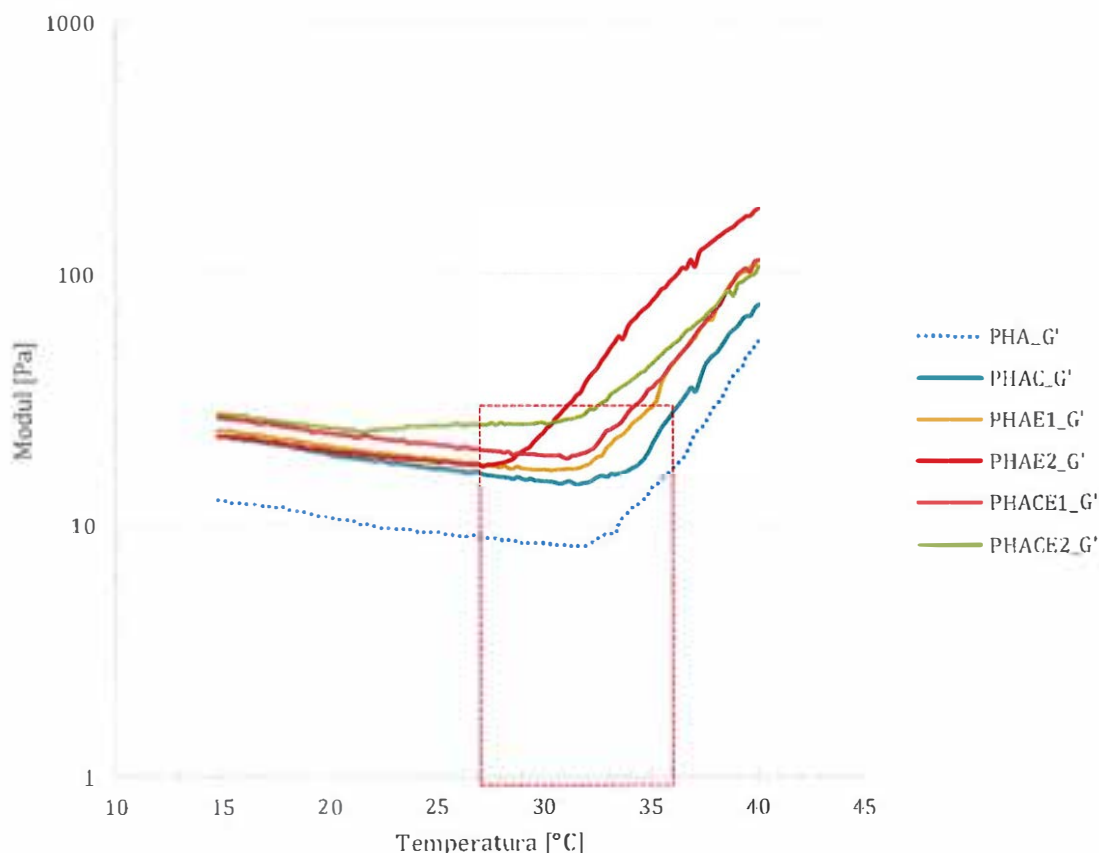
PHA uzorak također pokazuje viskozno ponašanje pri nižim temperaturama, čak bi se moglo reći da je pri temperaturama nižim od 20 °C unutarnje trenje neovisno o napreznanju. Iznad temperature geliranja ($T_{\text{sol-gel}} = 35,73 \text{ °C}$) gel pokazuje elastično ponašanje i pri temperature od 40 °C maksimalna vrijednost elastičnog modula (G') iznosi 55 Pa (Slika 10.).

Maksimalna vrijednost modula elastičnosti PHA gela je približno 2 puta manja od one P gela. Očekivali bismo upravo obrnutu situaciju s obzirom na literaturno potvrđenu interakciju između P i HA zbog koje nastaju veće micle i čvršći gelovi. Može se zaključiti da je PHA hidrogel viskoziji od P hidrogela pri nižim temperaturama, da mu je temperatura faznog prijelaza nešto viša te da pokazuje slično elastično ponašanje iznad $T_{\text{sol-gel}}$ kao i P.



Slika 10.

Promjena reoloških parametara, G' i G'' , P i PHA formulacija u ovisnosti o temperaturi. Temperatura pri kojoj se pojavljuje prijelaz iz sol u gel fazu je 27-35,9 °C. Oscilacijska reološka mjerenja (ploča-ploča metoda) provedena su pri kutnoj brzini (frekvenciji) $\omega=1 \text{ rad/s}$ i napreznanju $\gamma=0,1 \text{ %}$. Temperatura je povećavana za po 0,25°C u rasponu od 15-40 °C.



Slika 11.

Promjena reoloških parametara, G' i G'' , PHA formulacija s dodatkom ekstrakata u ovisnosti o temperaturi. Temperatura pri kojoj se pojavljuje prijelaz iz sol u gel fazu je 27-35,9 °C. Oscilacijska reološka mjerenja (ploča-ploča metoda) provedena su pri kutnoj brzini (frekvenciji) $\omega=1$ rad/s i naprežanju $\gamma=0,1$ %. Temperatura je povećavana za po 0,25 °C u rasponu od 15-40 °C.

PHA uzorci koji sadrže ekstrakte, PHAE1, PHACE1 I PHACE2 pokazuju oko 2 puta veće maksimalne vrijednosti elastičnog modula od PHA uzorka (slika 11.). Uzorak PHAC pokazuje 1,5 puta a uzorak gotovo 3,5 puta veću maksimalnu vrijednost elastičnog modula od PHA uzorka. Također se može vidjeti da dodatak ekstrakata u PHA uzorak mijenja temperaturu geliranja. Temperatura geliranja PHA je pri približno 35 °C, a $T_{\text{sol-gel}}$ uzoraka s ekstraktima kreće se u rasponu od 28-35 °C (slika). Najnižu $T_{\text{sol-gel}}$ pokazuje PHAE2 (27,35 °C) potom PHACE1 (28,56 °C). Uzorci PHAE1 (33,11 °C) i PHAC (35,18 °C) pokazuju neznatne promjene $T_{\text{sol-gel}}$ u odnosu na PHA. Uzorak PHACE2 karakterističan je po tome što u cijelom temperaturnom rasponu prevladava elastična komponenta, odnosno modul pohrane veći je od modula gubitka i krivulje se ne sijeku. Razlike između G' i G'' su veće pri temperaturama nižim od 22 °C i pri temperaturama iznad 32 °C.

Rezultati upućuju na zaključak da dodatak HA u P povećava mehaničku čvrstoću gelova bez značajne promjene $T_{sol-gel}$. Dodatak biljnih ekstrakata ne utječe značajno na čvrstoću gelova dok je $T_{sol-gel}$ nešto niža u gelova s ekstraktom E2, PHAE2 i s kombinacijom C i E1 ekstrakta, PHACE1. Vjerojatno se radi o utjecaju glicerola, kojeg sadrže ekstrakti C i E2, na svojstva geliranja P. Takav zaključak podupiru i rezultati dobiveni za PHACE2 uzorak, koji sadrži oba ekstrakta, koji se potpuno razlikuje od svih drugih uzoraka po reološkim svojstvima.

PROCJENA DJELOTVORNOSTI HIDRATACIJE *IN VIVO*

Analiza mikro-reljefa i kvantifikacija hidratacije su, uz mjerenje boje, najzanimljivija svojstva površine kože. Što se tiče topografije površine kože, najčešće korištena tehnika uključuje izradu replike površine kože koja se dodatno analizira profilometrijom (mehaničkom ili optičkom) ili analizom slike (38,39).

Stanje hidratacije rožnatog sloja epidermisa općenito se mjeri različitim uređajima, a sve se zasniva na mjerenju kapaciteta ili vodljivosti kože pri niskoj, srednjoj ili visokoj frekvenciji, s različitim vrstama elektroda primijenjenih odgovarajućim pritiskom (38,39).

Pomoću uređaja MoistureMap MM 100 može se odrediti distribucija vlage na površini kože i topografija kože odnosno gustoća i raspored sitnih linija.



Postavke senzora (oštrina, zatamnjenje i parametri kontrasta) mogu se samostalno mijenjati prema položaju kože na tijelu, uzimajući u obzir veliki raspon vrijednosti u dielektričkim svojstvima različitih pozicija kože (npr. koža lica prema koži na vrhu prsta). Slike kože u kontaktu s pločom senzora stječu se u realnom vremenu i automatski se prikazuju na zaslonu računala s povećanjem od 6 puta (17 inčni monitor, razlučivosti 1024x768). Za detaljnije opažanje, ovo povećanje može se pomnožiti s 2, 3 ili 4 (38).

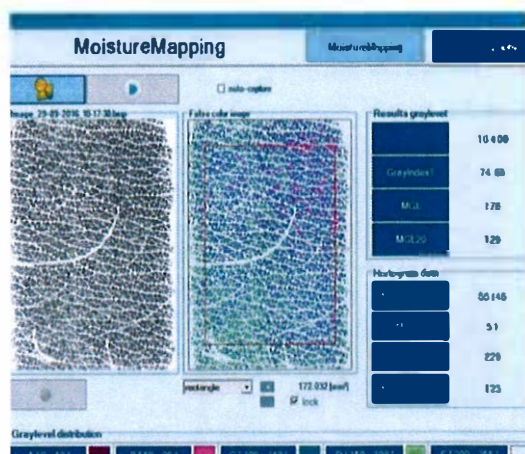
Kodiranje ovih slika (crno: visoki kapacitet i bijelo: niski kapacitet) omogućuje dobru kvalitativnu procjenu površine kože. Zbog rezolucije senzora (50 μm), ove slike predstavljaju

vrlo detaljne dijagrame topografije površine kože, kao i sadržaja vode unutar rožnatog sloja epidermisa.

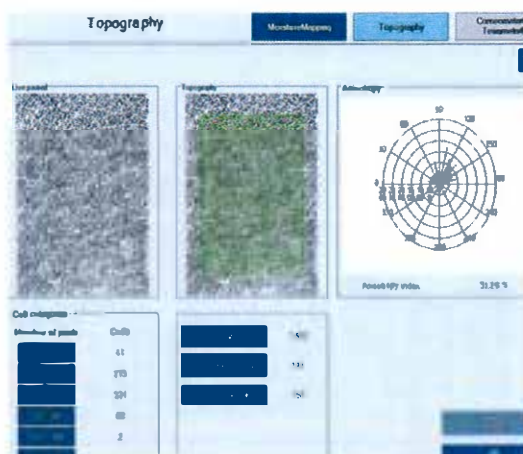
- 1) Distribucija vlage u rožnatom sloju kože mjeri se pomoću parametara:
 - a) *Gray Index* - veći broj indeksa znači veću distribuciju vlage u rožnatom sloju kože
 - b) *Gray index T* - veći broj znači veću vlažnost
 - c) *MeanGL (mean gray level)* - prosječna razina sivog na slici - manji broj znači veću vlažnost
 - d) *MeanGL20* - također indeks vlažnosti na osnovu razine sivog na slici (umanjen za 20 % bijelog u podlozi)

Topografija kože mjeri se parametrima koji govore o gustoći kože na osnovu broja i rasporeda malih linija u strukturi slike, njihovih smjerova i križanja, te broja stanica unutar tih križanja.

- 2) Parametri topografije kože su :
 - a) *Corner Density* - broj finih linija u svim smjerovima, broj njihovih križanja i njihova gustoća izražena u broju kutova/mm².
Mlada koža ima veću gustoću kutova.
 - b) *Anisotropy Index* - mlada koža trebala bi imati manji anizotropijski indeks (anizotropija = osobina nekih tijela da u različitim smjerovima imaju različita fizička svojstva); mlada koža pokazuje fine linije koje drže kožu u svim smjerovima (izotropiju). Starenjem nestaju fine linije i nastaju dublje linije i bore (veći indeks znači više dubljih bora, a manje finih linija). Linije koje uređaj prepoznaje označene su u zeleno. Oba parametra opisuju proces staranja kože .
 - c) *No of Cells* - mlada koža sa širokom mrežom finih linija u svim smjerovima, pokazuje više stanica unutar linija - klasificirani su u različite klase veličine piksela (mlada koža ima veći broj stanica u kategoriji malih, starija koža više zastupljenih u klasi velikih)



Mapiranje



Topografija

U istraživanje se uključilo ukupno 18 zdravih ispitanika s rasponom dobi od 20 do 65 godina starosti, bez prethodne bolesti kože, nakon što su dali svoj pisani pristanak. Ispitanici su upućeni da ne koriste kozmetičke proizvode dva tjedna prije i na dan pokusa, osim proizvoda za pranje poput sapuna. Prije svih mjerenja ispitanici su proveli u sobi najmanje 30 minuta kako bi se omogućila puna prilagodba kože na sobnu temperaturu (21 ± 2 °C) i relativnu vlažnost ($60\% \pm 5\%$).

Odabrana su područja (3-5) (svako od 9 cm²) na koži podlaktice obje ruke svakog dobrovoljca: jedno polje je služilo kao kontrola i na njega se nisu primjenjivali uzorci hidrogelova a na ostala područja su se primijenile različite formulacije.



Nanošenje uzorka

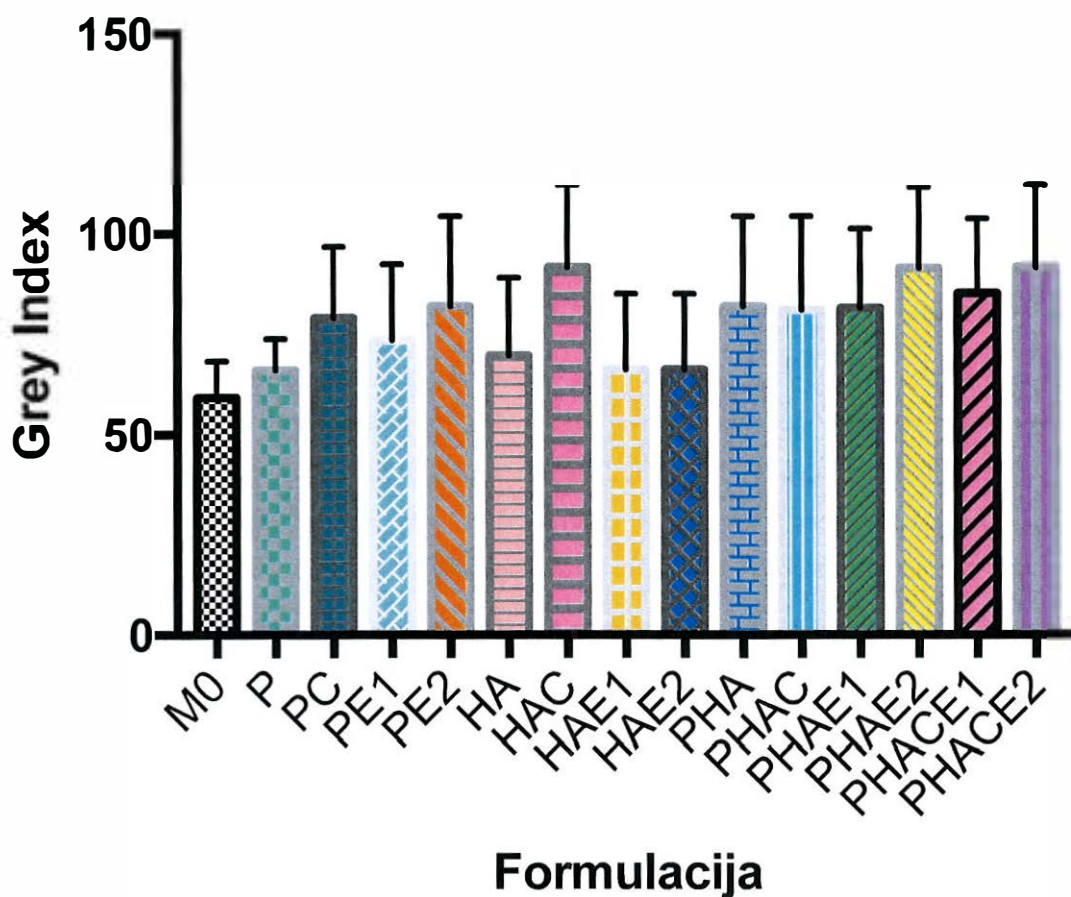


Nanošenje uzorka



Mjerenje

Rezultati mjerenja distribucije vlažnosti prikazani su na slici 12.



Slika 12.

Prikaz ovisnosti prosječnog parametra sive razine ekstrahiranog iz stupnja sivog svake slike MoistureMap MM100 kože podlaktice ispitanika o vrsti primijenjene formulacije. Za svaku formulaciju je prikupljeno 80 slika, odnosno provedeno 80 mjerenja. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD.

Sve formulacije hidrogelova pokazuju značajno veće vrijednosti indeksa sivog u odnosu na kontrolu (M0). Hidrogel samog poloksamera 407, P, pokazuje značajno bolja svojstva hidratacije u odnosu na kontrolu, dok razlike između P i HA te P i PE1 nisu statistički značajne. Kombinacija HA i C pokazuje značajno bolja svojstva hidratacije u odnosu na HA, HAE1 i HAE2 hidrogelove. Kombinirani, PHA, hidrogel pokazuje značajno bolja svojstva hidratacije od HA gela. Dodatak ekstrakata C ili E1 ne mijenja značajno svojstva PHA hidrogela dok dodatak E2 ekstrakta (PHAE2) značajno poboljšava svojstva hidratacije u odnosu i na P, HA i PHA hidrogelove.

Najbolja svojstva hidratacije pokazuju redom PHACE2, PHAE2, HAC hidrogelovi, dakle kombinacija ekstrakta CA s glicerolom (E2) i kombinacija same HA s ekstraktom crvene alge (C).

ZAKLJUČCI

Pripravljeno je 11 formulacija hidrogelova kombiniranjem poloksamera 407 (10 % P) i hijaluronske kiseline (1 % HA) s dodatkom različitih ekstrakata, *Coralline extract*, *Phytoliquid Centella P* i *Phytexcell Centella Asiatica* (5 %; C, E1 i/ili E2). Za usporebu su pripravljene formulacije (5) sačinjene od 1 % HA s dodatkom 5 % C, E1 i/ili E2 i formulacije samih 10 % P i 1 % HA.

Veličina čestica se u formulacijama P i PHA kreće između 18 i 50 nm. Formulaciji samog poloksamera je izmjerena veličina micela od $23,9 \pm 6,1$ (PDI = $0,649 \pm 0,014$). PHA formulaciji je izmjerena veličina micela od ≈ 50 nm što je ujedno najveća izmjerena vrijednost. Dodatak ekstrakata utječe na strukturu micela i to izraženije na PHA nego na P formulacije.

Svim se formulacijama viskoznost smanjuje s povećanjem brzine smicanja, odnosno svi su sustavi pri 32 °C i niskom smičnom naprezanju gelovi. Čvrstoća P gelova se povećava s povećanjem koncentracije. Kombiniranjem P i HA nastaje gel koji, pri niskim brzinama smicanja ima sličnu viskoznost kao P gel ali je pri većim brzinama smicanja viskoznost a time i čvrstoća kombiniranog gela značajno veća od viskoznosti samog P gela.

Dodatak HA u P povećava mehaničku čvrstoću gelova bez značajne promjene $T_{sol-gel}$. Dodatak biljnih ekstrakata ne utječe značajno na čvrstoću gelova dok je $T_{sol-gel}$ nešto niža u gelova s ekstraktom E2, PHAE2 i s kombinacijom C i E1 ekstrakta, PHACE1. Vjerojatno se radi o utjecaju glicerola, kojeg sadrže ekstrakti C i E2, na svojstva geliranja P. Takav zaključak podupiru i rezultati dobiveni za PHACE2 uzorak, koji sadrži oba ekstrakta, koji se potpuno razlikuje od svih drugih uzoraka po reološkim svojstvima.

Sve formulacije hidrogelova pokazuju značajno veće vrijednosti indeksa sivog u odnosu na kontrolu (M0). Najbolja svojstva hidratacije pokazuju redom PHACE2, PHAE2, HAC hidrogelovi, dakle kombinacija ekstrakta CA s glicerolom (E2) i kombinacija same HA s ekstraktom crvene alge (C).

Kombiniranjem poloksamera 407 i hijaluronske kiseline s dodatkom ekstrakata biljke *Centella asiatica* i/ili ekstrakta crvene alge, *Coralline extract* mogu se pripraviti stabilni i kozmetički prihvatljivi temperaturno osjetljivi hidrogelovi s povoljnim učinkom hidratacije kože.

LITERATURA

1. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol*. 2012;30(3):257–62.
2. Elias PM. Skin barrier function. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2008;8(4):299–305.
3. Rawlings AV., Harding CR. Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther*. 2004;17(s1):43–8.
4. Lodén M. Treatments Improving Skin Barrier Function. *Curr Probl Dermatology*. 2016;49:112–22.
5. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: A review. *Int J Cosmet Sci*. 2008;30(2):87–95.
6. Naylor EC, Watson REB, Sherratt MJ. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas*. 2011;69(3):249–56.
7. Bugaj AM. Intradermal Delivery of Active Cosmeceutical Ingredients. In: Donnelly RF, Singh TRR, editors. *Novel Delivery Systems for Transdermal and Intradermal Drug Delivery*. Wiley; 2015. p. 209–30.
8. Almond A. Hyaluronan. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(13):1591–6.
9. Li Z, Guan J. Thermosensitive hydrogels for drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2011;8(8):991–1007.
10. Jeong B, Kim SW, Bae YH. Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64:154–162.
11. Lee SG, Kim SR, Cho HI, Kang MH, Yeom DW, Lee SH, et al. Hydrogel-Based Ultra-moisturizing Cream Formulation for Skin Hydration and Enhanced Dermal Drug Delivery. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(10):1674–82.
12. Ullah F, Othman MBH, Javed F, Ahmad Z, Akil HM. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Mater Sci Eng C*. 2015;57:414–33.
13. Wang W, Wat E, Hui PCL, Chan B, Ng FSF, Kan CW, et al. Dual-functional transdermal drug delivery system with controllable drug loading based on thermosensitive poloxamer hydrogel for atopic dermatitis treatment. *Sci Rep*. 2016;6:24112.
14. Quattrone A, Czajka A, Sibilla S. Thermosensitive Hydrogel Mask Significantly Improves Skin Moisture and Skin Tone; Bilateral Clinical Trial. *Cosmetics*. 2017;4(2):17.
15. Bylka W, Znajdek-Awizeń P, Studzińska-Sroka E, Brzezińska M. Centella asiatica in cosmetology. *Postep Dermatologii i Alergol*. 2013;30(1):46–9.
16. Ratz-Łyko A, Arct J, Pytkowska K. Moisturizing and Antiinflammatory Properties of Cosmetic Formulations Containing Centella asiatica Extract. *Indian J Pharm Sci*. 2016;78(1):27–33.
17. Jung Y seok, Park W, Park H, Lee DK, Na K. Thermo-sensitive injectable hydrogel based on the physical mixing of hyaluronic acid and Pluronic F-127 for sustained NSAID delivery. *Carbohydr Polym*. 2017;156:403–8.
18. Yang Y, Liu D, Wu J, Chen Y, Wang S. In vitro antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Corallina officinalis*. *Int J Biol Macromol*. 2011;49(5):1031–7.
19. Brinkhaus B, Lindner M, Schuppan D, Hahn EG. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. *Phytomedicine*. 2000;7(5):427–48.
20. Prakash V, Jaiswal N, Srivastava M. A REVIEW ON MEDICINAL PROPERTIES OF CENTELLA ASIATICA. *Asian J Pharm Clin Res*. 2017;10(10):69.
21. Healthcare_Council_of_Europe., European_Pharmacopoeia_Commission, European_Directorate_for_the_Quality_of_Medicines. *European Pharmacopoeia 9.0*. Strasbourg : Council Of Europe : European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, ©2010-. 2017.
22. Coldren CD, Hashim P, Ali JM, Oh S-K, Sinskey AJ, Rha C. Gene expression changes in the human fibroblast induced by *Centella asiatica* triterpenoids. *Planta Med*. 2003;69(8):725–32.

23. An IS, An S, Choe TB, Kang SM, Lee JH, Park IC, et al. Centella asiatica protects against UVB-induced HaCaT keratinocyte damage through microRNA expression changes. *Int J Mol Med*. 2012;30(6):1349–56.
24. Kim YJ, Cha HJ, Nam KH, Yoon Y, Lee H, An S. Centella asiatica extracts modulate hydrogen peroxide-induced senescence in human dermal fibroblasts. *Exp Dermatol*. 2011;20(12):998–1003.
25. Lu L, Ying K, Wei S, Fang Y, Liu Y, Lin H, et al. Asiaticoside induction for cell-cycle progression, proliferation and collagen synthesis in human dermal fibroblasts. *Int J Dermatol*. 2004;43:801–807.
26. Paocharoen V. The efficacy and side effects of oral Centella asiatica extract for wound healing promotion in diabetic wound patients. *J Med Assoc Thai*. 2010;93(SUPPL 7).
27. Chiummariello S, De Gado F, Monarca C, Ruggiero M, Carlesimo B, Scuderi N, et al. [Multicentric study on a topical compound with lymph-draining action in the treatment of the phlebostatic ulcer of the inferior limbs]. *G Chir*. 2009;30(11–12):497–501.
28. Saeidinia A, Keihanian F, Lashkari AP, Lahiji HG, Mobayyen M, Heidarzade A, et al. Partial-thickness burn wounds healing by topical treatment: A randomized controlled comparison between silver sulfadiazine and centiderm. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(9):e6168.
29. Narayanaswamy R, Ismail IS. Cosmetic potential of Southeast Asian herbs: an overview. *Phytochem Rev*. 2015;14:419–428.
30. Bylka W, Znajdek-Awizeń P, Studzińska-Sroka E, Dańczak-Pazdrowska A, Brzezińska M. Centella asiatica in dermatology: An overview. *Phyther Res*. 2014;28:1117–1124.
31. Joshi K, Chaturvedi P. Therapeutic efficiency of Centella asiatica (L.) Urb. An underutilized green leafy vegetable: An overview. *Int J Pharma Bio Sci*. 2013;4(1):135–49.
32. Choochuay K, Sawatdee S, Chanthorn W, Gnanapragasam A, Kumar Ebenezer K, Sathish V, et al. Asiaticoside-induced elevation of antioxidant levels in healing wounds. *J Ethnopharmacol*. 2012;13(1):50–4.
33. Delbo M, Calapai G. Assessment report on Centella asiatica (L.) Urban, herba. *Eur Med Agency*. 2010;1–44.
34. Akash MSH, Rehman K, Chen S. Pluronic F127-based thermosensitive gels for delivery of therapeutic proteins and peptides. *Polym Rev*. 2014;54(4):573–97.
35. Batrakova E V., Kabanov A V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J Control Release*. 2008;130(2):98–106.
36. Vadnere M, Amidon G, Lindenbaum S, Haslam JL. Thermodynamic studies on the gel-sol transition of some pluronic polyols. *Int J Pharm*. 1984;22(2–3):207–18.
37. Kabanov A V, Batrakova E V, Alakhov VY. Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J Control Release*. 2002;82(2–3):189–212.
38. Lévêque JL, Querleux B. SkinChip®, a new tool for investigating the skin surface in vivo. *Ski Res Technol*. 2003;9(4):343–7.
39. Darlenski R, Sassning S, Tsankov N, Fluhr JW. Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009;72(2):295–303.