



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Ivona Tomić

**RAZVOJ FUNKCIONALNOGA
HIDROGELA S NANOKRISTALIMA
AZELATNE KISELINE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Ivona Tomić

**RAZVOJ FUNKCIONALNOGA
HIDROGELA S NANOKRISTALIMA
AZELATNE KISELINE**

DOKTORSKI RAD

Mentorica: prof. dr. sc. Jelena Filipović-Grčić

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Ivona Tomić

**DEVELOPMENT OF A FUNCTIONAL
HYDROGEL WITH AZELAIC ACID
NANOCRYSTALS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Prof. Jelena Filipović-Grčić

Zagreb, 2021.

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

Rad je izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Jelene Filipović-Grčić. Dio eksperimenata proveden je u PLIVA Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj te u Klinici za kožne i spolne bolesti Sveučilišne kliničke bolnice u Mostaru.

ZAHVALE

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Jeleni Filipović-Grčić na nesebično prenesenom znanju i stručnoj pomoći tijekom izrade ovog doktorskog rada. Draga mentorice, hvala Vam na podršci, strpljivosti i razumijevanju te na svim savjetima koje ste mi dali tijekom mog znanstvenog razvoja.

Od srca se zahvaljujem prof. dr. sc. Dubravki Šimić na susretljivosti, korisnim savjetima i pomoći u izradi ovog doktorskog rada. Draga profesorice, iznimna je čast bila raditi s Vama. Hvala Vam na svemu.

Hvala svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu što su me srdačno primili i uz koje je moj boravak na Zavodu bio ugodniji i ljepši. Veliko hvala prof. dr. sc. Mariu Jugu i izv. prof. dr. sc. Ivanu Pepiću na svim konstruktivnim savjetima i pomoći tijekom izrade ovog doktorskog rada. Hvala tehničarki Vlatki Maričić koja je s osmjehom na licu bila spremna pomoći kad god je trebalo. Dodatno se zahvaljujem kolegicama iz ureda, Biseri, Sabini, Lauri, Zori i Maji s kojima sam provela najviše vremena i ostvarila najljepše uspomene.

Hvala svim djelatnicima PLIVA Hrvatska koji su mi na bilo koji način pomogli, na ugodnoj i prijateljskoj atmosferi, a posebno Sandri Miočić i dr. sc. Marini Juretić.

Hvala mojim kolegicama i kolegama na Farmaceutskom fakultetu Sveučilišta u Mostaru, Mirjani, Aneli, Franji, Josipi, Martinu, Igoru i Marti s kojima sam proživjela mnogo lijepih trenutaka od studentskih dana do danas. S vama je radna atmosfera u našim malim uredima uvijek ugodna i pozitivna.

Neizmjernu zahvalnost dugujem svojim roditeljima i braći na bezuvjetnoj ljubavi i velikoj podršci. Mama, tata, Ivane i Domagoj, hvala vam što ste mi bili najveći oslonac ne samo tijekom izrade ovog doktorskog rada, nego tijekom cijelog mog života.

„Majka je ona koja može zauzeti mjesto svih drugih, ali čije mjesto ne može zauzeti nitko drugi“

-Cardinal Mermillod

*Najveću zahvalnost dugujem svojoj majci koja je u mom srcu bila i ostat će nezamjenjiva.
Mama, hvala ti!*

Hvala mom Slavenu što je bio uz mene na ovom putu, na bezgraničnom strpljenju, podršci i na svim toplim riječima u trenucima kada je bilo najteže. Hvala ti na stalnoj vjeri u mene, proživljavanju padova i na kraju dijeljenju radosti.

Hvala mojim bakama i djedovima što brižno koračaju uz mene. S njima sam provela najljepše dane svoga djetinjstva koji će zauvijek ostati u mom sjećanju. Hvala vam na velikoj ljubavi koju mi nesebično pružate.

Hvala cijeloj mojoj rodbini i prijateljima što su mi bili velika podrška. Posebno hvala mojoj tetki i kumi Dubravki i rođici Danijeli što su moje dane provedene u Zagrebu učinile nezaboravnim.

SAŽETAK

Azelatna kiselina (AZA) topikalno se primjenjuje u liječenju vulgarne akne (VA), rozaceje i hiperpigmentacija kože. Cilj ovog rada bio je ispitati može li se AZA nanonizirati metodom vlažnog mljevenja i uklopiti u hidrogel za topikalnu primjenu namijenjen liječenju indiciranih kožnih bolesti. AZA je uspješno nanonizirana metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja s malim udjelom, 0,3 % (*m/m*) površinski aktivne tvari, polisorbata 60, P60. Veličina nanokristala AZA u optimiranoj nanosuspenciji, leNS-AZA, iznosila je $59,2 \pm 3,8$ nm (PDI $0,142 \pm 0,112$). Uzorci nanosuspencija prevedeni su u suhi oblik, leLNS-AZA, liofilizacijom te su karakterizirani s obzirom na termička svojstva i intrinzičnu brzinu otapanja i uklapani u hidrogelove, leLNS-AZA-PHA, koji su pripremljeni mehaničkim miješanjem Pluronic[®]-a F-127 (10-20 %, *m/m*) (P) i hijaluronske kiseline (1 %, *m/m*) (HA) (PHA hidrogel) u količini koja odgovara masenom udjelu od 10 % AZA. Hidrogelovima su određena reološka svojstva, brzina oslobađanja AZA *in vitro* te penetracija AZA u rožnati sloj kože *in vivo*. Termičkom analizom je potvrđena kristalna struktura AZA u leLNS-AZA uzorcima s udjelom od oko 13 % amorfne strukture. Potvrđena je i interakcija nanokristala AZA s P60. Nanonizacijom je postignuto povećanje brzine otapanja leLNS-AZA u odnosu na neprocesuirani oblik AZA, npAZA, od 36,0 %, a 16,4 % u odnosu na liofilizirani oblik suspencije npAZA i polisorbata 60, L-npAZA. Povećanjem koncentracije P povećavala se viskoznost leLNS-AZA-PHA hidrogelova i smanjivala temperatura faznog prijelaza ($T_{sol-gel}$). Postotni udio oslobođene AZA iz leLNS-AZA-PHA hidrogelova bio je približno 10 puta veći u odnosu na komercijalno dostupnu Skinoren[®] kremu dok je brzina oslobađanja AZA iz hidrogelova bila neovisna o udjelu P. Koncentracijski profili ovisnosti količine AZA po jediničnoj površini o dubini penetracije u rožnati sloj kože uzoraka hidrogela leLNS-AZA-PHA-15 i leLNS-AZA-PHA-20 gotovo su identični s profilom Skinoren[®] kreme. Hidrogelu s udjelom P od 15 % (*m/m*), HA od 1 % (*m/m*) i AZA od 10 % (*m/m*) u obliku nanokristala procijenjena je učinkovitost u odnosu na Skinoren[®] kremu u bolesnika s blagim do umjerenim oblikom VA na koži lica. U tu svrhu nanosuspencija AZA pripravljena je metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja, heNS-AZA, s veličinom nanokristala AZA od $148,1 \pm 6,5$ nm (PDI $0,399 \pm 0,020$) te uspješno prevedena u suhi oblik, heLNS-AZA, liofilizacijom i uklopljena u PHA hidrogel, heLNS-AZA-PHA. Teksturnom analizom je određena čvrstoća heLNS-AZA-PHA hidrogela od $510,8 \pm 20$ g uz rad pri opterećenju silama smicanja od $467,9 \pm 28$ g s što ukazuje na prikladnu razmazivost hidrogela. U provedenom randomiziranom, dvostruko-slijepom kliničkom ispitivanju potvrđena je bolja ili jednaka učinkovitosti heLNS-AZA-PHA hidrogela u liječenju VA i rozaceje u odnosu na Skinoren[®] kremu.

Ključne riječi: azelatna kiselina, nanokristali, hidrogel, akne, rozaceja, topikalna primjena

SUMMARY

Introduction: Azelaic acid (AZA) is a saturated, straight-chain dicarboxylic acid produced naturally by *Malassezia furfur*. It possesses antibacterial activity against *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) and *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), anti-inflammatory activity due to its scavenging activity of oxygen free radicals and keratolytic activity. In addition, AZA competitively inhibits tyrosinase, DNA synthesis and mitochondrial enzymes. Therefore, it is an effective agent for the topical treatment of mild to moderate acne vulgaris, rosacea, and postinflammatory hyperpigmentation such as solar lentigo, melasma, etc. AZA is a diprotic acid with pKa values of 4.53 and 5.33 and has limited solubility in water (≈ 0.24 g in 100 g water at 25 °C). Since AZA is poorly soluble in water and is present in registered and commercial formulations at high concentrations, nanonization and increase in water solubility and dissolution rate is expected to increase dermal availability. This could lead to therapeutic effect at lower doses and less severe side effects after topical administration. In order to improve penetration through the stratum corneum and dermal bioavailability and thus therapeutic efficacy and reduction of side effects, numerous therapeutic systems such as microemulsion systems, liquid crystals, lipid nanovesicles, ethosomes and cyclodextrins have been investigated. However, no published work on the development of AZA nanocrystals was found in the available literature. Nanocrystals are nanosized drug particles with increased water solubility and dissolution rate compared to larger materials. Nanonization of AZA may enable its incorporation into hydrophilic substrates such as hydrogels, which are more suitable for the treatment of acne and rosacea, for which AZA is indicated, and contribute to better patient adherence and treatment outcomes. Hydrogels, three-dimensional polymer networks with high water content whose properties depend on the physiological conditions at the site of application (*in situ*), allow controlled and targeted delivery of the active ingredient while increasing efficacy and reducing side effects. In addition, they can improve the efficacy of topical drugs and are suitable for the incorporation of drug nanocrystals.

Methods: AZA nanocrystal suspensions consisting of AZA (2.0 %, w/w) and polysorbate 60 (P60) (0.3-2.0 %, w/w) were prepared using a low-energy wet milling technique. The average particle size and polydispersity index (PDI) of the obtained nanocrystal suspensions were determined by photon correlation spectroscopy (PCS). The optimum AZA nanocrystal suspension was selected for further studies and freeze-dried. The thermal properties of AZA were analyzed by differential scanning calorimetry (DSC) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Intrinsic dissolution rate test was performed using Intrinsic Dissolution Apparatus and tested in a degassed phosphate buffer. Hydrogels were prepared by mechanical

mixing of Pluronic[®] F-127 (P) at different concentrations (10, 15 and 20 %, w/w) and hyaluronic acid (HA) at a constant concentration (1 %, w/w) (PHA hydrogels), into which AZA was incorporated in the form of lyophilisate of AZA nanocrystal suspensions prepared by low-energy wet milling technique (leLNS-AZA) in an amount corresponding to a mass fraction of 10 %. Hydrogels were prepared using a FagronLab[™] unguator. Rheological tests were performed to evaluate the potential of spreading and coverage of the formulation on the skin, as well as the residence time on the skin surface and the increase in bioavailability of the drug nanocrystals. The release rate of AZA from the hydrogels was determined using Enhancer[™] cell. To gain insight into the AZA concentration profiles within the stratum corneum after application of selected hydrogel formulations, the tape stripping method was used. Quantitative determination of AZA from the intrinsic dissolution rate study, the *in vitro* release study, and the tape stripping study was performed using high-performance liquid chromatography (HPLC), with the HPLC method developed specifically as part of this dissertation. Finally, a texture analysis was performed and the efficacy of the hydrogel loaded with AZA nanocrystals in the treatment of mild to moderate acne vulgaris and papulopustular rosacea was evaluated in a double-blind and randomized clinical trial. For this purpose, it was necessary to increase the production of nanocrystals, and AZA nanocrystal suspension was prepared using a high-energy wet milling technique (heNS-AZA). The heNS-AZA suspensions consisted of AZA (5.0 %, w/w) and P60 (0.3 %, w/w). The average particle size and PDI of the obtained nanocrystal suspensions were determined by PCS and freeze-dried. The freeze-dried form of AZA nanocrystal suspensions prepared by high-energy wet milling technique (heLNS-AZA) in an amount corresponding to a mass fraction of 10 % AZA was incorporated into a hydrogel consisting of 15 % (w/w) P and 1 % (w/w) HA.

Results: The particle size of AZA nanocrystal suspension prepared by low-energy wet milling technique was 38-120 nm after 24 h of milling. The concentration of P60 in the AZA nanocrystal suspensions affected the size of AZA nanocrystals. The smallest nanocrystal size (38.3±1.3 nm, PDI 0.264±0.042) was obtained by applying the highest concentration of P60 (2.0 %, w/w). After reconstitution of the selected leLNS-AZA sample prepared by low-energy wet media milling, the size of AZA nanocrystals was 117.3±2.4 nm (PDI 0.363±0.102) compared to the original 59.2±3.8 nm (PDI 0.142±0.112). DSC analysis confirmed the crystalline form of AZA and also that the milling process did not affect the properties of AZA in the solid state. The results were also confirmed by FTIR spectroscopic analysis. The intrinsic dissolution rate was tested on: (i) the unprocessed form of AZA (npAZA), (ii) the

lyophilized form of the suspension of npAZA and P60 (L-npAZA), and (iii) the lyophilized form of the AZA nanocrystal suspension prepared by low-energy wet milling technique (leLNS-AZA). The highest intrinsic dissolution rate was obtained with the leLNS-AZA sample. Rheological characterization confirmed that the hydrogels were viscous gels at 15 and 20 % (w/w) P at a physiological skin surface temperature. The sol-gel phase transition of the hydrogel with 20 % (w/w) P occurs at a temperature lower than 20 °C, and that of the hydrogel with 15 % (w/w) P occurs at \approx 25 °C. The viscosity of the hydrogel is increased by increasing the P concentration, and the effect of HA on the viscosity of the formulation increases with decreasing P concentration in the system. Incorporation of AZA nanocrystals into the PHA hydrogels did not result in any change in the viscosity of the hydrogels. Examination of the profile of modules G' and G'' as a function of angular frequency showed an increase in their values due to an increase in the concentration of P in the system. An *in vitro* release study of AZA nanocrystals from hydrogels showed that the percentage of AZA released from the tested samples of hydrogels with AZA nanocrystals was about 10 times higher than commercially available Skinoren[®] cream. An *in vivo* study of AZA penetration into the stratum corneum of the skin showed that both the leLNS-AZA-PHA hydrogels with the 15 and 20 % (w/w) concentrations of P had stratum corneum penetration depth and amount of drug penetrated in the same range and were comparable to commercially available Skinoren[®] cream at the same dosage. The particle size of AZA nanocrystal suspension prepared by high-energy wet milling technique was almost the same after 3 h and 4 h of milling. The particle size of AZA nanocrystals was 148.1 \pm 6.5 nm (PDI 0.399 \pm 0.020) after 3 h of milling and 144.8 \pm 4.7 nm (PDI 0.365 \pm 0.007) after 4 h of milling. After reconstitution of the selected leLNS-AZA sample prepared by high-energy wet milling technique, the size of AZA nanocrystals was 269.9 \pm 14.8 nm (PDI 0.426 \pm 0.031) compared to the original 148.1 \pm 6.5 nm (PDI 0.399 \pm 0.020). The texture analysis of the PHA hydrogel with incorporated leLNS-AZA showed that the strength and shear work of the hydrogel were 510.8 \pm 2.0 g and 467.9 \pm 28.0 g s, indicating that the strength of the hydrogel is low and it can spread at low shear. The strength and shear work of Skinoren[®] cream were 3050.6 \pm 61.0 g and 1079.0 \pm 20.8 g s. Evaluation of the efficacy of hydrogels loaded with AZA nanocrystals in patients with acne vulgaris and rosacea showed a better or equal effect in reducing the number of papules, pustules, erythema, or telangiectasia compared to double dosage commercial Skinoren[®] cream.

Conclusion: The study confirmed the potential of PHA hydrogel loaded with AZA nanocrystals for dermal delivery in the treatment of indicated skin conditions, acne vulgaris, and rosacea. PHA hydrogel as an AZA delivery platform showed suitable rheological properties, AZA *in vitro* release profile and AZA *in vivo* penetration profile into the stratum corneum. A formulation consisting of 15 % (w/w) P, 1 % (w/w) HA and 10 % (w/w) AZA nanocrystals exhibited the desired textural properties and efficacy in the treatment of the above skin disease, which was confirmed by a clinical study.

Key words: azelaic acid, nanocrystals, hydrogel, acne, rosacea, topical drug delivery

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. AZELATNA KISELINA	2
1.2. PRIMJENA LIJEKOVA NA KOŽU	4
1.3. NANOKRISTALI DJELATNE TVARI	6
1.4. SVOJSTVA NANOKRISTALA DJELATNE TVARI.....	8
1.5. METODE IZRADE NANOKRISTALA DJELATNE TVARI	10
1.5.1. Metode smanjenja veličine čestica djelatne tvari	10
1.5.2. Metode povećanja veličine čestica djelatne tvari	14
1.5.3. Kombinirana metoda	16
1.6. RAZVOJ NANOKRISTALA DJELATNE TVARI	21
1.7. HIDROGELOVI	24
1.8. POLOKSAMERI.....	25
1.9. HIJALURONSKA KISELINA	27
2. OBRAZLOŽENJE TEME	28
3. MATERIJALI I METODE	31
3.1. MATERIJALI	32
3.2. METODE	33
3.2.1. Izrada suspenzije nanokristala AZA.....	33
3.2.2. Određivanje veličine čestica i indeksa polidisperznosti AZA nanosuspenzija.....	34
3.2.3. Sušenje smrzavanjem	35
3.2.4. Termička analiza	36
3.2.5. Izrada hidrogelova.....	37
3.2.6. Ispitivanje intrinzične brzine otapanja AZA	39
3.2.7. Reološka karakterizacija hidrogelova.....	39
3.2.8. Ispitivanje oslobađanja AZA iz hidrogelova <i>in vitro</i>	40
3.2.9. Teksturna analiza.....	41
3.2.10. Ispitivanje penetracije AZA u rožnati sloj kože <i>in vivo</i>	41
3.2.11. Određivanje sadržaja tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti	43
3.2.12. Ispitivanje učinkovitosti hidrogela s nanokristalima AZA.....	43
3.2.13. Statistička analiza podataka.....	45

4. REZULTATI I RASPRAVA	47
4.1. SUSPENZIJE NANOKRISTALA AZA PRIPREMLJENE METODOM NISKOENERGETSKOG VLAŽNOG MLJEVENJA	49
4.1.1. Veličina čestica i PDI nanokristala AZA pripremljenih metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja	50
4.1.2. Sušenje smrzavanjem	52
4.2. TERMIČKA SVOJSTVA	52
4.2.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)	52
4.2.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)	54
4.3. INTRINZIČNA BRZINA OTAPANJA	56
4.4. KARAKTERIZACIJA <i>IN SITU</i> HIDROGELOVA S NANOKRISTALIMA AZA	58
4.4.1. Reološka karakterizacija hidrogelova.....	59
4.4.2. Oslobođanje AZA iz hidrogelova <i>in vitro</i>	66
4.4.3. Penetracija AZA u rožnati sloj kože <i>in vivo</i>	71
4.5. SUSPENZIJE NANOKRISTALA AZA PRIPREMLJENE METODOM VISKOENERGETSKOG VLAŽNOG MLJEVENJA	73
4.5.1. Veličina čestica i PDI nanokristala AZA pripremljenih metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja.....	74
4.5.2. Sušenje smrzavanjem	76
4.6. TEKSTURNA ANALIZA	76
4.7. UČINKOVITOST HIDROGELA S NANOKRISTALIMA AZA	78
4.7.1. Vulgarne akne.....	78
4.7.2. Rozaceja	86
5. ZAKLJUČCI	102
6. LITERATURA	105
7. POPIS KRATICA	121
ŽIVOTOPIS	124
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	127
PRILOG	130

1. UVOD

1.1. AZELATNA KISELINA

Azelatna kiselina (AZA) je zasićena, ravnolančana, 1,7-heptan dikarboksilna kiselina ($\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$) koja se prirodno nalazi u zrnima cjelovitih žitarica (pšenica, raž, ječam) i životinjskim proizvodima (1, 2). Diprotonska je kiselina s pKa vrijednostima 4,53 i 5,33 (25 °C). Karakterizira je ograničena topljivost u vodi; samo 0,24 g AZA topljivo je u 100 g vode pri 25 °C. Dobro je topljiva u etanolu, a slabo u etil eteru, benzenu i dimetil-sulfoksidu (DMSO). Molekulska masa AZA iznosi $188,22 \text{ g mol}^{-1}$, a temperatura pri kojoj dolazi do taljenja AZA je 106,5 °C (3).

AZA je indicirana za topikalnu primjenu u liječenju vulgarne akne (VA) i rozaceje. Komercijalno dostupne formulacije AZA nalaze se u obliku kreme, a odobrene su pod nazivima Skinoren[®] (Bayer), Azelex[®] (Allergan), Finevin[®] (Berlex), gela odobrenog pod nazivom Finacea[®] (Berlex) i pjene odobrene pod nazivom Finacea[®] (Leo Pharma). Svi oblici kreme sadrže AZA u koncentraciji od 20 % (m/m), a gel i pjena sadrže AZA u koncentraciji od 15 % (m/m) (3).

Iako točni mehanizmi djelovanja AZA nisu u potpunosti razjašnjeni, dokazano je njezino antimikrobno djelovanje protiv *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) i *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), protuupalno i antikeratinizirajuće djelovanje na normalnu kožu i kožu zahvaćenu aknama što je povezano sa smanjenom sintezom filagrina (1, 4). Nadalje, djeluje bakteriostatski i baktericidno na različite aerobne i anaerobne mikroorganizme prisutne na koži s aknama (4). Poznato je da djeluje i kao kompetitivni inhibitor tirozinaze, enzima koji je uključen u pretvorbu tirozina u melanin te kao inhibitor sinteze DNA i enzima u mitohondrijima i izrazito aktivnim melanocitima (5). Zbog navedenih mehanizama djelovanja je, osim u liječenju VA blagog do umjerenog oblika i papulopustularnog oblika rozaceje, indicirana i u liječenju raznih oblika hiperpigmentacija kože poput melazme, solarnog lentiga i drugih (1, 2). Nema podataka o razvoju bakterijske rezistencije nakon primjene AZA (6). AZA nije toksična i ne uzrokuje fotosenzibilne reakcije zbog čega se razlikuje od većine topikalnih lijekova za liječenje VA (1). Stoga je, primijenjena u monoterapiji ili u kombinaciji s drugim djelatnim tvarima, poželjna u liječenju kožnih oboljenja za koja je indicirana (6).

Nakon topikalne primjene, oko 4 % AZA se apsorbira sistemski pri čemu se uglavnom u nepromijenjenom obliku izlučuje urinom. Vrijeme polueliminacije iznosi približno 12 h, pa se lijek primjenjuje na problematični dio kože dva puta na dan. Učinkovitost liječenja VA

obično se primijeti već nakon 4 tjedna kontinuirane primjene lijeka, dok se kod papulopustularnog oblika rozaceje povoljan učinak može primijetiti nakon 12 tjedana primjene (7). Prema klasifikaciji lijekova u trudnoći s obzirom na mogućnost teratogeneze, AZA pripada u kategoriju B. Studije provedene na životinjama nisu pokazale teratogeni učinak, ali nema provedenih kontroliranih studija u žena (8).

U odobrenim topikalnim formulacijama prisutna je u visokim koncentracijama (15-20 %, *m/m*) (1) i uzrokuje neželjene reakcije na koži poput peckanja, iritacije, svrbeža, osipa ili suhe kože (7). U cilju poboljšanja penetracije AZA u rožnati sloj kože i dermalne bioraspodjelivosti te posljedično terapijske učinkovitosti i smanjenja neželjenih nuspojava istraživani su brojni terapijski sustavi poput mikroemulzijskih sustava, tekućih kristala, lipidnih nanovezikula, etosoma i ciklodekstrina.

Ma i suradnici (9) uklopili su AZA (10 %, *m/m*) u mikroemulzijski sustav koji se sastojao od smjese Spana 20 i etanola, vode i Carbopola 90. Rezultati su pokazali da je penetracija AZA u rožnati sloj kože (svinjska koža) nakon primjene mikroemulzijskog sustava poboljšana u odnosu na komercijalno dostupnu Skinoren® kremu. Uz to, mikroemulzijski sustav uzrokovao je manju iritaciju kože i tako pokazao bolji sigurnosni profil u odnosu na Skinoren® kremu.

Aytekin i suradnici (10) razvili su stabilne lamelarne tekuće kristale s uklopljenom potpuno otopljenom AZA u koncentraciji od 1 % (*m/m*). Mijenjali su površinski aktivne tvari i njihovu koncentraciju u sustavu i pokazali da se oslobađanje AZA može modificirati sastavom tekućih kristala.

Burchacka i suradnici (11) razvili su lipidni nanonoslač (lipogel) koji se sastojao od liposoma izrađenih od fosfolipida lecitina soje u koje je AZA uklopljena u koncentraciji od 10 % (*m/m*). Rezultati su pokazali da je penetracija AZA iz lipidnog nanonoslača u rožnati sloj kože više nego dvostruko povećana u odnosu na komercijalno dostupnu Skinoren® kremu koja sadrži dvostruko veću koncentraciju AZA (20 %, *m/m*).

Mistry i suradnici (12) uklopili su AZA u etosome koje su potom uklopili u gel. Cilj je bio postići povećano nakupljanje lijeka na mjestu primjene i kontrolirano oslobađanje u odnosu na konvencionalne formulacije kreme i gela. Pripremljeni gel s uklopljenim etosomima kao nosačima AZA pokazao je željeni profil oslobađanja lijeka i nije izazivao iritacije na koži nakon primjene. Također, nedostatak konvencionalnih topikalnih formulacija AZA uključuje pojavu neželjenih reakcija na mjestu primjene na koži poput eritema, iritacije,

peckanja i svrbeža. Istraživanje je pokazalo da gel s uklopljenim etosomima kao nosačima AZA nije uzrokovao neželjene reakcije nakon 24 h od primjene gela na koži štakora.

Kumar i suradnici (13) uklopili su AZA nanometarskog raspona veličina u ciklodekstrinski kompleks što je rezultiralo boljim antibakterijskim učinkom na *C. acnes* i *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) na koži zahvaćenoj aknama uslijed bolje topljivosti u odnosu na neprocesuiranu AZA.

1.2. PRIMJENA LIJEKOVA NA KOŽU

Topikalna terapija je najpovoljnija za liječenje kožnih oboljenja jer osigurava ciljanu isporuku lijeka na zahvaćeno područje kože. Time se sprječava pojava neželjenih reakcija uslijed sistemske primjene lijeka te se izbjegava probavni sustav i presistemski metabolizam lijeka (14).

Dostava lijeka u/kroz kožu složen je proces zbog specifične anatomije i fiziologije kože. Koža predstavlja važan put primjene lijeka, ali je prije svega vrlo uspješna fiziološka barijera tvarima iz okoliša, pa tako i topikalnim lijekovima, za penetraciju u kožu i dalje u organizam. Pri tome je rožnati sloj kože od posebnog interesa jer zbog svoje specifične građe određuje tu zaštitnu funkciju (15). Rožnati, najgornji, sloj kože različit je od ostalih slojeva epidermisa i sučelje je između okoliša i kože. Sastoji se od više redova odumrlih stanica korneocita raspršenih između uređenih lamelarnih lipidnih struktura koje se uglavnom sastoje od ceramida. Takav model građe poznat je kao tzv. model „cigle i žbuke“ i predstavlja osnovnu fizičku barijeru kože (16).

Različiti su putovi kojima molekule mogu prijeći rožnati sloj epidermisa što ovisi o njihovim fizičko-kemijskim svojstvima. To su (i) intercelularni put (prolazak lijeka kroz međustanične lipidne domene rožnatog sloja), (ii) transcelularni put (prolazak lijeka kroz stanice/korneocite) i (iii) transfolikularni i transglandularni put (prolazak lijeka kroz folikul dlake ili kroz žlijezde znojnice i lojnice) (17). Prijenos molekula putem kožnih privjesaka nije značajan jer žlijezde znojnice i lojnice i folikuli dlaka zauzimaju oko 0,1 % ukupne površine kože. Unatoč tome, može biti važan put prijenosa molekula spore difuzije kao i nanočestica (18).

Primjena lijeka na kožu može rezultirati lokalnom, regionalnom i transdermalnom isporukom lijeka. Pri lokalnoj isporuci lijeka podrazumijeva se izravan učinak djelatne tvari na kožu, odnosno lokalno djelovanje te je zbog toga, kao i zbog izbjegavanja apsorpcije (ili

minimalne apsorpcije) djelatne tvari u sistemsku cirkulaciju, topikalna primjena lijeka prvi izbor u liječenju većine kožnih oboljenja. Regionalna isporuka lijeka opisuje penetraciju djelatne tvari kroz kožu do podležućih tkiva (mišići, zglobovi) gdje ostvaruje lokalno djelovanje. Poželjna je u liječenju bolesnih stanja u dubokim tkivima. Suprotno tome, transdermalna isporuka lijeka opisuje primjenu formulacije na kožu za prijenos lijeka preko kože u sistemsku cirkulaciju s ciljem liječenja sistemskih oboljenja (14).

Cilj dermalne primjene lijeka je dostava djelatne tvari do željenog mjesta djelovanja u/kroz kožu. Glavni mehanizam prijenosa djelatne tvari iz podloge u koju je uklopljena u/kroz rožnati sloj kože je pasivna difuzija, a najvažniji preduvjet za učinkovitu pasivnu difuziju je dovoljna količina otopljene tvari na mjestu apsorpcije. Fizikalni zakon koji opisuje prijenos djelatne tvari u/kroz kožu je Fickov zakon difuzije prilagođen dermalnoj primjeni (19) (jednadžba 1.):

$$J = \frac{P \times D \times \Delta c}{h} \quad (1)$$

gdje J označava fluks djelatne tvari, P koeficijent raspodjele djelatne tvari između rožnatog sloja kože i podloge, D koeficijent difuzije djelatne tvari u rožnatom sloju kože, Δc koncentracijski gradijent djelatne tvari, a h debljinu rožnatog sloja kože.

Transdermalni terapijski sustavi isporučuju dozu lijeka kroz kožu u sistemsku cirkulaciju što je osobito važno u liječenju bolesnih stanja koji zahtijevaju dugotrajno dopremanje lijeka. Glavne indikacije za takav način primjene su kronična bol, karcinom, bolesti središnjeg živčanog sustava, demencija, kardiovaskularne bolesti i hormonska nadomjesna terapija (20).

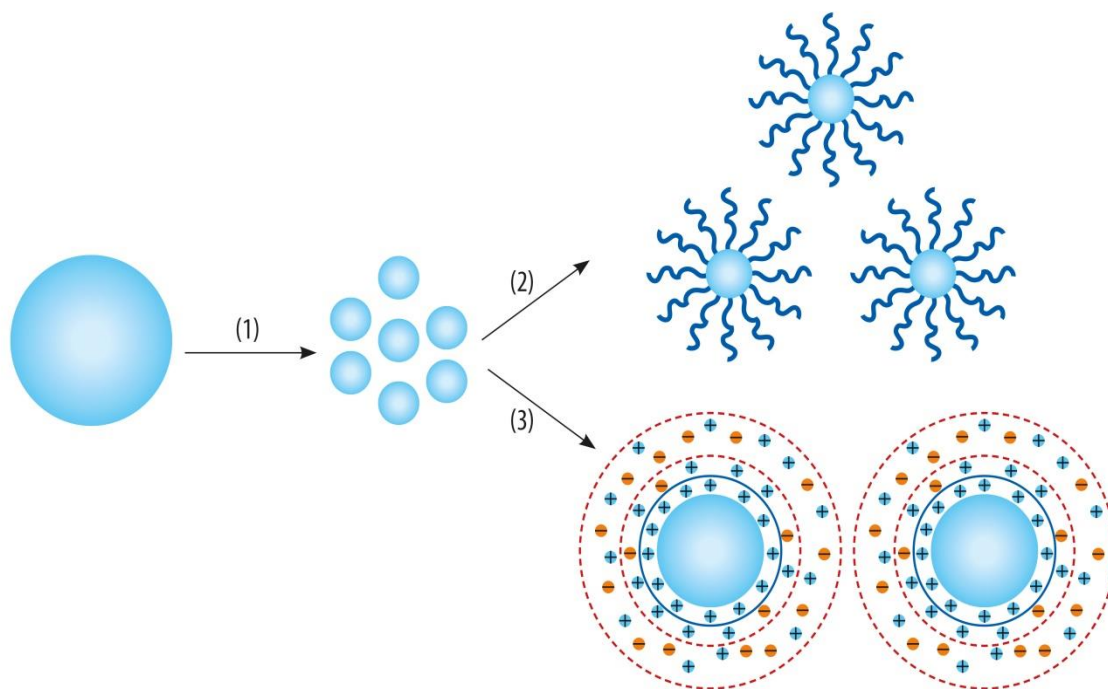
Perkutana apsorpcija lokalno primijenjenog lijeka najčešće se nastoji poboljšati na dva načina. Prvi način podrazumijeva optimizaciju topikalne podloge u koju je djelatna tvar uklopljena s ciljem povećanja prijenosa lijeka u/kroz kožu, a bez utjecaja na barijerna svojstva rožnatog sloja kože (21). Podloge namijenjene za dermalnu primjenu mogu značajno utjecati na topljivost uklopljene djelatne tvari te tako i na raspodjelu djelatne tvari iz podloge u/kroz rožnati sloj kože (22). Drugi način podrazumijeva upotrebu promotora penetracije djelatne tvari u/kroz kožu koji reverzibilno smanjuju barijernu funkciju kože s ciljem poboljšanja apsorpcije lijeka. Idealan promotor penetracije trebao bi biti farmakološki inertan, netoksičan, ne smije izazvati iritaciju kože i alergijske reakcije na koži (21). Kao promotori penetracije

djelatne tvari u kožu najčešće se upotrebljavaju alkoholi (etanol, izopropanol, oktanol, dekanol), glikoli (propilenglikol, dietilenglikol, 1,3-butilenglikol, 1,2-butilenglikol), amidi (urea), masne kiseline (oleinska, laurinska, palmitinska, linolna, stearinska), sulfoksidi (dimetilsulfoksid), esteri (etil-acetat, oktil-salicilat, etil-oleat, izopropil-miristat), površinski aktivne tvari (natrijev lauril-sulfat, polisorbati), ali i drugi poput fosfolipida, terpena i alkana (18, 23). Osim podloge i promotora penetracije, na perkutanu apsorpciju lokalno primijenjenog lijeka mogu utjecati i veličina molekule i lipofilnost, ali i fizičko stanje rožnatog sloja kože (24) te primjena drugih metoda poput ionoforeze, sonoforeze, magnetoforeze, elektroporacije i mikroigli (25).

1.3. NANOKRISTALI DJELATNE TVARI

Nanokristali su nanonizirane čestice djelatne tvari građene gotovo u potpunosti od djelatne tvari, dok samo mali udio čine pomoćne tvari odobrene za izradu lijekova. Upravo je građa njihova najveća prednost u odnosu na druge terapijske nanosustave kod kojih je omjer djelatne tvari prema drugim sirovinama koje čine nanonoslač nepovoljan zbog niskog uklapanja (26). Izrađuju se u obliku nanosuspenzija, termodinamički nestabilnih sustava, koji zbog velike specifične površine posjeduju veliku Gibbsovu slobodnu energiju (engl. *Gibbs free energy*, G_f). Takvi sustavi pokazuju izraženu tendenciju stvaranja nakupina nanokristala (aglomerata) i njihovog rasta, pri čemu mogu izaći iz nanometarskog raspona veličina. Zbog toga suspenzije nanokristala, uz djelatne tvari suspendirane u tekućoj fazi, sadrže i pomoćne tvari (27). Pomoćne tvari (stabilizatori) se dodaju u manjem udjelu i sprječavaju agregaciju čestica i/ili Ostwaldovo zrenje tijekom procesa proizvodnje ili skladištenja (28). Stabilizatori ne smiju utjecati na farmakološka svojstva djelatne tvari, ne smiju izazivati iritaciju kože, moraju biti netoksični i općenito zdravstveno ispravni. U tu svrhu mogu se koristiti površinski aktivne tvari (PAT), puferi, šećeri i soli (29). Stabilizatori mogu djelovati pomoću dva mehanizma djelovanja, elektrostatskom ili steričkom stabilizacijom. Može se primijeniti i kombinacija navedenih mehanizma stabilizacije što se naziva elektrosteričkom stabilizacijom (27). Spomenuti mehanizmi stabilizacije djeluju na principu povećanja odbojnih sila između čestica (30), dodatkom ionskih ili neionskih PAT (31). Sterička se stabilizacija nanosuspenzija postiže adsorpcijom neionskih PAT na površinu nanokristala hidrofobnim dijelovima, dok se hidrofilni dijelovi molekula pružaju u disperzijsko sredstvo. Smanjuje se međupovršinska napetost i stvara se barijera između susjednih čestica (32). S druge strane,

elektrostatska se stabilizacija postiže stvaranjem električnog dvosloja koji je električno neutralan i stvara električni potencijal (33). Shematski prikazi mehanizama stabilizacije nanokristala djelatnih tvari prikazani su na Slici 1.



Slika 1. Shematski prikaz povećanja stabilnosti nanokristala djelatne tvari (1) mehanizmima steričke stabilizacije (2) i elektrostatske stabilizacije (3).

Odabir prikladne vrste PAT u optimalnoj koncentraciji važan je za učinkovitu stabilizaciju i osiguranje odgovarajućeg roka trajanja proizvoda. U mnoštvu pomoćnih tvari koje se mogu koristiti za stabilizaciju suspenzije nanokristala lijeka najčešće se koriste polisorbati i poloksameri (34). To su neionske PAT koje djeluju kao sterički stabilizatori i kompatibilne su s brojnim djelatnim i pomoćnim tvarima (35).

Nanokristali djelatne tvari često se formuliraju u uobičajene dozirne oblike kao što su tablete, kapsule, pelete, suspenzije za injekcije, kreme i gelovi. Pri tome je potrebno ukloniti medij iz suspenzije i uklopiti ih u nove dozirne oblike bez narušavanja njihovih fizičkih, kemijskih i farmaceutskih svojstava. Za sušenje ili koncentriranje nanokristala lijeka mogu se koristiti brojne tehnike poput sušenja smrzavanjem (liofilizacija), sušenja raspršivanjem, centrifugiranja i ultrafiltracije. Izrada liofiliziranog oblika nanokristala lijeka je, uz upotrebu stabilizatora, dodatni način stabilizacije i postizanja produljenog roka trajanja lijeka (36).

Djelatne tvari netopljive u vodenom mediju i organskim otapalima (tzv. *brick dust* tvari) se vrlo lako mogu formulirati u oblik nanokristala (27). Time se nastoje riješiti problemi u vodi slabo topljivih djelatnih tvari kao što su niska bioraspoloživost lijeka nakon oralne primjene, niska penetracija djelatne tvari u kožu (niska dermalna bioraspoloživost), potreba velikog volumena ubrizgavanja za intravensku primjenu i popratne neželjene reakcije pri intravenskoj primjeni (37).

1.4. SVOJSTVA NANOKRISTALA DJELATNE TVARI

Nanokristali djelatne tvari posjeduju nekoliko dobrih svojstava u odnosu na veće čestice što ih čini učinkovitim sustavima za prevladavanje biofarmaceutskih ograničenja djelatnih tvari povezanih sa slabom topljivošću. Nastaju kao rezultat promjene raspona veličina čestica djelatne tvari iz mikrometarskog u nanometarsko, čime se mijenjaju fizičko-kemijska svojstva djelatne tvari. To su poboljšana topljivost slabo topljivih djelatnih tvari, povećana brzina otapanja, poboljšana bioadhezivnost, apsorpcija i bioraspoloživost djelatne tvari (37, 38).

Topljivost djelatne tvari glavni je ograničavajući parametar koji utječe na apsorpciju djelatne tvari (39). Djelatne tvari slabe topljivosti najprikladniji su kandidati za formuliranje u kristalni oblik nanometarskog raspona veličina. Smanjenjem veličine čestica djelatnih tvari povećava se njihov broj i ukupna površina pri čemu više molekula otapala dolazi u doticaj s površinom čestice i postiže se brže otapanje djelatne tvari. Posljedica toga je povećani gradijent koncentracije što potiče pasivnu difuziju kroz biološke membrane (38). Brzina otapanja krute tvari u otapalu (dc/dt) može se opisati Noyes-Whitneyjevom jednadžbom (40) koja glasi (jednadžba 2.):

$$\frac{dc}{dt} = \frac{DA(C_s - C)}{h} \quad (2)$$

gdje je D koeficijent difuzije, A ukupna površina čestica u kontaktu s otapalom, C_s topljivost, C koncentracija djelatne tvari u otopini u vremenu t , a h debljina difuzijskog sloja.

Prema Noyes-Whitneyjevoj jednadžbi može se zaključiti da se sa smanjenjem veličine čestica i povećanjem njihove ukupne površine povećava i brzina otapanja djelatne tvari.

Također, smanjenjem veličine čestica djelatne tvari do nanometarskog raspona veličina povećava se topljivost (C_s) djelatne tvari koja se može opisati Ostwald-Freundlichovom jednadžbom (41) (jednadžba 3.):

$$\log \frac{C_s}{C_x} = \frac{2\sigma V}{2,303RT \rho r} \quad (3)$$

gdje je C_s topljivost djelatne tvari, C_x koncentracija otopine u vremenu t , σ površinska napetost na graničnoj površini čvrsto/tekuće, V molarni volumen čestica krutine, R opća plinska konstanta, T termodinamička temperatura, ρ gustoća krutine, r polumjer čestica krutine.

Kao posljedica smanjenja veličine čestica djelatne tvari i samim time značajnog povećanja njihovog broja i ukupne površine, povećava se i adhezivnost za biološke membrane (38). Takav iznimno veliki broj malih čestica nanokristala značajno bolje prijanja na površinu membrane preko koje se djelatna tvar apsorbira (42), omogućuje produljeno vrijeme zadržavanja formulacije na mjestu primjene i dodatno pospješuje permeaciju djelatne tvari (38). Nadalje, uslijed povećanja topljivosti i brzine otapanja kao i povećanja adhezivnosti djelatne tvari za biološke membrane, poboljšava se apsorpcija na mjestu primjene. Dobar primjer poboljšanja apsorpcije djelatne tvari uslijed smanjenja veličine čestica je antimikotik griseofulvin, čije je smanjenje veličine čestica s približno 4 μm na približno 1 μm dovelo do dvostruko većeg obima apsorpcije lijeka nakon oralne primjene (43). Danas, mnogi lijekovi pokazuju toliko slabu topljivost i malu brzinu otapanja na mjestu apsorpcije da se mikronizacijom ne može postići dovoljno visoka bioraspoloživost za postizanje terapijskog odgovora. Slijedom toga, učinjen je sljedeći korak u smanjenju veličine čestica do nanometarskog raspona veličina, odnosno proizvodnje nanokristala djelatnih tvari. Pri tome je bioraspoloživost djelatne tvari u obliku nanokristala značajno poboljšana u odnosu na djelatne tvari većeg raspona dimenzija. Liversidge i suradnici (44) ispitivali su bioraspoloživost danazola, teško topljivog inhibitora gonadotropnog hormona u obliku mikrosuspenzije čija je veličina čestica iznosila 10 μm i nanosuspenzije s veličinom čestica danazola od 169 nm. Oba lijeka su primijenjena u dozi od 200 mg, a ispitivali su na bigl pasmini. Rezultati ispitivanja

su pokazali poboljšanu bioraspoloživost nakon primjene nanosuspenzije danazola koja je iznosila 82,3 % u odnosu na bioraspoloživost mikrosuspenzije danazola od 5,2 %.

1.5. METODE IZRADE NANOKRISTALA DJELATNE TVARI

Metode izrade nanokristala djelatnih tvari općenito se mogu podijeliti na: (i) metode smanjenja veličine čestica djelatne tvari (engl. *top-down methods*) i (ii) metode povećanja veličine čestica djelatne tvari (engl. *bottom-up methods*).

Vlažno mljevenje i visokotlačna homogenizacija metode su smanjenja veličine čestica djelatne tvari koje započinju od velikih kristala u mikrometarskom rasponu veličina smanjujući se do nanometarskog raspona veličina (27, 45). Općenito su jednostavne i lako izvodljive (46).

Metoda taloženja uz antiotapalo najčešće je korištena metoda povećanja veličine čestica pri čemu je djelatna tvar molekulski otopljena u prikladnom otapalu (47).

Nanokristali djelatnih tvari pripremljeni metodom povećanja veličine čestica imaju užu raspodjelu veličina čestica u usporedbi s nanokristalima djelatnih tvari pripremljenih metodom smanjenja veličine čestica (48).

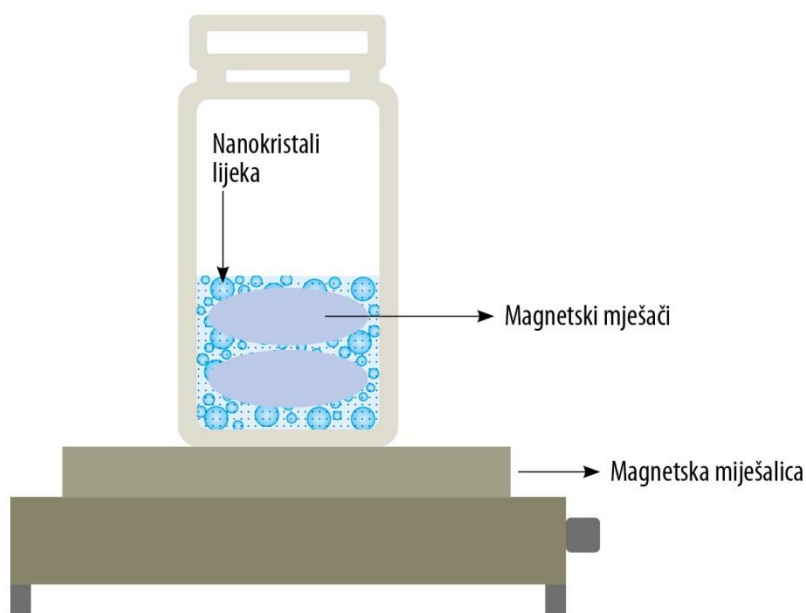
1.5.1. Metode smanjenja veličine čestica djelatne tvari

1.5.1.1. Metoda vlažnog mljevenja

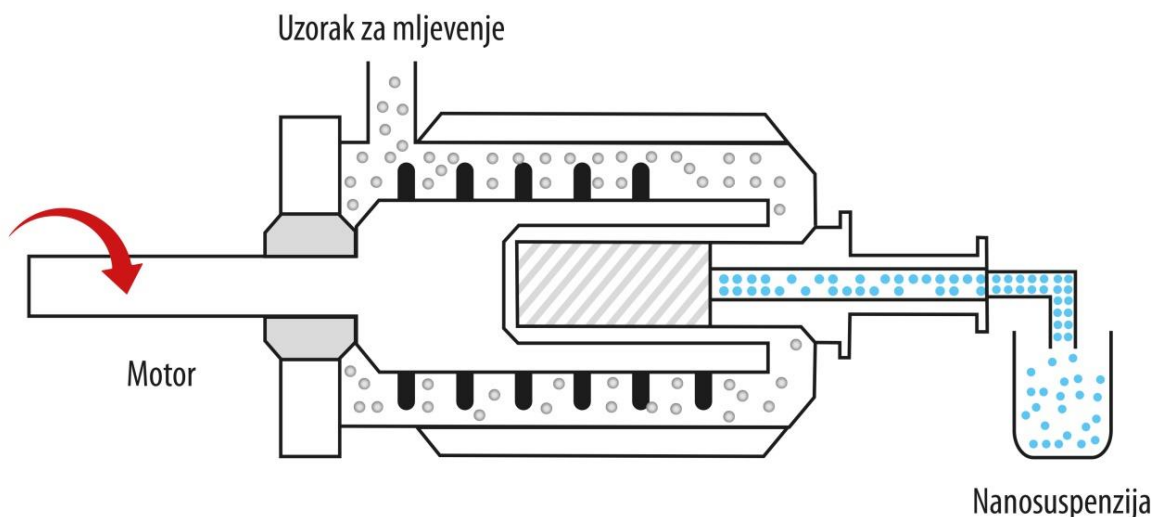
Metoda vlažnog mljevenja (engl. *wet ball milling*, WBM) ima dugu povijest primjene u farmaceutskoj tehnologiji i većina odobrenih/komercijalno dostupnih nanokristala djelatnih tvari proizvedena je upravo ovom metodom. Fizička je metoda koja se temelji na smanjenju veličine čestica djelatne tvari suspendirane u tekućoj fazi uz dodatak barem jednog stabilizatora (27). Najčešće je korištena metoda izrade nanokristala jer se lako može prilagoditi laboratorijskom (niskoenergetsko vlažno mljevenje; engl. *low-energy wet ball milling*) i industrijskom mjerilu (visokoenergetsko vlažno mljevenje; engl. *high-energy wet ball milling*) (46, 49) (Slika 2. i 3.).

Tijekom procesa mljevenja, mehanička energija najprije uzrokuje stvaranje pukotina u česticama koje se zatim šire duž čestice što uzrokuje lomove (50). Općenito, proces se odvija

u komori za mljevenje, a potiču ga kuglice koje su izrađene od tvrdog, gustog materijala kao što su itrijem stabilizirane cirkonijeve kuglice, kuglice od nehrđajućeg čelika ili titanija, a mogu biti građene i od određenih polimera poput metakrilata. Kuglice za mljevenje osiguravaju minimalnu kontaminaciju tvari u sustavu za mljevenje, a njihova veličina može varirati od 0,1 do 20 mm. U pravilu, što je veličina kuglica manja, zbog povećane učestalosti sudaranja čestica djelatne tvari i kuglica za mljevenje, dobivene čestice su manje. Kuglice prilično malog promjera (primjerice 0,03 mm) zbog svoje težine nisu prikladne za korištenje u procesu vlažnog mljevenja jer ne mogu osigurati dovoljno energije potrebne za smanjenje veličine čestica (27). Osim veličine kuglica za mljevenje i njihovog udjela, na krajnju veličinu čestica mogu znatno utjecati i drugi parametri kao što su vrijeme trajanja procesa mljevenja koje može varirati od nekoliko sati pa sve do nekoliko dana, brzina mljevenja te udio djelatne i pomoćnih tvari (50).



Slika 2. Shematski prikaz postupka izrade nanokristala djelatne tvari metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja.



Slika 3. Shematski prikaz postupka izrade nanokristala djelatne tvari metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja u kugličnom mlinu. Komora za mljevenje puni se suspenzijom djelatne tvari u mikroniziranom obliku uz prisutnost najmanje jednog stabilizatora pri čemu dolazi do smanjenja veličine čestica djelatne tvari do nanometarskog raspona dimenzija uslijed djelovanja sila smicanja i tlaka unutar komore za mljevenje (42).

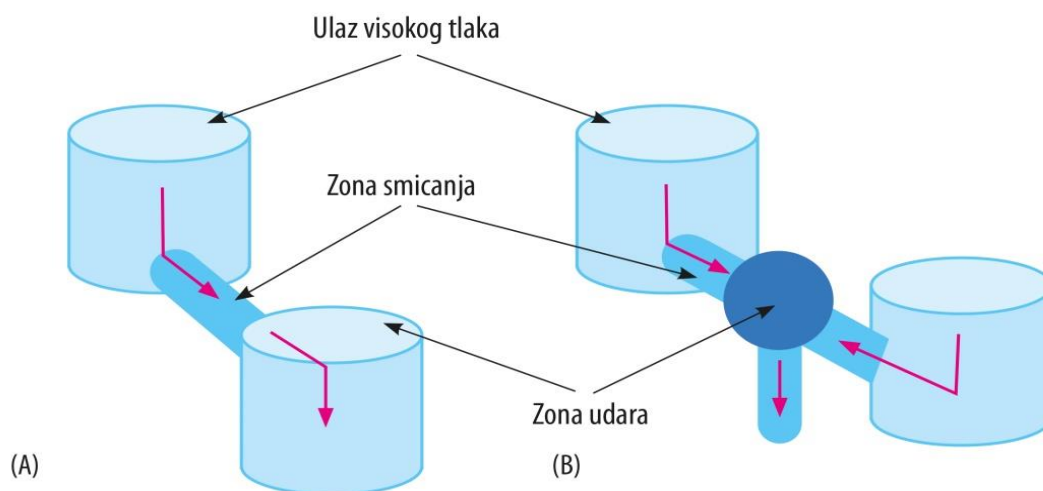
1.5.1.2. Metoda visokotlačnog homogeniziranja

Metoda visokotlačnog homogeniziranja (engl. *high-pressure homogenization*, HPH) uključuje tri tehnologije smanjenja veličine čestica: (i) mikrofluidizaciju (IDD-P™ tehnologija), (ii) homogenizaciju na principu klipa i uskog otvora (engl. *pitson gap homogenization*) u vodenom mediju (DissoCubes® tehnologija) i (iii) homogenizaciju na principu klipa i uskog otvora u nevodenom mediju (Nanopure® tehnologija) (51). Općenito su metode visokotlačnog homogeniziranja jednostavne, jeftine i lako izvodljive i često se koriste u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji (52).

Mikrofluidizacija je metoda smanjenja veličine čestica koja se temelji na mlaznom homogenizatoru (engl. *jet stream homogenizer*). Djelatna se tvar suspendira najčešće u vodi, a smanjenje veličine čestica djelatne tvari nastaje u komori mikrofluidizatora pod tlakom od 1700 bar uslijed sudaranja većih čestica, kavitacijskih sila i sila smicanja (37, 53).

Dva su tipa komora mikrofluidizatora, Z i Y tip (Slika 4.). U komori tipa Z, smjer strujanja uzorka mijenja se nekoliko puta tijekom procesa homogenizacije što uzrokuje sudaranje čestica i njihovo smanjenje uslijed nastanka sila smicanja. U komori tipa Y, uzorak teče u dva mlaza koji se međusobno sudaraju po prolasku kroz otvore malih dimenzija (54).

Komore tipa Z obično se koriste za izradu čvrstih disperzija, a komore tipa Y za izradu emulzija i liposoma (55). Stabilizacija uzorka postiže se dodatkom PAT, a za smanjenje veličine čestica do željenog nanometarskog raspona obično je potreban veliki broj ciklusa (50 do 100), što predstavlja nedostatak ove metode (54).



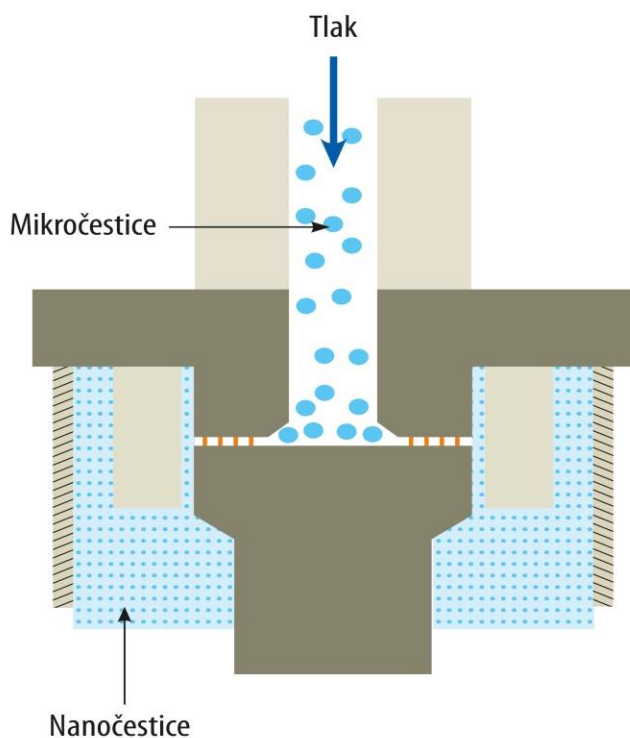
Slika 4. Shematski prikaz komora mikrofluidizatora: Z tip (A) i Y tip (B).

Tehnologijom temeljenom na principu klipa i uskog otvora ili DissoCubesTM tehnologijom provodi se homogenizacija vodenih suspenzija pri sobnoj temperaturi koje prolaze kroz uski otvor homogenizatora pod tlakom koji može doseći i do 4000 bar, a najčešće iznosi između 1500 i 2000 bar. Tlak postupno raste tijekom procesa homogeniziranja da se izbjegne začepljenje uskog otvora homogenizatora. Do smanjenja veličine čestica dolazi uslijed utjecaja kavitacije, međusobnih sudaranja čestica i sila smičnog naprezanja (26). Veličina čestica ovisi o primijenjenom tlaku, broju ciklusa homogenizacije kao i svojstvima djelatne tvari (56). Temperatura je bitan parametar kojeg je potrebno kontrolirati što je osobito važno ako se radi o temperaturno osjetljivim tvarima (41).

Nanopure[®] tehnologija prikladna je za homogenizaciju djelatne tvari koja je suspendirana u nevodenom mediju (primjerice, ulje, polietilenglikol, PEG) ili mediju s malim udjelom vode (primjerice smjesa glicerola i vode) čime se smanjuje mogućnost hidrolize djelatne tvari. Proces se odvija pri niskom tlaku i temperaturi što je pogodno za termolabilne djelatne tvari. Kao posljedica niskog tlaka i temperature, izostaje kavitacija ili je pak smanjena, a prisutne su turbulentne sile strujanja i smicanja koje su dovoljno jake za smanjenje veličine čestica djelatne tvari. Nanopure[®] tehnologijom oblikuju se nanosuspenzije

u uobičajene dozirne oblike poput želatinskih kapsula za oralnu primjenu u koje se uljne disperzije mogu puniti. Obzirom da je u mediju sadržaj vode smanjen, proces prevođenja u bezvodni oblik zahtjeva upotrebu minimalne količine energije (53, 56).

Shematski prikaz postupka izrade nanokristala djelatne tvari metodom visokotlačnog homogeniziranja na principu klipa i uskog otvora prikazan je na Slici 5.



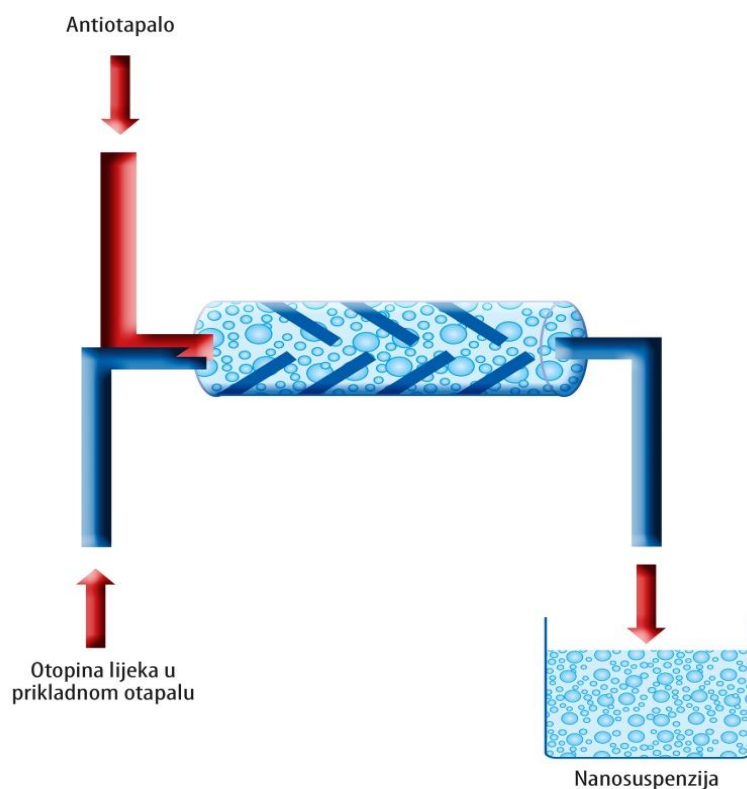
Slika 5. Shematski prikaz postupka izrade nanokristala djelatne tvari metodom visokotlačnog homogeniziranja na principu klipa i uskog otvora.

1.5.2. Metode povećanja veličine čestica djelatne tvari

1.5.2.1. Metoda taloženja

Metoda taloženja (Slika 6.) je metoda povećanja veličine čestica djelatne tvari koja se uglavnom provodi pri nižim temperaturama zbog čega je prikladna za povećanje veličine čestica termolabilnih tvari (57). Taloženje djelatne tvari može se postići miješanjem otapala i antiotapala. Prvi korak predstavlja otapanje djelatne tvari (najčešće u različitim organskim otapalima), nakon čega slijedi miješanje otopine djelatne tvari s antiotapalom. Ključni korak

je odabir otapala i antiotapala obzirom da djelatna tvar mora biti topljiva u otapalu, otapalo i antiotapalo se međusobno moraju moći miješati, a pri tome djelatna tvar ne smije biti topljiva u antiotapalu. Najčešće korištena organska otapala su etanol (58), metanol (59) i aceton (60). Kao antiotapalo se najčešće koristi vodena otopina stabilizatora. Veličina čestica, kao i njihova kristalizacija ovisi od niza faktora poput odabira otapala i antiotapala te omjera njihovih volumena, koncentracije djelatne tvari, odabira stabilizatora i brzine miješanja (59). Taloženje djelatne tvari, uz antiotapalo, moguće je postići i u prisutnosti superkritičnog fluida poput ugljikovog dioksida i amonijaka (48), kao i uklanjanjem otapala tehnikama sušenja raspršivanjem ili sušenja smrzavanjem (61).



Slika 6. Shematski prikaz postupka izrade nanokristala djelatne tvari metodom taloženja.

1.5.3. Kombinirana metoda

Nanokristali djelatne tvari mogu se izraditi i kombinacijom prethodno navedenih metoda. Kombinirana metoda provodi se s ciljem prevladavanja potencijalnog začepjenja dijelova uređaja za nanonizaciju djelatne tvari pri homogenizaciji relativno velikih čestica. Također, kombiniranom metodom mogu se prevladati nedostaci pojedinačnih metoda izrade nanokristala djelatne tvari, a iskoristiti prednosti njihove kombinacije jer se metode međusobno nadopunjavaju. Smanjenje veličine čestica djelatne tvari kombiniranom metodom jednim se imenom naziva NanoEdge™ i obuhvaća niz postupaka pri čemu svaki postupak podrazumijeva primjenu niskoenergetskog procesa nanonizacije djelatne tvari nakon kojeg slijedi visokoenergetski proces. Obično se radi o kombinaciji niskoenergetskog procesa poput vlažnog mljevenja ili taloženja koji se provodi u svrhu predobrade sirovine i visokoenergetskog postupka poput visokotlačne homogenizacije koji se provodi u svrhu smanjenja veličine čestica. Osim metode vlažnog mljevenja ili taloženja, kao niskoenergetski postupak može se primijeniti i postupak sušenja raspršivanjem ili sušenja smrzavanjem (37).

Kombinirana metoda pokazuje brojne prednosti u smanjenju veličine čestica u odnosu na primjenu jedne metode, ali se kombinirana metoda rijetko primjenjuje zbog povećanja troškova dvostrukog postupka pripreme (62).

U Tablici 1. prikazani su nanokristali djelatnih tvari koji su pripremljeni različitim metodama.

Tablica 1. Primjeri nanokristala djelatne tvari proizvedenih različitim metodama.

Djelatna tvar	PAT	Veličina čestica	Metoda	Parametri metode	Put primjene	Indikacija/djelovanje	Literatura
Azitromicin (1 %)	Pluronic® F68 (0,3 %)	400 nm	Predobrada + HPH	Miješanje 10 min/ 1 000 okr/min + 2 ciklusa/100 bar 5 ciklusa/500 bar 15 ciklusa/1 500 bar	Oralni	Respiratorne, kožne infekcije	(63)
Hesperetin (5 %)	Tween® 80 Lutrol® F68 Plantacare® 2000 Inutec® SP1	1 % 300-350 nm	Predobrada + HPH	Miješanje 1 min/ 10 000 okr/min 5 ciklusa pri niskom tlaku + 30 ciklusa/1500 bar	Oralni	Antioksidativno djelovanje	(64)
Hidrokortizon (2,5 %)		539 nm					
Prednizolon (2,5 %)	Pluronic® F68 (0,1 %)	211 nm	Predobrada + HPH	Miješanje 3 min/ 13 000 okr/min + 10 ciklusa 1 000-1 500 bar	Oftalmički	Neinfektivna upalna stanja konjunktive i prednjeg segmenta oka	(65)
Deksametazon (2,5 %)		930 nm					

Djelatna tvar	PAT	Veličina čestica	Metoda	Parametri metode	Put primjene	Indikacija/djelovanje	Literatura
Budenosid (1 %)	Lecitin (0,5 %)	500-600 nm	Predobrada + HPH	Miješanje 1 min/ 9 500 okr/min 2 ciklusa/150 bar 2 ciklusa/500 bar + 20 ciklusa/1500 bar	Pulmonalni	Astma	(66)
	Tyloxapol (0,2 i 0,5 %) Span® 85 (0,5 %)						
	Cetil alkohol (0,1 %)						
Miricetin (1 %)	TPGS	2 % 300-500 nm	Predobrada + HPH	Miješanje 20 min/ 16 000 okr/min + 5 ciklusa/200 bar 5 ciklusa/500 bar 15 ciklusa/800 bar	Oralni	Antioksidativno djelovanje	(67)
	HP-β-CD						
	Lecitin						
	Poloxamer 188						
	HPMC						
Febukostat (2 %)	HPMC (0,5 %) TPGS (0,1 %)	≈ 250 nm	Vlažno mljevenje	Brzina mljevenja: 1500 okr/min Vrijeme mljevenja: 1 h Cirkonijske kuglice: 0,3-0,4 mm	Oralni	Hiperurikemija	(68)

Djelatna tvar	PAT	Veličina čestica	Metoda	Parametri metode	Put primjene	Indikacija/djelovanje	Literatura
Fursemid	Pluronic® F68	120-360 nm	Taloženje	Otapalo-aceton Antiotapalo-voda Otapalo:antiotapalo=1:10 i 1:20 Vrijeme miješanja: 15 i 30 min	Oralni	Hipertenzija, edem	(69)
	Stabilizator:djelatna tvar=1:5 i 1:10						
Probukol (20 %)	HPC (≈1,6 %) Pluronic® F68 (0,5-2 %) SDS (0,1 i 1 %)	≈ 190-465 nm	Vlažno mljevenje	Brzina mljevenja:1000 okr/min Vrijeme mljevenja: 3 h Cirkonijeve kuglice: 0,5 mm	Oralni	Hiperkolestrolemija	(70)

Djelatna tvar	PAT	Veličina čestica	Metoda	Parametri metode	Put primjene	Indikacija/djelovanje	Literatura
Resveratrol		202 nm/48 h					
Hesperitin	Alkil-poliglukozid C8-C10 (1 %)	49 nm/24 h	Vlažno mljevenje	Brzina mljevenja: 1000 okr/min Cirkonijske kuglice: 0,05-0,6 nm	Oralni	Antioksidativno djelovanje	(50)
Askorbil palmitat		171 nm/72 h					
Apigenin		85 nm/24 h					
Hesperidin	Poloksamer 188 (1 %)	294 nm/1 h					
Ciklosporin A	TPGS (1 %)	97 nm/48 h				Imunosupresivno djelovanje	

HPH, metoda visokotlačnog homogeniziranja; TPGS, tokoferol polietilenglikol sukcinat; HP-β-CD, hidroksipropil-β-ciklodekstrin, HPC, hidroksipropilceluloza; SDS, natrijev dodecil sulfat.

1.6. RAZVOJ NANOKRISTALA DJELATNE TVARI

Tehnologija nanokristala intenzivnije se počela razvijati i primjenjivati u području farmaceutike dvadesetih godina prošlog stoljeća (42). Prvi takav proizvod odobren je za primjenu 2000. godine od Agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and drug administration*, FDA) i dostupan je u obliku tablete i otopine za oralnu primjenu. Riječ je o imunosupresivnom lijeku sirolimusu pod zaštićenim nazivom Rapamune[®]. Tehnologijom nanokristala nastojao se riješiti problem prve komercijalno dostupne formulacije sirolimusa u obliku viskozne oralne otopine. To je otopina na bazi lipida lošeg okusa, a koju je tijekom skladištenja potrebno čuvati u hladnjaku i zaštititi od svjetlosti. Nakon primjene, u dodiru s gastrointestinalnim medijem, djelatna tvar se istaloži iz otopine prilikom čega se stvaraju velike čestice koje se teško apsorbiraju kroz probavni sustav (71). Nanokristali sirolimusa izrađeni su tehnologijom vlažnog mljevenja u kugličnom mlinu i uklopljeni su u tabletu za oralnu primjenu (Rapamune[®]) pri čemu se bioraspoloživost sirolimusa povećala za 21 % u odnosu na konvencionalnu formulaciju (72).

Godine 2004. odobren je najuspješniji proizvod u obliku nanokristala, a pripremljen je tehnologijom vlažnog mljevenja u kugličnom mlinu. Radi se o lijeku fenofibratu, u obliku tablete za oralnu primjenu, pod zaštićenim imenom Tricore[®]. Lijek se u obliku nanokristala može uzimati prije ili poslije obroka (večere), a karakterizira ga brže otapanje u probavnom sustavu i potpuna apsorpcija u odnosu na nenanonizirane oblike fenofibrata čija apsorpcija i bioraspoloživost uvelike ovise o utjecaju hrane. Tricore[®] je dostupan u dvije doze, 48 mg i 145 mg, koje postižu isti terapijski učinak kao i konvencionalne tablete fenofibrata u dozi od 54 mg i 160 mg (56).

Osim spomenutih, odobren je relativno veliki broj nanolijekova koji su proizvedeni tehnologijom nanokristala u usporedbi s relativno malim ukupnim brojem terapijskih nanosustava odobrenih za primjenu (42). Odobreni lijekovi u obliku nanokristala namijenjeni su za različite putove primjene poput oralnog, parenteralnog i oftalmičkog. U Tablici 2. prikazani su neki komercijalno dostupni lijekovi na bazi nanokristala koje je odobrila FDA.

Tablica 2. Komercijalno odobreni lijekovi od Agencije za hranu i lijekove s djelatnom tvari u obliku nanokristala.

Djelatna tvar	Indikacija	Put primjene	Zaštićeni naziv lijeka	Proizvođač	Godina odobrenja	Metoda proizvodnje nanokristala	Literatura
Sirolimus	Profilaksa odbacivanja presatka	Oralni	Rapamune®	Wyeth	2000	Vlažno mljevenje	(56)
Deksmetilfenidat HCl	ADHD	Oralni	Focalin XR®	Novartis	2001	Vlažno mljevenje	
Diltiazem	Hipertenzija	Oralni	Herbesser®	Mitsubishi	2002	Vlažno mljevenje	
Morfin sulfat	Psihostimulans/ liječenje kronične boli	Oralni	Avinza®	King pharmaceutics	2002	Vlažno mljevenje	
Metilfenidat HCl	ADHD	Oralni	Ritalin LA®	Novartis	2002	Vlažno mljevenje	
Tizanidin	Spazam mišića	Oralni	Zanaflex®	Acorda	2002	Vlažno mljevenje	

Djelatna tvar	Indikacija	Put primjene	Zaštićeni naziv lijeka	Proizvođač	Godina odobrenja	Metoda proizvodnje nanokristala	Literatura
Aprepitant	Posoperativna mučnina	Oralni	Emend [®]	Merck	2003	Vlažno mljevenje	(56)
Fenofibrat	Hiperkolesterolemija	Oralni	Tricor [®]	Abbott	2004	Vlažno mljevenje	
Fenofibrat	Hiperkolesterolemija	Oralni	Triglide [®]	SkyePharma	2005	Visokotlačna homogenizacija	
Megesterol acetat	Nedostatak apetita	Oralni	Megace ES [®]	Par Pharmaceutical	2005	Vlažno mljevenje	
Nabilon	Mučnina i povraćanje	Oralni	Cesamet [®]	Lilly	2005	Taloženje	
Naproxen natrij	NSAID	Oralni	Naprelan [®]	Wyeth	2006	Vlažno mljevenje	
Teofilin	Astma/COPD	Oralni	Theodur [®]	Mitsubishi Tanabe Pharma	2008	Vlažno mljevenje	
Paliperidon palmitat	Shizofrenija	Intramuskularni	Invenga Sustena [®]	Johnson & Johnson	2009	Vlažno mljevenje	

ADHD, poremećaj hiperreaktivnosti i deficita pažnje; NSAID, nesteroidni protuupalni lijek; COPD, kronična opstruktivna bolest pluća.

1.7. HIDROGELOVI

Hidrogelovi ili hidrofilni gelovi su umrežene, trodimenzionalne, viskoelastične strukture koje, zbog prisutnosti hidrofilnih polimernih lanaca, imaju sposobnost apsorpcije i zadržavanja velike količine vode. Pokazuju odlična svojstva vlaženja i elastična svojstva gotovo identična tkivu živog organizma. Općenito ih karakterizira dobra podnošljivost, biorazgradljivost i biokompatibilnost te kompatibilnost s velikim brojem molekula (73).

Hidrogelovi se mogu klasificirati na različite načine ovisno o: (i) fizičkim svojstvima (amorfni, semikristalični, supramolekularni, hidrokoloidni agregati), (ii) načinu pripreme (kopolimerni, homopolimerni, multipolimerni), (iii) podrijetlu (prirodni, sintetički, hibridni), (iv) ionskom naboju (kationski, anionski, neutralni), (v) razgradljivosti (biorazgradljivi, nerazgradljivi), (vi) vrsti veze između polimernih lanaca (kemijske i fizičke veze) i (vii) prema načinu geliranja (promjenom pH ili temperature, dodatkom iona ili enzima, pomoću električnog polja i svjetlosti) (74–76).

Pogodan su biomaterijal za širok spektar primjena i privlače znatnu pažnju u području farmaceutske industrije, biomedicinskog inženjerstva i regenerativne medicine. Učinkovito se koriste za cijeljenje rana zbog mogućnosti osiguravanja visokog sadržaja vlage na mjestu rane što je neophodno u njihovom cijeljenju. Pri nanošenju u tankom sloju na oštećeni dio kože, stvaraju vanjski, zaštitni film preko rane i apsorbiraju biološku tekućinu (eksudat rane). Pri tome istovremeno dopuštaju izmjenu plinova između rane i vanjskog okoliša i pružaju učinak hlađenja koji smanjuje temperaturu na ranjenom dijelu kože. Zbog svoje „mekoće i elastičnosti“, lako se nanose i uklanjaju, što obloge temeljene na hidrogelovima čini ugodnijima i privlačnijima za pacijente (76, 77). U novije vrijeme hidrogelovi su se počeli primjenjivati u tkivnom inženjerstvu kao materijali za popunjavanje tkiva koje nedostaje ili kao stimulansi za stvaranje novoga tkiva. Omogućuju izradu gotovo svakog tkiva i organa potrebnog za transplantaciju, uključujući hrskavicu, kosti i glatke mišiće (78). Nadalje, koriste se u izradi kontaktnih leća. Razvoj leća datira iz 1948. godine, nakon čega je bilo niz uspješnih pokušaja u poboljšanju njihovih svojstava. Najznačajniji napredak u razvoju kontaktnih leća pripisuje se plasiranju leća silikonskog hidrogela u cilju poboljšanja svojstava vlaženja i prijanjanja na površinu oka (76). Često se koriste i kao punila za estetske korekcije. Fizička svojstva (čvrstoća i reološko ponašanje) određuju njihove jedinstvene karakteristike i na taj način primjenu u estetskim korekcijama kože i mekog tkiva. Čvršći gelovi pružaju bolju potporu mišićima lica i bolje se odupiru dinamičkim silama koje djeluju tijekom pokreta. Među hidrogelovima, kao punilima u kozmetičkoj industriji, najčešće se koriste

biorazgradljivi goveđi kolagen i hijaluronska kiselina i poliakrilamidno nerazgradljivo punilo. Goveđi kolagen, prvo je punilo odobreno od FDA za estetsku primjenu, a njegov učinak traje do 6 mjeseci (76).

Hidrogelovi imaju jedinstvenu poroznu strukturu zbog čega se smatraju odličnim nosačima djelatnih tvari. Deformabilni su pa se lako prilagođavaju obliku mjesta primjene (79). Omogućuju kontroliranu i ciljanu dostavu lijeka prilikom čega povećavaju njegov učinak i istodobno smanjuju nastanak nuspojava. Koriste se za bukalnu, oralnu, vaginalnu, (trans)dermalnu i okularnu primjenu (76).

Djelatna tvar se iz hidrogela može oslobađati pomoću dva različita mehanizma: difuzijom i kemijskom stimulacijom. Oslobađanje lijeka difuzijom regulirano je kroz polimerni matriks ili uslijed erozije hidrogela. Kemijska stimulacija podrazumijeva bubrenje gela kao odgovor na vanjske utjecaje poput pH vrijednosti, temperature ili enzimskog djelovanja pri čemu dolazi do otvaranja pora i oslobađanja djelatne tvari. Oslobađanje lijeka difuzijom karakteristično je za lokalnu isporuku lijeka, dok je oslobađanje lijeka kemijskom stimulacijom učestalije pri oralnoj primjeni (22).

Posebno su zanimljivi temperaturno osjetljivi hidrogelovi kao *in situ* gelirajući sustavi. Pri sobnoj temperaturi su tekućine ili slabo viskozni sustavi što olakšava primjenu pri ubrizgavanju u tkiva, organe ili tjelesne šupljine, dok su pri fiziološkoj temperaturi viskozni gelovi što osigurava lokaliziranu i kontinuiranu isporuku lijeka. Navedeno svojstvo omogućuje smanjenje broja potrebnih doza te ujedno smanjuje mogućnost nastanka nuspojava (80).

1.8. POLOKSAMERI

Među temperaturno osjetljivim materijalima posebno se ističu poloksameri, neionski triblok kopolimeri građeni od hidrofobnog bloka polipropilenoksida (PPO) omeđenog s dva hidrofilna bloka polietilenoksida (PEO) što ih čini amfifilnim polimerima (80, 81). Široko se primjenjuju u farmaceutskoj industriji, u raznim oralnim, parenteralnim i topikalnim formulacijama, a općenito se smatraju sigurnim pomoćnim tvarima (engl. *generally recognized as safe*, GRAS) (80). U vodenim otopinama, pri koncentraciji većoj od kritične micelarne koncentracije (engl. *critical micelle concentration*, CMC) stvaraju micide koje se gusto pakiraju i nastaje gel (80, 82). Obzirom da otopine poloksamera karakterizira termoreverzibilni fazni prijelaz, često se koriste u razvoju *in situ* gelirajućih sustava (83, 84).

Poloksamer 407 (P407) najviše se istražuje jer je topljiv u vodi i biokompatibilan s velikim brojem biomolekula i drugih pomoćnih tvari (80). FDA definira P407 kao „inaktivni“ sastojak koji se koristi u izradi raznih oblika lijekova poput otopina za primjenu oralnim putem, suspenzija, pripravaka namijenjenih za inhalaciju i intravenski put primjene, oftalmoloških i topikalnih pripravaka (85). Poboljšava otapanje u vodi slabo topljivih djelatnih tvari. Istraživanja su pokazala 11 puta veću topljivost piroksikama dodavanjem 22,5 % (*m/m*) P407 u odnosu na topljivost piroksikama bez prisutnosti P407 (86). P407 odlikuje izvrsno termogelirajuće svojstvo koje nastaje kao posljedica hidrofobnih interakcija između kopolimernih lanaca P407. Povišenjem temperature, kopolimerni lanci P407 počinju agregirati i stvarati micelarnu strukturu. Micelarne strukture nastaju kao rezultat dehidracije hidrofobnih PPO jedinica i označavaju početni korak geliranja (85).

Temperatura faznog prijelaza ($T_{\text{sol-gel}}$) ovisi o koncentraciji P407 i povećava se sa smanjenjem njegove koncentracije u vodenoj otopini (85–87). Dodatak djelatnih i pomoćnih tvari, soli, kao i raznih drugih sastojaka u pripravke na bazi P407 može utjecati na povećanje ili smanjenje $T_{\text{sol-gel}}$ (85). Temperaturno osjetljivi hidrogelovi na bazi P407 prikladni su sustavi za isporuku lijekova male molekulske mase, peptida i bioloških molekula posebno kada je potrebno dizajnirati formulaciju s kontroliranim oslobađanjem lijeka (84).

Unatoč višestrukim prednostima, hidrogelove na bazi P407 karakterizira kratko vrijeme zadržavanja na mjestu primjene zbog brzog otapanja u vodenim medijima i biološkim tekućinama. Zbog toga se P407 često kombinira s bioadhezivnim polimerima kao što su karbopol, natrijev alginat, hijaluronska kiselina i kitozan čime se omogućuje poboljšanje čvrstoće, bioadhezivnosti i kontinuiteta isporuke lijeka uslijed duljeg vremena zadržavanja gela na mjestu primjene (88, 89).

1.9. HIJALURONSKA KISELINA

Hijaluronska kiselina (HA) prirodni je ugljikohidratni polimer prisutan u čitavom tijelu čovjeka. U većim koncentracijama tvori izvanstanični matriks vezivnog tkiva, sinovijalne tekućine i drugih vitalnih tkiva poput staklastog tijela oka, hrskavice i pupčane vrpce. Međutim, više od 50 % ukupno prisutne količine HA u organizmu nalazi se upravo u koži, pa se koža smatra njezinim najznačajnijim rezervoarom (90). Jedna je od glavnih komponenti dermisa, a prisutna je i u epidermisu. Preko CD44 receptora veže se za izvanstanični prostor i regulira diferencijaciju keratinocita (91, 92). Sastoji se od ponavljajućih disaharidnih jedinica glukuronske kiseline i N-acetil glukozamina. Topljiva je u vodi i ima sposobnost vezanja velike količine vode (1 g HA može vezati 6 L vode) (93).

Zbog svojih specifičnih učinaka, HA se koristi u oftalmologiji, reumatologiji i dermatologiji. Česti je sastojak punila/filera koji se koriste u estetskoj kirurgiji, ali se koristi i kao nosač djelatnih tvari u topikalnim formulacijama (94). Juvéderm[®], jedan od vodećih proizvoda na bazi HA koji se nalazi na tržištu, široko se koristi za korekciju bora i nabora na licu te korekciju usana. Nakon njegovog ubrizgavanja ispod površine kože integrira se u dermalni sloj kože te privlači i veže molekule vode. Na taj način pruža volumen i punoću koži u trajanju od 6 do 12 mjeseci (95).

HA se koristi u kozmetičkim proizvodima zbog viskoelastičnih i odličnih bioadhezivnih i biokompatibilnih svojstva. Nalazi se u pripravcima za sunčanje jer zbog svoje sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala štiti kožu od štetnog djelovanja ultraljubičastog (UV) zračenja. Prisutnost HA u topikalnim pripravcima pokazuje jedinstven potencijal u lokalnoj isporuci lijeka na kožu. Omogućuje djelatnim tvarima da prođu kroz vanjsku kožnu barijeru nakon čega tvore depo u epidermisu, ograničavajući njihovu sistemsku apsorpciju (96). Nadalje, HA osigurava viskoznost formulacije te olakšava lokaliziranu primjenu i kontinuirano oslobađanje lijeka. Hidrogelovi na bazi HA dobro prijanjaju na površinu kože, hidratiziraju kožu i poboljšavaju permeaciju lijeka (97).

Istraživanja su pokazala povećano zadržavanje diklofenaka u epidermisu u obliku topikalnog pripravka na bazi HA (41 %) u odnosu na kontrolnu formulaciju na bazi pufera (25 %) (98). Pokazano je da se nanokristali slabo topljivog lijeka mogu uklopiti u hidrogel hijaluronske kiseline te da se na taj način značajno potiče oslobađanje lijeka i permeacija u kožu u usporedbi sa suspenzijom lijeka. Također je utvrđeno da polimerna mreža hidrogela sprječava aglomeraciju nanokristala (97).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovog rada je tehnološki razvoj i biofarmaceutska karakterizacija dermalnoga terapijskoga sustava s nanokristalima AZA za individualizaciju liječenja indiciranih kožnih bolesti.

Topikalna terapija predstavlja najpovoljniji izbor u liječenju kožnih oboljenja jer osigurava visoku koncentraciju lijeka na oboljelom području kože (99). Unatoč velikom napretku u topikalnom liječenju kožnih bolesti, konvencionalni topikalni pripravci su često nedovoljno učinkoviti, a njihovo usavršavanje predstavlja veliki izazov. Nedostatak većine topikalnih pripravaka su neželjene reakcije nastale uslijed sistemske apsorpcije lijeka i lokalne iritacije kože. Stoga je cilj naprednih topikalnih terapijskih sustava za liječenje kožnih bolesti učinkovita i ciljana dostava lijeka na oboljelo područje kože, uz minimalne iritacije i sistemske apsorpcije. U tome nanosustavi poput nanokristala lijeka pokazuju izvrstan potencijal (100).

Tehnologija nanokristala inovativni je, vrlo obećavajući i često korišteni pristup za povećanje biorasploživosti hidrofobnih djelatnih tvari (53). Prednosti nanokristala slabo topljivih lijekova, uključujući povećanu topljivost, brzinu otapanja i adhezivnost, rezultiraju povećanom permeacijom djelatne tvari u kožu i duljim zadržavanjem na mjestu primjene (101).

Danas su na tržištu dostupni brojni lijekovi s nanokristalima djelatne tvari indicirani za liječenje hiperkolesterolemije, hipertenzije, astme, postoperativnog sprječavanja odbacivanja presatka i drugi. Osim toga, nanokristali djelatne tvari su prisutni i u raznim kozmetičkim proizvodima dostupnim na tržištu poput nanokristala cinkovog oksida ili titanovog dioksida u proizvodima za zaštitu od UV zračenja ili nanokristala rutina s tzv. *anti-ageing* svojstvima (101).

S obzirom na to da je AZA slabo topljiva u vodi i da je u odobrenim lijekovima i komercijalno dostupnim pripravcima prisutna u visokim, 15-20 % (*m/m*), koncentracijama, zbog čega često uzrokuje iritaciju kože u pacijenata, može se očekivati da bi joj se nanonizacijom i povećanjem topljivosti i brzine otapanja povećala dermalna raspoloživost. Time bi se mogao postići terapijski učinak pri nižim dozama te manje izražene nuspojave poput iritacije kože. Uz to bi nanonizacija mogla omogućiti uklapanje AZA u hidrofilne podloge, poput hidrogelova, koje su prikladnije za liječenje akne i rozaceje za koje je AZA indicirana te pridonose boljoj adherenciji pacijenata i ishodima liječenja. S ciljem povećanja topljivosti, biorasploživosti i smanjenja iritacijskog potencijala AZA, istraživani su brojni inovativni terapijski sustavi za dermalnu primjenu poput mikroemulzijskih sustava, tekućih

kristala, lipidnih nanovezikula, etosoma i ciklodekstrina (9–13). Do sada nije u dostupnoj literaturi pronađen niti jedan objavljeni rad, odnosno podatci o razvoju nanokristala AZA. Stoga postoji opravdani razlog za razvojem nanokristala AZA.

Hidrogelovi kao trodimenzionalne polimerne mreže s velikim sadržajem vode prikladni su kao nosači nanokristala i terapijski sustavi za dermalnu primjenu. Temperaturno osjetljivi hidrogelovi omogućuju jednostavnu primjenu te lokaliziranu i produljenu isporuku lijeka, što može rezultirati smanjenjem broja potrebnih doza i nuspojava. HA kao humektans povoljno utječe na hidrataciju kože i permeaciju lijeka te pridonosi viskoznosti formulacije odnosno kontroliranom oslobađanju lijeka. Stoga uklapanje nanokristala AZA u temperaturno osjetljivi hidrogel obogaćen HA predstavlja obećavajući pristup povećanju terapijske učinkovitosti AZA uz smanjenje nuspojava, odnosno poboljšanju ishoda liječenja, na dobrobit bolesnika i zdravstvenog sustava u cjelini.

U okviru razvoja funkcionalnoga temperaturno osjetljivog hidrogela s nanokristalima AZA specifični ciljevi uključuju: (i) pripravu i karakterizaciju nanokristala AZA i hidrogela za njihovo uklapanje koji može osigurati lokaliziranu dostavu i produljeno oslobađanje AZA, s povoljnim utjecajem na hidrataciju kože i permeaciju lijeka i (ii) ispitivanje djelotvornosti optimalnog pripravka u bolesnika s blagim oblikom vulgarne akne i rozacejom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

U ovom radu korišteni su azelatna kiselina i Pluronic[®] F-127 proizvođača Sigma-Aldrich, Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka), polisorbat 60 i hijaluronska kiselina kozmetička proizvođača Kemig (Zagreb, Hrvatska), Skinoren[®] krema proizvođača Bayer (Zagreb, Hrvatska).

Dinatrijev hidrogen fosfat dodekahidrat nabavljen je od proizvođača Kemika (Zagreb, Hrvatska), kalijev dihidrogen fosfat od proizvođača Gram-Mol (Zagreb, Hrvatska), fosforna kiselina od proizvođača Merck-Millipore (Billerica, Sjedinjene Američke Države).

Acetonitril i metanol nabavljeni su od proizvođača Merck-Millipore (Darmstadt, Njemačka).

Poliamidne membrane veličine pora 0,45 μm nabavljene su od Sartorius Stedim Biotech (Steinheim, Njemačka). Membrane od regenerirane celuloze (0,2 μm) nabavljene su od Whatmana (Freiburg, Njemačka).

Corneofix[®] F20 ljepljive trake površine 4 cm² nabavljene su od proizvođača Courage + Khazaka electronic GmbH (Köln, Njemačka).

Sve kemikalije korištene u ispitivanjima bile su analitičkog stupnja čistoće. Sve kemikalije i otapala korištena za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC) bile su kromatografskog stupnja čistoće. Voda korištena u ispitivanjima bila je pročišćena voda.

3.2. METODE

3.2.1. Izrada suspenzije nanokristala AZA

a) Metoda niskoenergetskog vlažnog mljevenja

Suspenzije nanokristala AZA pripremljene su metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja u laboratorijskim uvjetima. Proces mljevenja odvijao se u komori za mljevenje što je predstavljala staklena bočica okruglog dna dimenzija 12×35 mm, u koju je dodana netom prije napravljena suspenzija AZA u pročišćenoj vodi, uz stabilizaciju polisorbatom 60 (P60). Kao medij za mljevenje korištena je smjesa kuglica izrađenih od itrijem stabiliziranog cirkonijevog oksida različitih raspona dimenzija (0,1 mm, 0,2 mm i 0,4-0,6 mm), a prisutnih u jednakim udjelima. Uzorci su mljeveni pri sobnoj temperaturi na magnetskoj miješalici (Magnetic stirrer MIX 15 eco, Berlin, Njemačka) uz dodatak pet cilindričnih magnetskih mješača dimenzija 6×10 mm. Ukupno je pripremljeno šest uzoraka u kojima je varirana koncentracija P60 (0,3; 0,5; 1,0 i 2,0 %, *m/m*) i ukupna masa suspenzije (2,0-7,5 g), dok je koncentracija AZA u svim uzorcima bila stalna (2,0 %, *m/m*). Uzorci su pripremljeni pri sljedećim stalnim procesnim parametrima: omjer kuglica i ukupne mase suspenzije iznosio je 1:4 (*m/m*), brzina mljevenja 350 okr/min i vrijeme mljevenja 24 h. Uzorci su pripremljeni u triplikatu, a njihov sastav prikazan je u Tablici 3.

Tablica 3. Uzorci suspenzija nanokristala AZA pripremljeni metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja i njihov sastav, ukupna masa i korištena masa kuglica za mljevenje.

Uzorak	AZA (%, <i>m/m</i>)	P60 (%, <i>m/m</i>)	Masa suspenzije (g)	Masa kuglica za mljevenje (g)
leNS-AZA-1	2,0	2,0	2,0	0,6
leNS-AZA-2	2,0	1,0	2,0	0,6
leNS-AZA-3	2,0	0,5	2,0	0,6
leNS-AZA-4	2,0	0,3	2,0	0,6
leNS-AZA-5	2,0	0,3	5,0	1,2
leNS-AZA-6	2,0	0,3	7,5	1,8

AZA, azelatna kiselina; P60, polisorbata 60; leNS-AZA, suspenzija nanokristala AZA pripremljena metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja.

b) Metoda visokoenergetskog vlažnog mljevenja

Suspenzije nanokristala AZA pripravljene su metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja u kugličnom mlinu Dyno-Mill (Willy A. Bachofen AG, Švicarska). Vodena otopina koja je sadržavala 0,3 % (*m/m*) stabilizatora P60 miješana je 10 min na magnetskoj miješalici (IKA, Njemačka) pri brzini od 600 okr/min. U otopinu je dodana AZA u koncentraciji od 5,0 % (*m/m*) te je suspenzija miješana Silverson LM5 homogenizatorom (Silverson Machines Inc., Sjedinjene Američke Države) dodatne 3 min pri brzini od 2000 okr/min. Mljevenje je provedeno u mlinu uz dodatak 55 ml itrijem stabiliziranih cirkonijevih kuglica raspona dimenzija 0,1-0,2 mm (Silibeads[®] Pharma tip ZY-P, Sigmund Linder GmbH, Njemačka). Procesni parametri mljevenja AZA bili su sljedeći: brzina mljevenja 4000 okr/min, vrijeme mljevenja 180 min i temperatura 25±2 °C. Sumarni prikaz sastava suspenzije nanokristala AZA prikazan je u Tablici 4.

Tablica 4. Sastav suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja.

Uzorak	AZA (%, <i>m/m</i>)	P60 (%, <i>m/m</i>)	Masa suspenzije (g)	Volumen kuglica za mljevenje (ml)
heNS-AZA	5,0	0,3	300,0	55,0

AZA, azelatna kiselina; P60, polisorbat 60; heNS-AZA, suspenzija nanokristala AZA pripravljena metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja.

3.2.2. Određivanje veličine čestica i indeksa polidisperznosti AZA nanosuspenzija

Veličina čestica i indeks polidisperznosti (engl. *polydispersity index*, PDI) AZA nanosuspenzija određeni su metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS) koja se još naziva i fotonskom korelacijskom spektroskopijom (engl. *photon correlation spectroscopy*, PCS). Metoda se temelji na analizi modulacije intenziteta raspršene laserske svjetlosti koja prolazi kroz koloidnu disperziju u ovisnosti o vremenu. DLS mjeri hidrodinamičku veličinu čestica. Za mjerenja su korišteni uređaji Zetasizer HSA 3000 i Zetasizer NaNO SZ (Malvern Instruments, Ujedinjeno Kraljevstvo). Mjerenja su provedena u triplicatu, pri temperaturi od 25 °C.

3.2.3. Sušenje smrzavanjem

3.2.3.1. Sušenje leNS-AZA i suspenzije neprocesuirane AZA s P60

Sušenje smrzavanjem (engl. *freeze drying*) suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja (leNS-AZA) i suspenzije neprocesuirane AZA s P60 provedeno je korištenjem uređaja Christ Alpha 1-4 (Martin Christ GmbH, Njemačka). Uzorci od 4 ml suspenzije nanokristala AZA ili suspenzije neprocesuirane AZA s P60 u staklenim bočicama za liofilizaciju su zamrznuti pri temperaturi od -20 °C te potom liofilizirani pri vakuumu od 150 µbar tijekom 24 h. Liofilizati su čuvani u dobro zatvorenim bočicama u eksikatoru pri 4 °C.

3.2.3.2. Sušenje heNS-AZA

Sušenje smrzavanjem suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja provedeno je korištenjem uređaja AdVantage Pro bench-top (SP Scientific, Sjedinjene Američke Države). Uzorci od 4 ml suspenzije nanokristala AZA u staklenim bočicama za liofilizaciju zamrzavani su do temperature od -55 °C tijekom 180 min (brzina snižavanja temperature bila je 1,5 °C/min). Nakon toga je slijedilo zagrijavanje uzorka do temperature od -30 °C tijekom 180 min te ponovno hlađenje uzorka do temperature -55 °C tijekom 180 min (brzina mijenjanja temperature bila je 2,5 °C/min). Primarno sušenje (sublimacija vode) provedeno je postupnim povećanjem temperature u komori za sušenje za 10 °C u rasponu temperatura od -55 °C do 0 °C. Sušenje je trajalo 35 h pri vakuumu od 150 µbar. Pri tome su se temperature od -45 °C, -35 °C i -25 °C zadržavale po 600 min, a temperature od -15 °C, -5 °C i 0 °C po 300 min. Sekundarno sušenje provedeno je pri temperaturi od 10 i 20 °C, pri vakuumu od 100 µbar tijekom 180 min. Nakon sušenja, bočice s uzorcima dobro su zatvorene i pohranjene u eksikator na temperaturu od 4 °C.

3.2.4. Termička analiza

3.2.4.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

Diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) provedena je korištenjem uređaja Perkin-Elmer Diamond (Perkin Elmer, Inc., Sjedinjene Američke Države). Uređaj je prije početka analize kalibriran indijem (čistoća 99,98 %; talište 156,61 °C i ΔH_{fus} 28,71 Jg⁻¹). Uzorci mase 3-5 mg vagani (Mettler XS195 Dual Range) su u aluminijske posude za zagrijavanje s probušenim poklopcem (da se omogući isparavanje ostatnog otapala pri zagrijavanju). Uzorci su zagrijavani brzinom od 10 °C/min u temperaturnom rasponu od 25 °C do 125 °C u atmosferi dušika (25 ml/min).

Udio kristalične frakcije lijeka u uzorcima (engl. *relative degree of drug crystallinity*, RDC) izračunat je prema jednadžbi 4. (102):

$$\text{RDC} = \frac{\Delta H_{\text{uzorka}}}{\Delta H_{\text{lijeka}}} \times 100 \% \quad (4)$$

gdje ΔH_{uzorka} i ΔH_{lijeka} predstavljaju izmjerene vrijednosti entalpije taljenja AZA redom u analiziranom uzorku (normirane s obzirom na sadržaj AZA u uzorku) i neprocesuirane AZA. Mjerenja su provedena u triplicatu, a relativna standardna devijacija vrijednosti kristaličnosti je manja od 2,5 %.

3.2.4.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)

Infracrveni spektri snimljeni su na Perkin-Elmer Frontier spektrofotometru u rasponu valnih brojeva od 4000 do 400 cm⁻¹, uz rezoluciju od 4 cm⁻¹ i akumulaciju od 32 snimke. Uzorci za analizu pripremljeni su miješanjem 1 mg čvrstog uzorka AZA nanokristala (liofilizata) i 100 mg spektroskopski čistog KBr. Uzorci su komprimirani u pastilu korištenjem hidrauličke preše uz tlak 10 kN cm⁻².

3.2.5. Izrada hidrogelova

a) Prazni hidrogelovi (bez uklopljenog lijeka)

Hidrogelovi su pripremljeni mehaničkim miješanjem Pluronic[®]-a F-127 (P) i hijaluronske kiseline (HA) (PHA hidrogelovi) uporabom FagronLab[™] PRO unguatora (Scheßlitz, Njemačka). Pri tome je koncentracija P varirana (10, 15 ili 20 %, *m/m*), dok je koncentracija HA u svim uzorcima bila stalna (1 %, *m/m*). Hidrogelovi su pripremljeni na sljedeći način: u originalnu FagronLab[™] posudicu izvagano je 50 g pročišćene vode, zatim 10, 15 ili 20 g P, 1 g HA i na kraju preostala količina vode do 100 g. Tako pripremljeni uzorci su, bez daljnje obrade, pohranjeni tijekom 12 h, najčešće preko noći, pri temperaturi od 4 °C. Potom su uzorci miješani na unguatoru 18 min pri sobnoj temperaturi. Tijekom miješanja su se izmjenjivali intervali od 340 s miješanja brzinom od 600 okr/min s intervalima od 20 s miješanja brzinom od 1400 okr/min (ukupno 6 intervala). Pripremljeni uzorci hidrogelova i njihov sastav su prikazani u Tablici 5.

b) Hidrogelovi s uklopljenom AZA

Hidrogelovi s uklopljenom AZA pripremljeni su na isti način kao i odgovarajući prazni hidrogelovi s tim da je AZA uklapan u količini koja je potrebna za postizanje masenog udjela od 10 % AZA u svakom uzorku hidrogela u: (i) liofiliziranom obliku suspenzije nanokristala AZA pripremljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja (leLNS-AZA) i (ii) liofiliziranom obliku suspenzije nanokristala AZA pripremljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja (heLNS-AZA).

Uzorak leLNS-AZA koji je uklapan u hidrogelove po sastavu odgovara uzorku leNS-AZA-5 (Tablica 3.). Suspenzija je pripremljena mljevenjem ukupne mase od 5,0 g suspenzije s udjelom od 2,0 % (*m/m*) AZA i 0,3 % (*m/m*) P60 te 1,2 g kuglica za mljevenje. Liofilizat suspenzije nanokristala AZA pripremljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja, heLNS-AZA, uklapan je u hidrogel koji je korišten u kliničkim ispitivanjima. U tu svrhu suspenzija je pripremljena mljevenjem ukupne mase od 300,0 g suspenzije s udjelom od 5,0 % (*m/m*) AZA i 0,3 % (*m/m*) P60 te 55,0 ml kuglica za mljevenje.

Pripremljeni uzorci hidrogelova i njihov sastav prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Pripravljene uzorci hidrogelova i njihov sastav.

Hidrogel	P (%, m/m)	HA (%, m/m)	P60 u leLNS-AZA-PHA ili heLNS-AZA-PHA (%, m/m)	AZA u leLNS-AZA (%, m/m)	AZA u heLNS-AZA (%, m/m)
P-10	10	-	-	-	-
P-15	15	-	-	-	-
P-20	20	-	-	-	-
PHA-10	10	1	-	-	-
PHA-15	15	1	-	-	-
PHA-20	20	1	-	-	-
leLNS-AZA-PHA-10	10	1	1,5	10	-
leLNS-AZA-PHA-15	15	1	1,5	10	-
leLNS-AZA-PHA-20	20	1	1,5	10	-
heLNS-AZA-PHA-15	15	1	0,6	-	10

P, Pluronic® F-127; HA, hijaluronska kiselina; P60, polisorbat 60; AZA, azelatna kiselina; leLNS-AZA, liofilizirani oblik suspenzije nanokristala azelatne kiseline pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja; heLNS-AZA, liofilizirani oblik suspenzije nanokristala azelatne kiseline pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja; PHA, Pluronic® F-127/hijaluronska kiselina hidrogel; leLNS-AZA-PHA, PHA hidrogel s uklopljenom AZA u obliku liofilizata suspenzije nanokristala azelatne kiseline pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja; heLNS-AZA-PHA, PHA hidrogel s uklopljenom AZA u obliku liofilizata suspenzije nanokristala azelatne kiseline pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja. Suspenzija nanokristala AZA pripravljena metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja (leNS-AZA) dobivena je mljevenjem ukupne mase od 5,0 g suspenzije s udjelom od 2,0 % (m/m) AZA i 0,3 % (m/m) P60 te 1,2 g kuglica za mljevenje. Liofilizat, leLNS-AZA je odgovarajući suhi oblik te suspenzije. Suspenzija, heNS-AZA, je pripravljena mljevenjem ukupne mase od 300,0 g suspenzije s udjelom od 5,0 % (m/m) AZA i 0,3 % (m/m) P60 te 55 ml kuglica za mljevenje. Liofilizat, heLNS-AZA je odgovarajući suhi oblik te suspenzije.

3.2.6. Ispitivanje intrinzične brzine otapanja AZA

Ispitivanje intrinzične brzine otapanja AZA provedeno je korištenjem uređaja za ispitivanje intrinzične brzine otapanja djelatnih tvari (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Sjedinjene Američke Države). Uzorak (približne mase 100 mg) je komprimiran hidrauličnom prešom (Carver, Wabash, Sjedinjene Američke Države) uz primjenu sile kompresije od 1,5 tona tijekom 10 s kako bi se dobio glatki kompaktni pelet površine 0,5 cm². Ispitivanje je provedeno u 400 ml degaziranog fosfatnog pufera (pH 2,0). Temperatura je podešena na 32 °C, a brzina okretanja lopatica je iznosila 50 okr/min. U određenim vremenskim intervalima uzorkovano je po 1 ml otopine. Koncentracija AZA određena je HPLC metodom, a opisana je u poglavlju 3.2.11.

3.2.7. Reološka karakterizacija hidrogelova

Reološka karakterizacija provedena je na Modularnom kompaktnom reometru MCR 102 (Anton Par GmbH, Austrija). Temperatura donje ploče kontrolirana je pomoću Peltier sustava za kontrolu temperature s točnošću od 0,01 °C. Dobiveni podaci su analizirani i obrađeni pomoću RheoCompass™ Light softvera (Anton Par). Pri svakom mjerenju korišten je svježi uzorak hidrogela. Vrijeme ekvibracije uzoraka bilo je 15 min. Sva mjerenja napravljena su u triplikatu.

3.2.7.1. Test promjene temperature

Test promjene temperature (engl. *temperature sweep test*) proveden je pri konstantnoj smičnoj deformaciji od 0,1 % i frekvenciji od 1 Hz. Ispitivanje je provedeno u temperaturnom rasponu od 20-40 °C, pri čemu se sustav zagrijavao brzinom od 0,5 °C/min. Korišteno je mjerno tijelo paralelnih ploča promjera 50 mm (engl. *parallel plate*, PP-50) s razmakom između ploča od 1,2 mm.

3.2.7.2. Ispitivanje profila viskoznosti

Profili viskoznosti izmjereni su rotacijskim testom. Pri mjerenju profila viskoznosti PHA hidrogelova korišteno je konusno mjerno tijelo promjera 50 mm (engl. *cone plate*, CP-50) s fiksnim razmakom od 0,102 mm od donjeg mjernog tijela, ploče. Mjerenja profila viskoznosti PHA hidrogelova s uklopljenom AZA provedena su pomoću mjernog tijela PP-50, s razmakom od donje ploče od 1,2 mm. Svi su uzorci mjereni pri temperaturi od 32 °C. Kao relevantan je uzet raspon viskoznosti unutar raspona brzina smicanja od 0,01-100 s⁻¹, kroz 21 mjernu točku.

3.2.7.3. Test promjene frekvencije

Test promjene frekvencije (engl. *frequency sweep test*) proveden je pri konstantnoj smičnoj deformaciji od 0,1 % i temperaturi od 32 °C. Korišteno je mjerno tijelo PP-50 s razmakom između ploča od 1,2 mm.

3.2.8. Ispitivanje oslobađanja AZA iz hidrogelova *in vitro*

Ispitivanje oslobađanja AZA iz hidrogelova provedeno je na uređaju za ispitivanje oslobađanja djelatnih tvari (Agilent 708-DS Dissolution Apparatus, Ujedinjeno Kraljevstvo) korištenjem imerzijskih ćelija (Enhancer Cell™, Agilent) površine 4 cm² u kombinaciji s aparaturom s lopaticama, posudama ravnog dna (200 ml) i mini lopaticama (Agilent). Temperatura medija za oslobađanje (0,05 M fosfatni pufer, pH 4,5) je održavana u rasponu 32,0±0,5 °C pomoću termostatirane vodene kupelji. Visina lopatica podešena je na 1 cm od površine membrane. Korištene su membrane od smjese celuloznih estera, veličine pora 0,45 μm (HAWP, Millipore). Membrane su namakane u mediju 60 min prije početka analize. Volumen donorskog odjeljka ćelije podešen je na 2 ml. U donorski odjeljak dodana je odgovarajuća količina uzorka hidrogela s AZA da popuni volumen. Zatim je preko vrha ćelije postavljena membrana te je membrana zabrtvljena i učvršćena brtvenim prstenom i prstenom za učvršćivanje. Sastavljena ćelija je unesena u posudu za ispitivanje oslobađanja, s membranom prema gore te je dodano 150 ml medija za oslobađanje. Brzina okretanja lopatica

bila je 50 okr/min. Ispitivanje oslobađanja AZA iz svih uzoraka provodilo se 8 h. U unaprijed određenim vremenskim intervalima (15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360 i 480 min) uzimani su uzorci receptorskog medija volumena 1 ml i nadomješteni svježim termostatiranim medijem jednakog sastava i volumena. Koncentracija oslobođene AZA određena je HPLC metodom (opisano u poglavlju 3.2.11.), a pri izračunu količine oslobođenog lijeka primijenjena je korekcija za kumulativno razrjeđenje uzrokovano zamjenom uzorka sa svježim medijem. Svaki uzorak hidrogela je analiziran u triplikatu. Vrijednosti količine oslobođenog lijeka su prikazane kao srednje vrijednosti \pm SD.

3.2.9. Teksturna analiza

Ispitivanje razmazivosti provedeno je na uređaju za analizu teksture (Texture Analyzer TA.XT Plus C, Stable Micro System Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo) pri temperaturi od 20 ± 5 °C. Ispitivani uzorak stavljen je u konusni spremnik nakon čega je konusni disk promjera 4,5 cm potisnut kroz uzorak brzinom od 3 mm/s do dubine od 23 mm te potom uklonjen. Podatak o čvrstoći uzorka izračunat je iz površine ispod krivulje prema grafičkom prikazu primijenjene sile u određenom vremenu i rada pri opterećenju silama smicanja, korištenjem Texture Exponent programa. Mjerenja su provedena u duplikatu pri jednakim eksperimentalnim uvjetima.

3.2.10. Ispitivanje penetracije AZA u rožnati sloj kože *in vivo*

Ispitivanje penetracije AZA iz uzoraka hidrogelova u rožnati sloj kože provedeno je tzv. *tape stripping* metodom na koži unutrašnje strane podlaktice zdravih dobrovoljaca. Od ispitanika je zatraženo da ne primjenjuju kozmetičke proizvode ili proizvode za njegu kože 12 h prije ispitivanja. Prije početka ispitivanja proveli su 30 min u prostoriji u kojoj je rađeno ispitivanje kako bi se postigla puna aklimatizacija. Uzorci, u dozi od 5 mg/cm^2 AZA (103), nanošeni su špatulom na prethodno označenu površinu kože na podlaktici te nježno i ravnomjerno razmazani prstom u kapici od lateksa tijekom 30 s. Kako bi se spriječio gubitak uzorka pri razmazivanju, kapica je prethodno umočena u ispitivani uzorak pri čemu su se nabori i pore na kapici popunile. Nakon 2 h od nanošenja uzorka, površina je obrisana

maramicom, čime je uklonjen eventualni višak uzorka te je započeto nanošenje Corneofix[®] F20 ljepljivih okruglih diskova površine 4 cm² pomoću kojih se uzimao uzorak rožnatog sloja kože. Nakon nanošenja su diskovi pritisnuti valjkom da se ravnomjerno zalijepe na kožu. Diskovi su se s kože odljepljivali brzim povlačenjem s pincetom, pri čemu se je odljuštio i zaostao na disku određeni sloj rožnatoga sloja epidermisa.

Uzorci su nanošeni svakom ispitaniku u triplikatu, a uzorci rožnatog sloja su se sa svakog pojedinog područja uzastopno uzimali 12 puta ljepljivim diskovima. Svaki disk je izvagan na analitičkoj vagi s pet decimala (Mettler Toledo XS105, Zagreb, Hrvatska) prije nanošenja i neposredno nakon odljepljivanja te se je iz razlike mase odredila masa uzetoga rožnatoga sloja potrebna za izračunavanje debljine rožnatog sloja uklonjenog sa svakim diskom pomoću jednadžbe 5. (104):

$$T = \frac{d}{a \times \rho} \quad (5)$$

gdje je T debljina uklonjenog rožnatog sloja (μm), d je masa rožnatog sloja uklonjena s jednim diskom (μg), a je površina kože na koju je nanošen ispitivani uzorak (μm^2), a ρ gustoća rožnatog sloja ($10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{m}^3$). Zbrajanjem debljina rožnatoga sloja uklonjenih sa svakim diskom dobiva se ukupna debljina rožnatog sloja uklonjena tijekom ispitivanja.

Na svakom odljuštenom disku za svaki uzorak (ukupno po 11 diskova po uzorku jer se prvi disk odbaci zbog eventualne prisutnosti dijela ispitivanog uzorka na površini kože), odnosno u 11 odljuštenih slojeva rožnatoga sloja određen je sadržaj AZA. Svaki disk je stavljen u svoju epruvetu za centrifugu tako da je površina diska obložena ljepilom, s odljepljenim uzorkom rožnatog sloja, okrenuta prema unutrašnjosti. U epruvetu je dodano 1,5 ml smjese metanola i vode u omjeru 50:50 (v/v). Nakon 15 min soniciranja u kupelji (Bandelin Sonorex Digitec, Berlin, Njemačka) i 5 min centrifugiranja (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka) pri 4000 okr/min, uzorci medija/supernatanta su pohranjeni u vijale za HPLC analizu koncentracije AZA, metodom opisanom u poglavlju 3.2.11. Ukupna je količina izračunata na sljedeći način: količina AZA na svakoj traci zbrajana je za svako pojedino ispitivano područje na površini kože i izračunata je srednja vrijednost i odstupanje od srednje vrijednosti (standardna devijacija) za svaki uzorak.

Iz rezultata analize koncentracije AZA u svakom pojedinom odljuštenom uzorku rožnatog sloja određena je količina AZA po jediničnoj površini. Koncentracijski profil AZA u rožnatome sloju dobiven je iz ovisnosti količine AZA po jediničnoj površini o dubini penetracije rožnatog sloja kože za svaki uzorak.

3.2.11. Određivanje sadržaja tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

HPLC analiza provedena je pomoću uređaja Agilent 1100 Series (Agilent Technologies) korištenjem Waters Xterra RP18 kolone unutarnjeg promjera 4,6 mm × 100 mm i veličine čestica 3,5 μm (Waters, Milford, MA, Sjedinjene Američke Države) te izokratnim eluiranjem. Mobilna faza sastojala se od smjese fosfatnog pufera (pH 2,0) i acetonitrila u omjeru 75:25 (v/v). Pufer je prije upotrebe filtriran kroz 0,2 μm celulozni membranski filter. Brzina protoka mobilne faze bila je 1,2 ml/min, a temperatura kolone 35 °C. UV detekcija provedena je pri valnoj duljini od 210 nm.

Pripremljena je matična otopina standarda AZA u metanolu. Otopine standarda pripremljene su u duplikatu razrjeđivanjem matične otopine fosfatnim puferom pH 2,0, fosfatnim puferom pH 4,5 i smjesom metanola i vode u omjeru 50:50 (v/v). Otopine su injektirane naizmjenično kroz svaku sekvencu s uzorcima najmanje pet puta. Volumen injektiranja bio je 50 μl, a uzorci su analizirani nerazrijeđeni.

Prikladnost sustava procijenjena je prema sljedećim kriterijima: relativno standardno odstupanje (RDS) odgovora detektora za svako injektiranje otopine standarda kroz sekvencu nije bilo veće od 2,0 %, a faktor razvlačenja pika AZA nije bio veći od 2,0.

3.2.12. Ispitivanje učinkovitosti hidrogela s nanokristalima AZA

Učinkovitost optimalnog uzorka hidrogela s nanokristalima AZA ispitana je u usporedbi s referentnim pripravkom, komercijalno dostupnom Skinoren® kremom. Ispitivanje je provedeno na bolesnicima Sveučilišne kliničke bolnice u Mostaru, a kojima su dijagnosticirane VA blagog do umjerenog oblika ili papulopustularni oblik rozaceje. Nakon postavljanja dijagnoze, ponuđeno im je sudjelovanje u ispitivanju prilikom čega su cilj i svrha ispitivanja objašnjeni usmenim i pismenim putem. Obrazac dobrovoljnog informiranog

pristanka potpisao je svaki bolesnik (i/ili njegov roditelj ili skrbnik) koji je odlučio sudjelovati u ispitivanju.

Bolesnici su podijeljeni u dvije skupine prema kožnom oboljenju: (i) 60 bolesnika adolescentske do mlade životne dobi s blagim do umjerenim oblikom VA i (ii) 60 bolesnika srednje do starije životne dobi kojima je dijagnosticiran papulopustularni oblik rozaceje. Svaka je skupina (i, ii) nasumice podijeljena na dvije podskupine od kojih je jedna koristila ispitivani uzorak, a druga referentni uzorak. Od bolesnika se tražilo da nanose uzorak na problematični dio kože dva puta dnevno (ujutro i navečer) na prethodno očišćenu i suhu kožu. Ispitivanje se provodilo tijekom 8 tjedana s detaljnim pregledima prije početka liječenja te nakon 4. i 8. tjedna liječenja.

U ispitivanje nisu bili uključeni bolesnici koji imaju drugi oblik akni (teški nodozni ili cistični), bolesnici s težim oblikom rozaceje (rinoforma), bolesnici koji boluju od drugih kožnih oboljenja poput psorijaze i različitih oblika dermatitisa, bolesnici na sistemskoj terapiji (npr. primjena izotretinoina), bolesnici koji imaju alergiju na jedan ili više sastojaka u uzorcima te trudnice i dojilje.

Ispitivanje je provedeno kao dvostruko slijepo kako bi se uklonila pristranost ispitivača i bolesnika u procjeni djelotvornosti uzorka. Djelotvornost ispitivanog uzorka u liječenju navedenih kožnih oboljenja pratio je isti ispitivač tijekom cijelog vremenskog perioda ispitivanja.

Ispitivanje je odobrila predstojnica Klinike za kožne i spolne bolesti Sveučilišne kliničke bolnice u Mostaru, Etičko povjerenstvo Sveučilišne kliničke bolnice u Mostaru i Povjerenstvo za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Studija je provedena u skladu s načelima Helsinške deklaracije.

3.2.12.1. Procjena djelotvornosti

a) Vulgarne akne

Djelotvornost ispitivanog uzorka u liječenju VA procijenjena je prema smanjenju broja lezija u određenom vremenskom periodu. Na prvom pregledu izbrojan je ukupni broj lezija na licu, odnosno na dijelovima lica na kojima se akne najčešće pojavljuju (čelo, obrazi i brada) i ustanovljen je broj upalnih i broj neupalnih lezija. Također je kliničko stanje svakog

pojednog bolesnika fotodokumentirano. Postupak je ponovljen nakon 4. i 8. tjedna od početka primjene lijeka.

b) Rozaceja

Djelotvornost ispitivanog uzorka u liječenju rozaceje procijenjena je prema smanjenju broja papula i pustula te prema promjeni stupnja izraženosti eritema i teleangiektazija. Smanjenje prisutnih papula/pustula praćeno je njihovim brojanjem, a smanjenje izraženosti eritema i teleangiektazija praćeno je kroz 4 kategorije koje uključuju (i) njihovu odsutnost, (ii) blagi, (iii) umjereni i (iv) jaki oblik. Bolesnici su detaljno pregledani na početku liječenja prilikom čega je ustanovljen broj papula i pustula i procijenjena izraženost eritema i teleangiektazija. Postupak je ponovljen nakon 4 i 8 tjedana kontinuirane primjene lijeka. Pri svakom pregledu je kliničko stanje svakog bolesnika fotodokumentirano.

3.2.13. Statistička analiza podataka

Za statističku analizu upotrijebljena je jednosmjerna analiza varijance (engl. *one-way ANOVA test*) nadopunjena multiparametrijskim Turkey-evim post-hoc testom. Obrada podataka provedena je pomoću programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, Sjedinjene Američke Države). Reološka obrada podataka provedena je pomoću Rheoplus softvera prije daljnje analize Microsoft Excel 16.2. i GraphPad Prism 7 programa.

Pri statističkoj obradi podataka kliničkog ispitivanja (VA) podaci su pohranjeni u bazu podataka MS Excel 2000, a korišten je statistički program SPSS (SPSS za Windows 17.0, SPSS, Chicago, IL, Sjedinjene Američke Države). Student t-test i Chi-Square test korišteni su za analizu sociodemografskih podataka. Za izračun srednjeg broja lezija prije početka liječenja i za usporedbu rezultata između ispitivanih skupina korišten je student t-test. Učinkovitost liječenja VA u određenoj skupini bolesnika analizirana je pomoću t-testa na usporednim uzorcima. Raspodjela uzoraka ispitana je pomoću Kolmogorov-Smirnovog testa.

Statistička obrada podataka kliničkog ispitivanja (rozaceja) provedena je u programu IBM SPSS Statistics inačica 25 (Armonk, NY: IBM Corp). Rezultati su iskazani kao apsolutne i relativne frekvencije (broj i postotak), aritmetička sredina i standardna devijacija (M i SD) ili kao medijan (C) s kvartilima (Q1-Q3) ili interkvartilnim rasponom (IQR). Za

testiranje statističke značajnosti uočenih razlika korišteni su χ^2 test (u nedostatku očekivanih frekvencija korišten je Fisherov egzaktni test), t-test za nezavisne uzorke, Mann-Whitney-ev U test te višesmjerna ANOVA. Normalnost distribucije podataka provjerena je Shapiro-Wilko-vim testom.

Granica statističke značajnosti postavljena je na $p=0,05$. p vrijednosti koje se nisu mogle iskazati do tri decimalna mjesta iskazane su kao $p < 0,001$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Prvi dio rezultata i rasprave ovog rada odnosi se na fizičko-kemijsku karakterizaciju uzoraka nanokristala AZA i hidrogelova u koje su nanokristali AZA uklopljeni. U tu svrhu suspenzija nanokristala AZA pripravljena je metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja. Nanokristali AZA u liofiliziranom obliku uklopljeni su u hidrogel da bi se potvrdila osnovna hipoteza rada da se nanokristali AZA mogu pripremiti i uklopiti u hidrofilnu podlogu poput hidrogela sastavljenog od poloksamera i hijaluronske kiseline, koja je karakterizirana prikladnim reološkim svojstvima te može osigurati kontinuiranu isporuku lijeka u kožu i njegovu bolju dermalnu bioraspoloživost. Izrada nanokristala AZA metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja predstavlja dodatnu vrijednost jer je primjenjiva u ljekarni, što bi omogućilo izradu magistralnih pripravaka s nanokristalima AZA. Nanokristalima AZA određena je veličina čestica i PDI. Suhi oblik suspenzije nanokristala AZA izrađen je tehnikom sušenja smrzavanjem, a nanokristalima AZA određena su termička svojstva i intrinzična brzina otapanja. Liofilizirani oblik suspenzije nanokristala AZA, u količini koja odgovara masenom udjelu od 10 % AZA, uklopljen je u hidrogel koji se sastojao od P i HA pri čemu je koncentracija P varirana u rasponu od 10-20 % (*m/m*), dok je koncentracija HA u svim uzorcima bila stalna (1 %, *m/m*). Hidrogelovi su karakterizirani s obzirom na reološka svojstva, brzinu oslobađanja AZA iz hidrogela *in vitro* te je ispitana penetracija AZA u rožnati sloj kože *in vivo*.

Drugi dio rezultata i rasprave ovog rada odnosi se na izradu nanokristala AZA u većem mjerilu metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja i uklapanje u hidrogel koji je po sastavu odgovarao hidrogelu iz prvog dijela ovog rada koji je pokazao prikladna reološka svojstva, željeni profil oslobađanja *in vitro* te penetraciju AZA u rožnati sloj kože *in vivo*. Hidrogel s nanokristalima AZA pripremljen u većem mjerilu karakteriziran je s obzirom na teksturna svojstva i učinkovitost u liječenju kožnih oboljenja za koje je AZA indicirana, VA i rozaceje, a rezultati su uspoređeni s komercijalno dostupnom Skinoren[®] kremom.

4.1. SUSPENZIJE NANOKRISTALA AZA PRIPREMLJENE METODOM NISKOENERGETSKOG VLAŽNOG MLJEVENJA

Nanokristali AZA pripremljeni su metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja. Postupak vlažnog mljevenja često se upotrebljava u industrijskoj proizvodnji nanokristala djelatnih tvari i zahtjeva upotrebu sofisticirane opreme. Stoga je cilj bio istražiti metodu niskoenergetskog vlažnog mljevenja za pripremu nanokristala AZA u ljekarni i izradu magistralnih pripravaka. Korištena je metoda vlažnog mljevenja prema Romero i suradnicima (105), uz minimalnu modifikaciju.

Istraživanja su pokazala da je takav jednostavni postupak vlažnog mljevenja učinkovit kao i komercijalno dostupni kuglični mlinovi i visokotlačni homogenizatori u nanonizaciji tvari poput rezorcinola, hesperidina, askorbil palmitata i apigenina (105). Osim toga, učinkovito je primijenjen u pripremi kationske formulacije nanokristala koja sadrži deksametazon acetat i polimiksin za oftalmološku primjenu (106) i u pripremi nanokristala pramipeksola u cilju poboljšanja njegove transdermalne isporuke nakon topikalne primjene (107).

Mljevenje AZA provedeno je uz stabilizaciju pomoću P60. P60 je neionska PAT koja djeluje kao sterički stabilizator adsorpcijom na površinu nanokristala djelatne tvari. Na taj način povećava stabilnost nanokristala djelatne tvari sprječavajući agregaciju i Ostwaldovo zrenje (108).

Veličina čestica djelatne tvari parametar je koji je važno poznavati pri razvoju lijekova jer utječe na oblikovanje i stabilnost ljekovitog pripravka, ali i njegov terapijski učinak. Istraživanje Pelikha i suradnika (109) pokazalo je da dermalna penetracija djelatne tvari ovisi o veličini čestica djelatne tvari, kao i da nanokristali djelatne tvari, zbog svojih specifičnih svojstava pokazuju dobiti pri dermalnoj primjeni. Uz to, poznato je da PAT mogu izazvati iritaciju kože ako su u ljekovitom pripravku prisutni u povećanoj koncentraciji (110). Stoga je pri izradi nanokristala AZA cilj bio dobiti minimalnu dostižnu veličinu nanokristala uz prisutnost najmanje moguće koncentracije P60.

4.1.1. Veličina čestica i PDI nanokristala AZA pripremljenih metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja

Ukupno je pripravljeno šest uzoraka suspenzija nanokristala AZA (u triplikatu). Uzorci su bili mliječno bijelog izgleda. Koncentracija AZA bila je u svim uzorcima stalna (2,0 %, *m/m*), dok je koncentracija P60 varirana u rasponu od 0,3-2,0 % (*m/m*). Rezultati veličine nanokristala AZA i PDI prikazani su u Tablici 6.

Veličina nanokristala AZA u pripremljenim uzorcima bila je manja od 130 nm, a PDI manji ili oko 0,3. U uzorku u kojem je bila prisutna najveća koncentracija P60 (2,0 %, *m/m*), leNS-AZA-1, izmjerena veličina nanokristala AZA iznosila je $38,3 \pm 1,3$ nm (PDI $0,264 \pm 0,042$). Smanjenjem koncentracije P60 blago se povećala veličina nanokristala AZA. Pri tome je veličina nanokristala AZA uz koncentraciju P60 od 0,3 % (*m/m*) iznosila $58,8 \pm 2,5$ nm (PDI $0,247 \pm 0,059$) (leNS-AZA-4). Dobivena veličina nanokristala AZA usporediva je s veličinom čestica ciklosporina A, hesperidina i apigenina koji su obrađeni u sličnim uvjetima (110, 111). Više nego dvostruko povećanje ukupnog volumena medija za mljevenje u odnosu na leNS-AZA-4 uzorak s proporcionalnim povećanjem udjela kuglica za mljevenje, a pri jednakim koncentracijama AZA i P60 (leNS-AZA-5), izmjerena je gotovo jednaka veličina nanokristala AZA ($59,2 \pm 3,8$ nm) uz uži raspon njihovih veličina (PDI $0,142 \pm 0,112$). Međutim, daljnje povećanje ukupnog volumena medija za mljevenje i kuglica za mljevenje (leNS-AZA-6) uzrokovalo je smanjenje učinkovitosti procesa mljevenja što je u konačnici rezultiralo dvostruko većim nanokristalima AZA s veličinom od $117,7 \pm 10,9$ nm (PDI $0,372 \pm 0,468$). Zbog toga je leNS-AZA-5 optimalni uzorak koji se koristio u daljnjem istraživanju. Uzorak je sadržavao P60 (0,3 %, *m/m*) i AZA (2,0 %, *m/m*) u omjeru 0,15:1 što je u skladu s literaturnim podacima koji navode da je optimalni omjer PAT i djelatne tvari u rasponu omjera od 0,05:1 do 0,5:1 (113).

Tablica 6. Veličina čestica i PDI nanokristala AZA pripremljenih metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja.

Uzorak	Veličina nanokristala (nm)	PDI
leNS-AZA-1	38,3±1,3	0,264±0,042
leNS-AZA-2	40,3±1,6	0,207±0,082
leNS-AZA-3	61,7±2,8	0,222±0,095
leNS-AZA-4	58,8±2,5	0,247±0,059
leNS-AZA-5	59,2±3,8	0,142±0,112
leNS-AZA-6	117,7±10,9	0,372±0,468
leNS-AZA-5-FD*	117,3±2,4	0,363±0,102

leNS-AZA, suspenzija nanokristala azelatne kiseline (AZA) pripravljena metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja; *rekonstituirani leNS-AZA-5 uzorak suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja nakon liofilizacije. Prikazane vrijednosti veličine čestica i indeksa polidisperznosti (PDI) nanokristala AZA predstavljaju srednju vrijednost ± standardna devijacija (SD) (n=3).

4.1.2. Sušenje smrzavanjem

Postupkom sušenja smrzavanjem izrađeni su suhi oblici suspenzije neprocesuirane AZA i P60 (L-npAZA) i leNS-AZA-5 suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja, leLNS-AZA, u svrhu povećanja stabilnosti nanokristala u odnosu na one u suspenziji. Pri tome je bilo važno da se liofilizirani oblik nanokristala AZA može lako rekonstituirati u suspenziju s veličinom nanokristala AZA blizu njihove izvorne veličine.

Nakon rekonstitucije liofiliziranog oblika suspenzije nanokristala AZA (leNS-AZA-5-FD), veličina nanokristala AZA iznosila je $117,3 \pm 2,4$ nm (PDI $0,363 \pm 0,102$) u odnosu na izvornih $59,2 \pm 3,8$ nm (PDI $0,142 \pm 0,112$) (Tablica 6.).

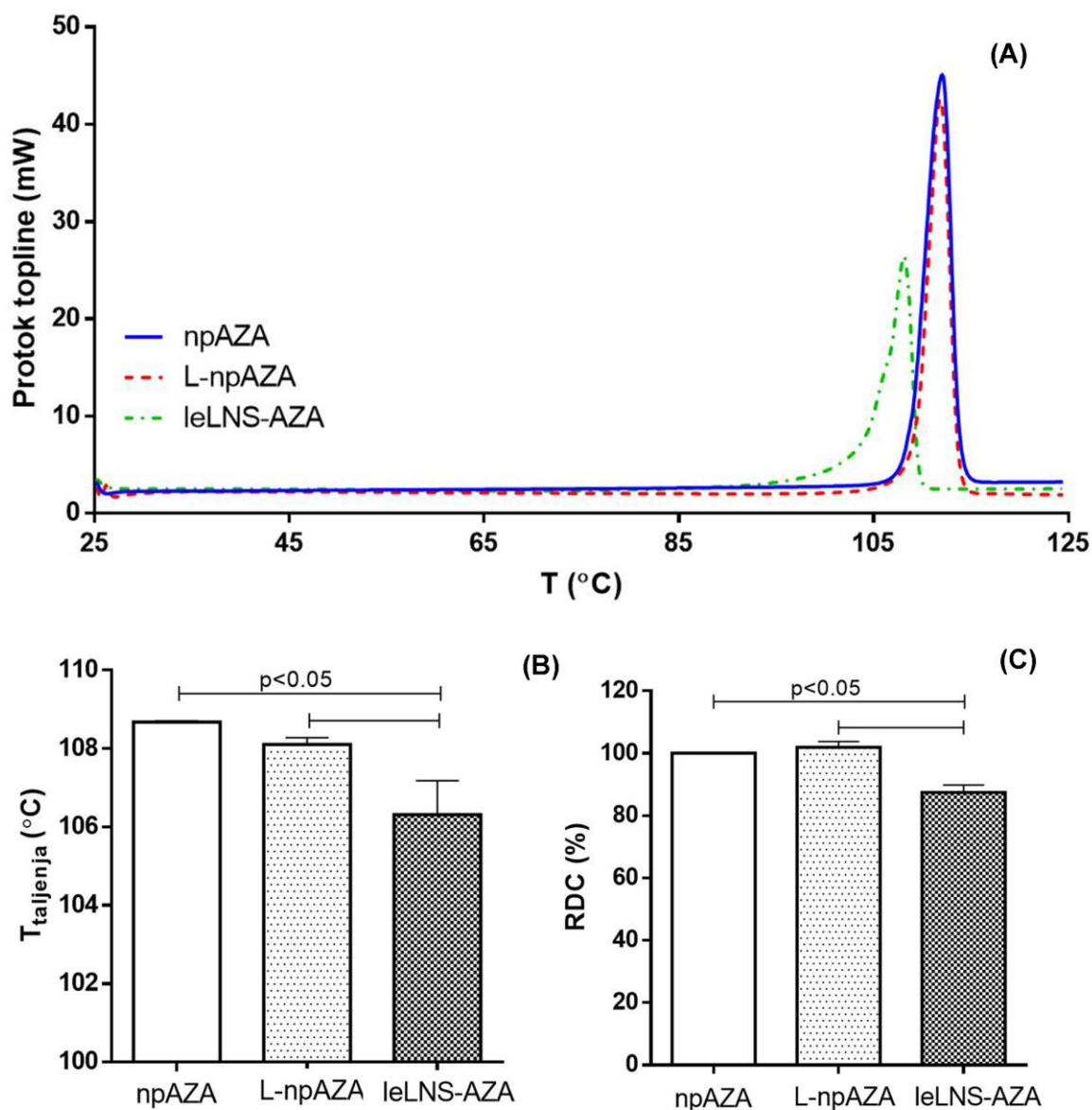
Povećanje veličine nanokristala AZA i širi raspon veličina mogli bi se pripisati aglomeraciji nanokristala AZA koja je nastupila tijekom procesa sušenja smrzavanjem. Povećanje veličine nanokristala AZA prihvatljivo je jer je u skladu s ranije objavljenim podacima o veličini nanokristala pripremljenih postupkom vlažnog mljevenja koje su bile u rasponu od 100-300 nm (49, 113).

4.2. TERMIČKA SVOJSTVA

4.2.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

Kako bi se potvrdila kristaličnost nanoniziranog oblika AZA i postotni udio kristalične frakcije, provedena je DSC analiza. Različiti kristalni oblici djelatne tvari mogu imati različite točke taljenja koje su određene ovom metodom.

DSC analiza provedena je na: (i) neprocesuiranom obliku AZA (npAZA), (ii) liofiliziranom obliku suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja (leLNS-AZA) te (iii) liofiliziranom obliku suspenzije neprocesuirane AZA i P60 (L-npAZA) kako bi se ispitaio utjecaj postupka sušenja smrzavanjem i prisutnost P60 na termička svojstva AZA. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 7.



Slika 7. Karakterizacija čvrstog stanja nanokristala azelatne kiseline (AZA): (A) DSC termogrami neprocesuiranog oblika AZA (npAZA), liofiliziranog oblika suspenzije neprocesuirane AZA i polisorbata 60 (L-npAZA) i liofiliziranog oblika suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja (leLNS-AZA), (B) temperatura taljenja AZA, (C) relativni udio kristalične frakcije (RDC) AZA.

Termogram npAZA pokazuje oštri endotermni pik pri temperaturi od 108,7 °C (Slika 7A) i entalpijom taljenja od 219,34 J/g, što je u skladu s rezultatima brojnih istraživanja (12, 114, 115). Termogram i temperatura taljenja L-npAZA su usporedivi s npAZA što pokazuje da postupak sušenja smrzavanjem i prisutnost P60 nisu utjecali na svojstva suhog oblika lijeka. Termogram leLNS-AZA pokazuje pik taljenja pri nešto nižoj temperaturi čime je potvrđena kristalna struktura AZA (Slika 7B). DSC analiza termičkih svojstava nanokristala

AZA u skladu je s drugim istraživanjima nanokristala djelatnih tvari i pripisuju se smanjenju veličine čestica u nanometarski raspon, što je posljedično dovelo do povećanja slobodne energije u sustavu i smanjenja energije rešetke (engl. *lattice energy*) (117–119).

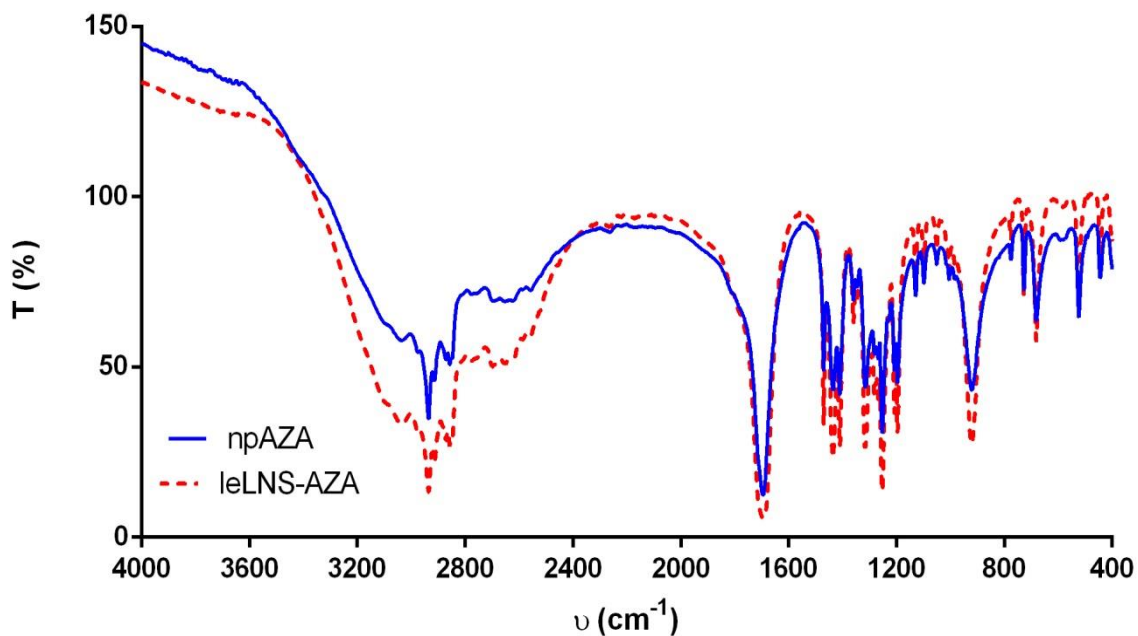
Blago širenje pika taljenja AZA uočeno je kod leLNS-AZA uzorka i može se pripisati interakciji nanokristala AZA i P60 adsorbiranog na njihovoj površini, a koja je nastala tijekom analize (119, 120).

Nadalje, rezultati pokazuju značajno smanjenje udjela kristaličnosti leLNS-AZA uzorka i ukazuju na prisutnost amorfne strukture od 13 % (Slika 7C). To bi mogla biti posljedica utjecaja visokih sila smičnog naprezanja na površini nanokristala koje su nastale tijekom procesa mljevenja (121).

4.2.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)

Za dodatnu analizu termičkih svojstava nanokristala AZA provedena je FTIR spektroskopska analiza na: (i) neprocesuiranom obliku AZA (npAZA) i (ii) liofiliziranom obliku suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja (leLNS-AZA).

Rezultati su pokazali široki spektar apsorpcije AZA u rasponu valnih brojeva od 3300-2500 cm^{-1} što odgovara preklapanju vibracija istezanja apsorbirajućih C-H i OH skupina, a prikazani su na Slici 8.



Slika 8. FTIR spektri azelatne kiseline (AZA) u rasponu valnih brojeva od 4000 cm^{-1} -400 cm^{-1} . npAZA, neprocesuirani oblik AZA; leLNS-AZA, liofilizirani oblik suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja.

Pik na valnom broju 1704 cm^{-1} odgovara vibracijama istezanja karboksilne skupine, dok se pikovi na valnim brojevima 1439 cm^{-1} , 1254 cm^{-1} i 927 cm^{-1} mogu pripisati savijanju u ravnini C-O-H skupine, C-O vibracijama savijanja (deformacijskim vibracijama) i savijanju izvan ravnine O-H skupine (122).

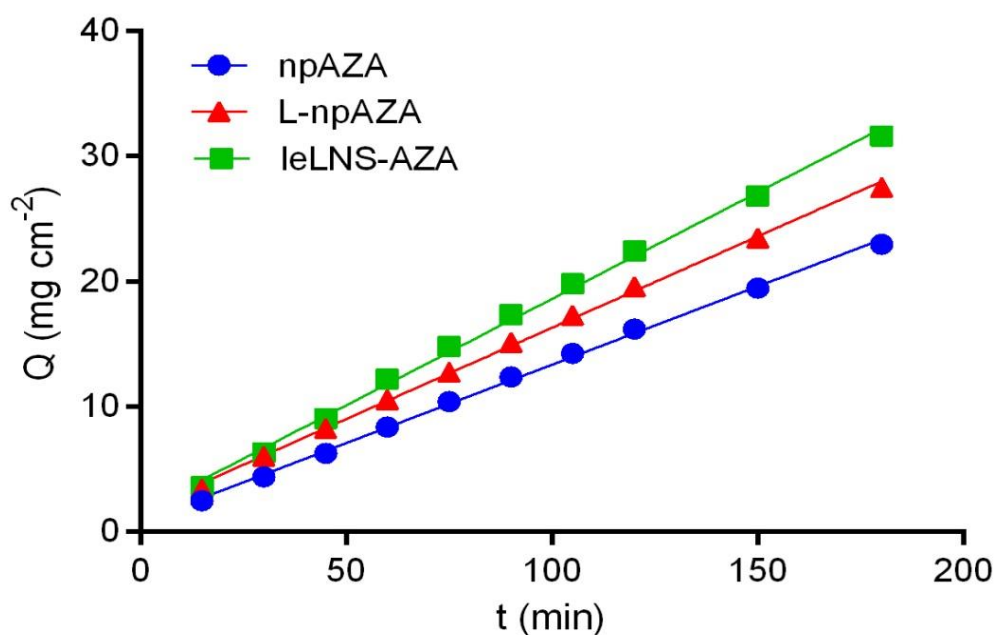
Uzorci npAZA i leLNS-AZA pokazuju usporedive FTIR spektre što, uz DSC analizu, dodatno potvrđuje da postupak mljevenja nije utjecao na svojstva AZA u suhom obliku.

4.3. INTRINZIČNA BRZINA OTAPANJA

Poznavanje intrinzične brzine otapanja djelatne tvari od velike je važnosti pri razvoju formulacija slabo topljivih djelatnih tvari. Smatra se da je, uz topljivost, glavni parametar usko povezan s apsorpcijom lijeka, a prema tome i terapijskim učinkom (123).

Intrinzična brzina otapanja ispitana je: (i) neprocesuiranom obliku AZA (npAZA), (ii) liofiliziranom obliku suspenzije neprocesuirane AZA i P60 (L-npAZA) i (iii) liofiliziranom obliku suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja (leLNS-AZA), a koja po sastavu odgovara uzorku leNS-AZA-5 (Tablica 3.). Suspenzija neprocesuirane AZA i P60 pripravljena je u ukupnoj masi od 5,0 g suspenzije s udjelom od 2,0 % (*m/m*) AZA i 0,3 % (*m/m*) P60, a suspenzija nanokristala AZA pripravljena je mljevenjem suspenzije jednakog sastava. Pri tome je veličina nanokristala AZA u suspenziji iznosila $59,2 \pm 3,8$ nm, a veličina nanokristala AZA u rekonstituiranom uzorku suspenzije nanokristala AZA nakon liofilizacije iznosila je $117,3 \pm 2,4$ nm (leNS-AZA-5-FD).

Ispitivanje je provedeno u fosfatnom puferu (pH 2,0) koji je termostatiran i održavan pri temperaturi od 32 °C kako bi bio u skladu s fiziološkim uvjetima na koži, a pH vrijednost 2,0 osigurala je prisutnost AZA u potpuno neioniziranom obliku. Profili otapanja AZA prikazani su na Slici 9.



Slika 9. Profili ovisnosti količine otopljene azelatne kiseline (AZA) po jediničnoj površini o vremenu. Neprocesuirani oblik AZA (npAZA), liofilizirani oblik suspenzije neprocesuirane AZA i polisorbata 60 (L-npAZA) i liofilizirani oblik suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja (leLNS-AZA). Fosfatni pufer pH 2,0; temperatura 32 °C.

Usporedbom profila otapanja prikazanih na Slici 9., uočljivo je da se AZA najbrže otapa iz liofiliziranog oblika suspenzije nanokristala pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja, leLNS-AZA, što se može pripisati nanonizaciji (38), odnosno povećanoj površinskoj energiji (118). Izračunate vrijednosti intrinzične brzine otapanja (engl. *intrinsic dissolution rate*, IDR) iznose $0,125 \pm 0,001 \text{ mg min}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ za npAZA, $0,146 \pm 0,003 \text{ mg min}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ za L-npAZA i $0,170 \pm 0,004 \text{ mg min}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ za leLNS-AZA.

Brzina otapanja L-npAZA povećana je za 16,8 % u odnosu na brzinu otapanja npAZA, što bi se moglo pripisati prisutnosti površinski aktivne tvari, P60, odnosno boljeg močenja tvari (124). Nadalje, povećanje brzine otapanja leLNS-AZA u odnosu na npAZA iznosi 36,0 %, a 16,4 % u odnosu na L-npAZA.

4.4. KARAKTERIZACIJA *IN SITU* HIDROGELOVA S NANOKRISTALIMA AZA

Nakon nanonizacije, nanokristali lijeka za topikalnu primjenu uklapaju se u uobičajene dozirne oblike poput krema, gelova i masti. Istraživanje Wei i suradnika (97) pokazalo je da nanokristali povećavaju brzinu oslobađanja slabo topljivih djelatnih tvari te da se mogu uklopiti u hidrogel HA pri čemu se poboljšava permeacija lijeka u kožu u usporedbi sa suspenzijom lijeka. Usto, utvrđeno je da polimerna mreža hidrogela sprječava aglomeraciju nanokristala lijeka.

Pripravljene su uzorci hidrogelova koji su se sastojali od P u koncentraciji od 10-20 % (*m/m*) (P hidrogelovi), hidrogelovi koji su se sastojali od P (10-20 %, *m/m*) i HA (1 %, *m/m*) (PHA hidrogelovi) i PHA hidrogelovi u koje je uklopljen liofilizirani oblik suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja (leLNS-AZA-PHA hidrogelovi). Pri tome je liofilizirani oblik suspenzije nanokristala AZA uklopljen u količini koja je potrebna za postizanje masenog udjela od 10 % AZA. Detaljan sastav svih uzoraka hidrogelova prikazan je u Tablici 5.

Karakterizacija hidrogelova obuhvaćala je: (i) reološka svojstva pri čemu je određena temperatura pri kojoj sustav počinje gelirati za PHA hidrogelove s koncentracijom P od 10, 15 ili 20 % (*m/m*) i leLNS-AZA-PHA hidrogelove s koncentracijom P od 15 ili 20 % (*m/m*), viskoznost P, PHA i leLNS-AZA-PHA hidrogelova s koncentracijom P od 10, 15 ili 20 % (*m/m*) te je određena čvrstoća i stabilnost leLNS-AZA-PHA hidrogelova s koncentracijom P od 15 ili 20 % (*m/m*), (ii) ispitivanje brzine oslobađanja AZA *in vitro* iz leLNS-AZA-PHA hidrogelova s koncentracijom P od 10, 15 ili 20 % (*m/m*), (iii) ispitivanje penetracije AZA u rožnati sloj kože *in vivo* iz leLNS-AZA-PHA hidrogelova s koncentracijom P od 15 ili 20 % (*m/m*).

4.4.1. Reološka karakterizacija hidrogelova

Poznavanje reoloških svojstva polučvrstih topikalnih pripravaka je neophodno obzirom da mogu znatno utjecati na rasprostiranje i vrijeme zadržavanja pripravka na površini kože, brzinu oslobađanja lijeka iz topikalne podloge, stabilnost pripravka, a samim time i na terapijsku učinkovitost i adherenciju bolesnika (97, 124). Provedena istraživanja navode da su reološka svojstva pripravka određena sastavom podloge te da zamjena samo jednog konstituenta može značajno utjecati na reološko ponašanje pripravka (126).

Reološka karakterizacija obuhvatila je primjenu oscilacijskih i rotacijskih testova. Od oscilacijskih testova, koji omogućuju ispitivanje svojstava ljekovitog pripravka bez narušavanja njegove strukture, provedeni su test promjene frekvencije i određivanje temperature pri kojoj sustav prelazi iz *sol* u *gel* stanje ($T_{\text{sol-gel}}$). Rotacijski test omogućuje evaluaciju ponašanja sustava pri djelovanju vanjske sile koja narušava njegovu strukturu. Tim testom određen je profil viskoznosti ispitivanog uzoraka u odnosu na primijenjenu brzinu smicanja te daje uvid u ponašanje sustava pri primjeni/razmazivanju na kožu.

Uzorci za analizu reoloških svojstava bili su: (i) prazni hidrogelovi koji su se sastojali samo od P (P hidrogelovi) ili P i HA (PHA hidrogelovi) i (ii) PHA hidrogelovi s uklopljenom AZA u obliku liofilizata suspenzije nanokristala pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja (leLNS-AZA-PHA hidrogelovi).

4.4.1.1. Test promjene temperature

Kod temperaturno osjetljivih, *in situ* gelirajućih sustava, od iznimne je važnosti odrediti temperaturu pri kojoj sustav prelazi iz tekućeg u viskozno stanje, tzv. *sol-gel* fazni prijelaz ($T_{\text{sol-gel}}$). Ako je $T_{\text{sol-gel}}$ veća od fiziološke temperature na mjestu primjene, formulacija će pri primjeni ostati u *sol* obliku i uzrokovat će kratko vrijeme zadržavanja pripravka na mjestu primjene (127). Stoga je $T_{\text{sol-gel}}$ parametar koji se odnosi na učinkovitost i sigurnost kao i adherenciju bolesnika jer utječe na točnost doziranja povezanu s lakoćom primjene i vremenom zadržavanja pripravka na mjestu primjene.

Test promjene temperature proveden je u temperaturnom rasponu od 20-40 °C, pri čemu je $T_{\text{sol-gel}}$ određena prema promjeni profila viskoznosti uzorka u odnosu na temperaturu. $T_{\text{sol-gel}}$ određena je praznim PHA hidrogelovima koji su sadržavali P u koncentraciji od 10 %

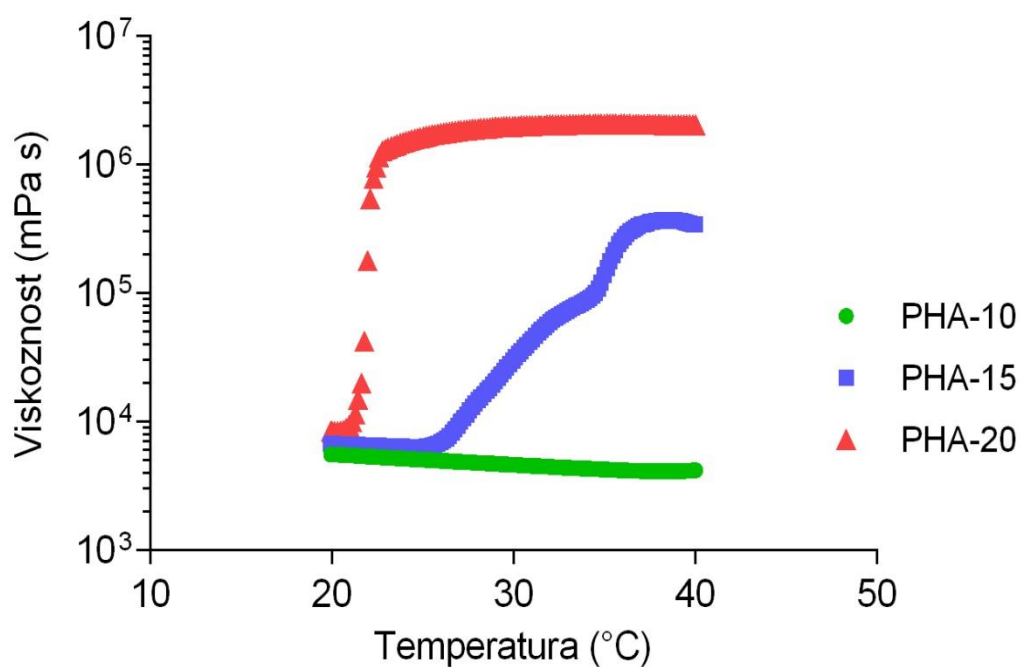
(*m/m*) (PHA-10), 15 % (*m/m*) (PHA-15) ili 20 % (*m/m*) (PHA-20) i PHA-15 i PHA-20 hidrogelovima s uklopljenom AZA u obliku liofilizata suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja u količini koja odgovara masenom udjelu od 10 % (*m/m*) AZA (leLNS-AZA-PHA-15 i leLNS-AZA-PHA-20). Profili viskoznosti uzoraka hidrogelova u ovisnosti o temperaturi prikazani su na Slici 10. i Slici 11.

Rezultati pokazuju da PHA-10 hidrogel u promatranom temperaturnom rasponu ima nisku viskoznost te se nalazi u tzv. *sol* obliku. Povećanjem koncentracije P s 10 % (*m/m*) na 15 ili 20 % (*m/m*) povećava se viskoznost hidrogelova. Očekivano, uzorak s većom koncentracijom P (20 %, *m/m*) pokazao je veću viskoznost tijekom cijelog promatranog temperaturnog raspona (20-40 °C). Njegova $T_{\text{sol-gel}}$ je približno 20 °C, dok je uzorak s manjom koncentracijom P (15 %, *m/m*) pokazao $T_{\text{sol-gel}}$ pri približno 25 °C (Slika 10.).

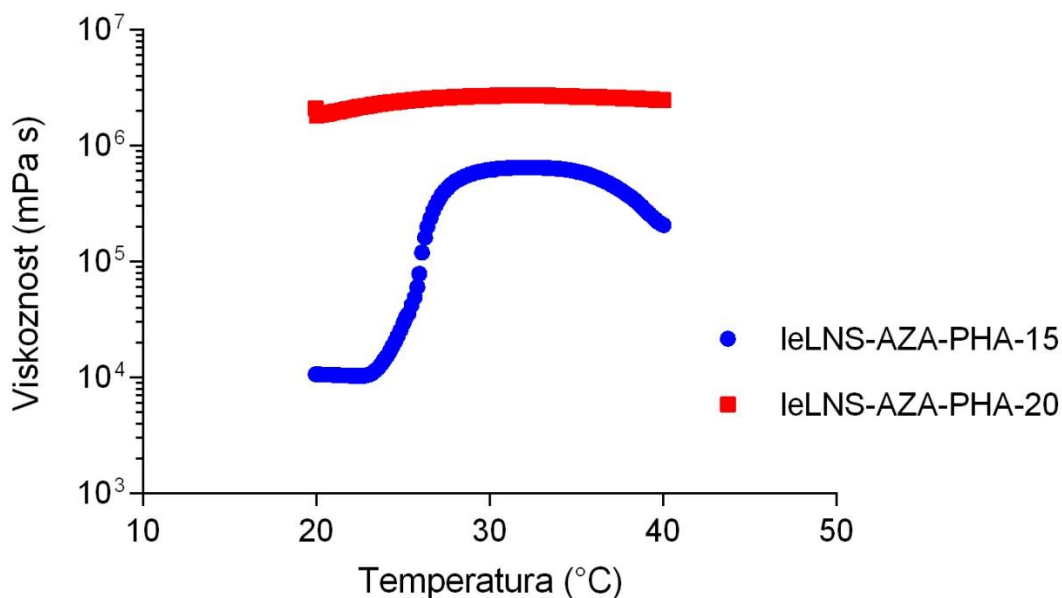
Na Slici 11. prikazani su profili viskoznosti PHA hidrogelova s koncentracijom P od 15 ili 20 % (*m/m*) u koje je uklopljen leLNS-AZA. Rezultati su pokazali da uklapanje leLNS-AZA u PHA hidrogelove nije imalo velik utjecaj na $T_{\text{sol-gel}}$. Pri tome je $T_{\text{sol-gel}}$ leLNS-AZA-PHA-15 hidrogela bila približno 25 °C kao i kod PHA hidrogela s jednakom koncentracijom P. S druge strane, $T_{\text{sol-gel}}$ leLNS-AZA-PHA-20 hidrogela niža je od 20 °C, dok je PHA-20 hidrogel pokazao $T_{\text{sol-gel}}$ pri približno 20 °C.

Literaturni podaci navode da bi $T_{\text{sol-gel}}$ temperaturno osjetljivih, *in situ* gelirajućih sustava za dostavu lijeka trebala biti u rasponu temperatura od 25 °C do 37 °C (127, 128). Takvi se pripravci čuvaju u hladnjaku (4 °C) pri čemu se nalaze u *sol* obliku, a prilikom nanošenja na kožu prelaze u *gel* oblik. Stoga je jasno da PHA i leLNS-AZA-PHA hidrogelovi s koncentracijom P od 15 % (*m/m*) pokazuju željenu temperaturu *sol-gel* faznog prijelaza.

Može se zaključiti da $T_{\text{sol-gel}}$ uzoraka hidrogelova ovisi o koncentraciji P u vodenoj otopini, odnosno povećava se sa smanjenjem njegove koncentracije, što je u skladu s literaturnim podacima (84, 129). Miješanjem P i vodene otopine dolazi do gustog pakiranja micela P u micelarnoj kubičnoj fazi (104). Mehanizam geliranja može se prilično razlikovati u prisutnosti HA i leLNS-AZA. Pri tome lanci HA mogu premostiti micelle P što dovodi do stvaranja mreže međusobno povezanih micela (131).



Slika 10. Profil viskoznosti Pluronic® F-127/hijaluronska kiselina (PHA) hidrogelova s koncentracijom Pluronic®-a F-127 od 10, 15 ili 20 % (*m/m*) u ovisnosti o temperaturi.



Slika 11. Profil viskoznosti Pluronic® F-127/hijaluronska kiselina hidrogelova s koncentracijom Pluronic®-a F-127 od 15 ili 20 % (*m/m*) i uklopljenim liofiliziranim oblikom suspenzije nanokristala azelatne kiseline pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja (leLNS-AZA-PHA) u ovisnosti o temperaturi.

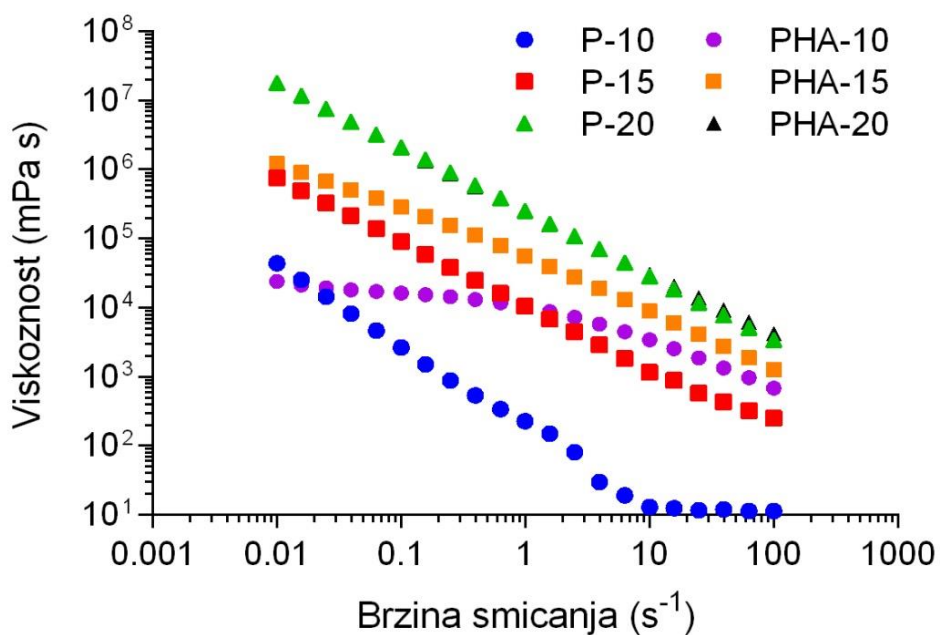
4.4.1.2. Viskoznost hidrogelova

Profili viskoznosti (engl. *flow curve*) ispitani su P, PHA i PHA hidrogelovima u koje je uklopljen liofilizirani oblik suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja, leLNS-AZA-PHA, u ovisnosti o brzini smicanja. U uzorcima je varirana koncentracija P (10-20 %, *m/m*) kako bi se ispitao utjecaj njegove koncentracije na viskoznost uzorka, dok su koncentracije HA (1 %, *m/m*) i AZA (10 %, *m/m*) u svim uzorcima bile stalne. Ispitivanje profila viskoznosti provedeno je pri temperaturi od 32 °C koja odgovara fiziološkoj temperaturi na površini kože. Kao relevantni raspon viskoznosti uzet je onaj unutar raspona brzine smicanja od 0,1 do 100 s⁻¹.

Rezultati su pokazali da je viskoznost svih ispitivanih uzoraka bila ovisna o brzini smicanja, odnosno povećanjem brzine smicanja viskoznost se smanjivala (Slike 12. i 13.). To ukazuje da su ispitivani uzorci imali ne-Newtonovsko ponašanje koje je karakteristično za pseudoplastične sustave (132). Takvo je ponašanje topikalnih pripravaka poželjno jer omogućuje da se pripravak pri primjeni vanjske sile lako razmazuje po površini kože, a ako ima mogućnost obnavljanja strukture (ako je pripravak tiksotropan) nakon prestanka djelovanja vanjske sile pripravak se zadržava na mjestu primjene.

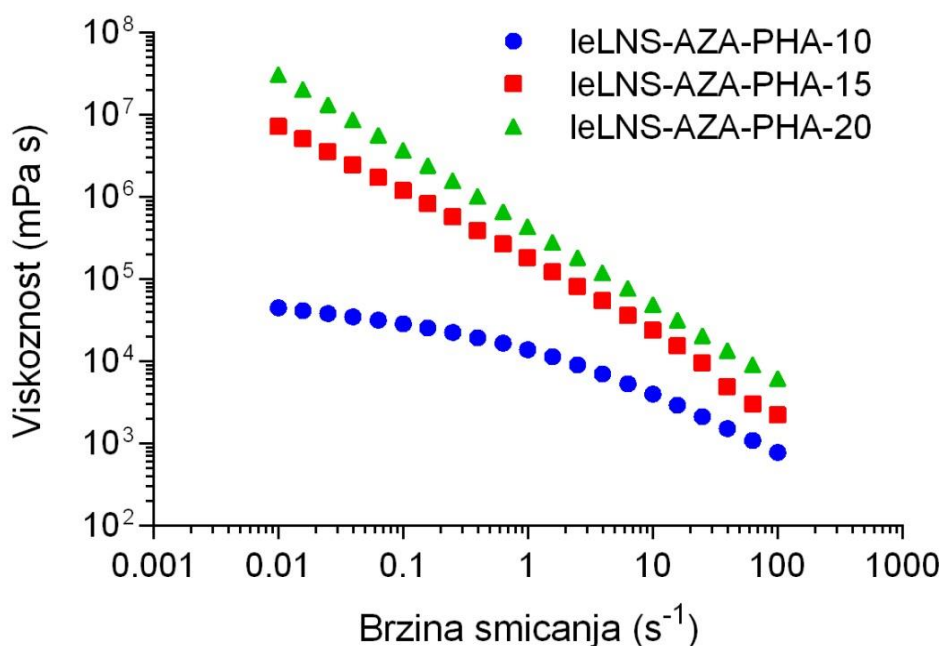
Profili viskoznosti hidrogelova pokazuju da se viskoznost povećavala s povećanjem koncentracije P i kod P i PHA hidrogelova, što je u skladu s literaturnim podacima (128). Pri brzinama smicanja do 100 s⁻¹, primijenjena sila bila je manja od sile interakcije P ili PHA micela, osim za hidrogel koji se sastojao samo od P u najmanjoj koncentraciji (10 %, *m/m*), označenog kao P-10, gdje je primijenjena sila bila veća od sile interakcije i zato je gel tekao (Slika 12.).

Dodatak HA u P hidrogelove utjecao je na viskoznost hidrogelova pri čemu je utjecaj HA rastao sa smanjenjem koncentracije P u sustavu. Najviše je utjecao na hidrogel s najmanjom koncentracijom P (10 %, *m/m*), PHA-10. Pri manjim brzinama smicanja (do 1 s⁻¹), uzorak PHA-10 pokazuje konstantnu viskoznost, dok se s povećanjem vanjske sile viskoznost smanjuje što je u skladu s ponašanjem PHA hidrogelova s većom koncentracijom P (15 ili 20 %, *m/m*) pri istim brzinama smicanja (Slika 12.).



Slika 12. Profili viskoznosti hidrogelova sastavljenih od Pluronic[®]-a F-127 (P) i Pluronic[®] F-127/hijaluronska kiselina (PHA) u ovisnosti o brzini smicanja pri temperaturi od 32 °C.

Dodatak leLNS-AZA u PHA hidrogelove, leLNS-AZA-PHA, nije imao značajan utjecaj na viskoznost hidrogelova u odnosu na prazne PHA hidrogelove. Profili viskoznosti leLNS-AZA-PHA hidrogelova prikazani su na Slici 13.



Slika 13. Profili viskoznosti Pluronic® F-127/hijaluronska kiselina hidrogelova s koncentracijom Pluronic®-a F-127 od 10, 15 ili 20 % (*m/m*) i uklopljenim liofiliziranim oblikom suspenzije nanokristala azelatne kiseline pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja (leLNS-AZA-PHA) u ovisnosti o brzini smicanja pri temperaturi od 32 °C.

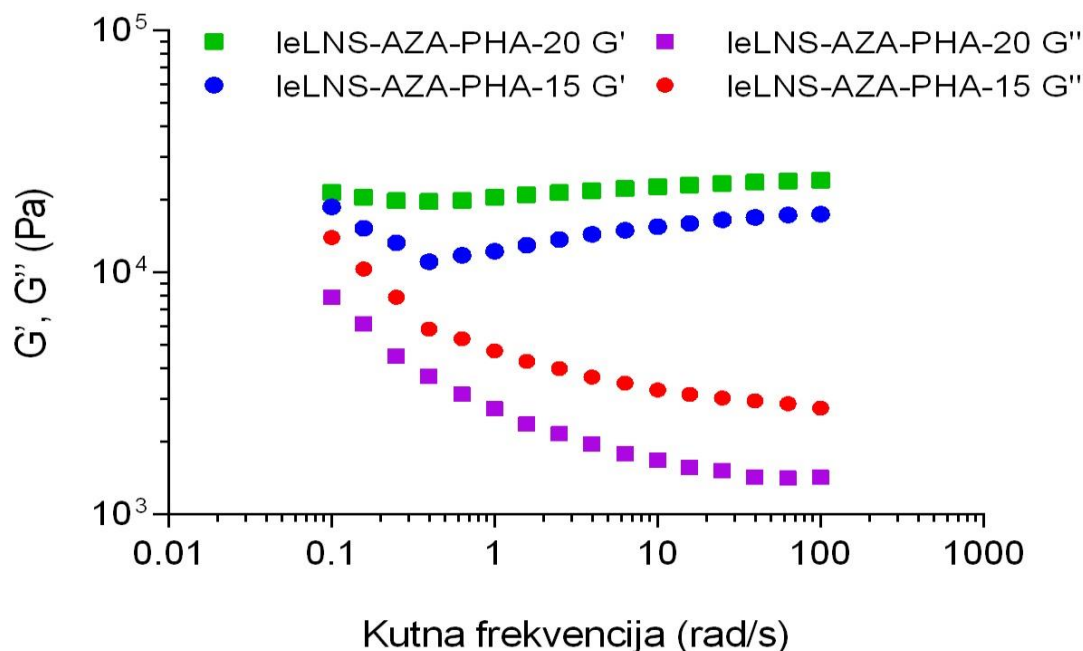
4.4.1.3. Test promjene frekvencije

Profili viskoznosti leLNS-AZA-PHA hidrogelova s koncentracijom P od 10, 15 ili 20 % (*m/m*) pokazali su da koncentracija P utječe na viskoznost, odnosno da se viskoznost hidrogela povećava s povećanjem koncentracije P. Viskoznost je ispitana: (i) praznim hidrogelovima koji su se sastojali samo od P u koncentraciji od 10-20 % (*m/m*) (P hidrogelovi), (ii) P hidrogelovima kojima je dodana HA u koncentraciji od 1 % (*m/m*) (PHA hidrogelovi), (iii) PHA hidrogelovima u koje je dodan liofilizirani oblik suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja (leLNS-AZA-PHA). Svi uzorci hidrogelova koji su sadržavali P u koncentraciji od 15 ili 20 % (*m/m*) pokazali su prikladniju viskoznost pri brzinama smicanja od 0,01 do 100 s⁻¹ u odnosu na uzorke hidrogelova koji su sadržavali P u koncentraciji od 10 % (*m/m*). Zbog toga su leLNS-AZA-PHA hidrogelovi s koncentracijom P od 15 ili 20 % (*m/m*) odabrani za daljnja ispitivanja te im je određena čvrstoća i stabilnost.

Testom promjene frekvencije moguće je odrediti čvrstoću i stabilnost topikalnih pripravaka. Promatra se promjena modula pohrane (G') i modula gubitka (G'') o kutnoj frekvenciji (ω). Pri tome modul G' predstavlja elastični dio viskoelastičnog ponašanja i opisuje kruto stanje pripravka, a modul G'' predstavlja viskozni dio viskoelastičnog ponašanja i opisuje tekuće stanje pripravka.

Uzorci za ispitivanje G' i G'' o kutnoj frekvenciji bili su PHA hidrogelovi s uklopljenim liofiliziranim oblikom suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja, leLNS-AZA-PHA hidrogelovi. U uzorcima je bio prisutan P u koncentraciji od 15 ili 20 % (*m/m*) kako bi se ispitaio utjecaj njegove koncentracije na čvrstoću i stabilnost hidrogela. Test je proveden pri temperaturi od 32 °C koja odgovara fiziološkoj temperaturi na površini kože. Uzorci nisu uspoređeni s profilima ovisnost viskoelastičnih modula o kutnoj frekvenciji praznih PHA hidrogelova. Obzirom da je ispitivanje profila viskoznosti o brzini smicanja pokazalo da dodatak leLNS-AZA u PHA hidrogelove nije utjecao na viskoznost hidrogelova, može se pretpostaviti da ne bi utjecao ni na čvrstoću i stabilnost hidrogelova što bi trebalo potvrditi daljnjim ispitivanjima.

Ovisnost viskoelastičnih modula o kutnoj frekvenciji analiziranih uzoraka prikazana je na Slici 14.



Slika 14. Ovisnost modula pohrane (G') i modula gubitka (G'') Pluronic[®] F-127/hijaluronska kiselina hidrogelova s koncentracijom Pluronic[®]-a F-127 od 15 ili 20 % (m/m) i uklopljenim liofiliziranim oblikom suspenzije nanokristala azelatne kiseline pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja (leLNS-AZA-PHA) o kutnoj frekvenciji pri temperaturi od 32 °C.

Rezultati pokazuju da i leLNS-AZA-PHA-15 uzorak i leLNS-AZA-PHA-20 uzorak imaju veću vrijednost G' od G'' , međutim povećanje koncentracije P s 15 na 20 % (m/m) rezultiralo je većim vrijednostima G' , što ukazuje na povećanje elastičnosti (čvrstoće) hidrogela uslijed povećanja interakcija u polimernim lancima. Veća elastičnost uzorka rezultira duljim zadržavanjem i produljenim oslobađanjem lijeka na mjestu primjene (133).

4.4.2. Oslobađanje AZA iz hidrogelova *in vitro*

Nakon topikalne primjene ljekovitog pripravka na kožu, djelatna tvar se iz podloge mora osloboditi i tako postati raspoloživa za apsorpciju i ostvarenje svog farmakološkog djelovanja. Optimalna brzina oslobađanja djelatne tvari iz podloge od velikog je značaja za postizanje učinkovite topikalne terapije. Mala brzina oslobađanja djelatne tvari iz podloge dovodi do niske raspoloživosti u koži i posljedično izostanka terapijskog učinka lijeka (134). Fizičko-kemijska svojstva podloge mogu utjecati na brzinu oslobađanja djelatne tvari iz

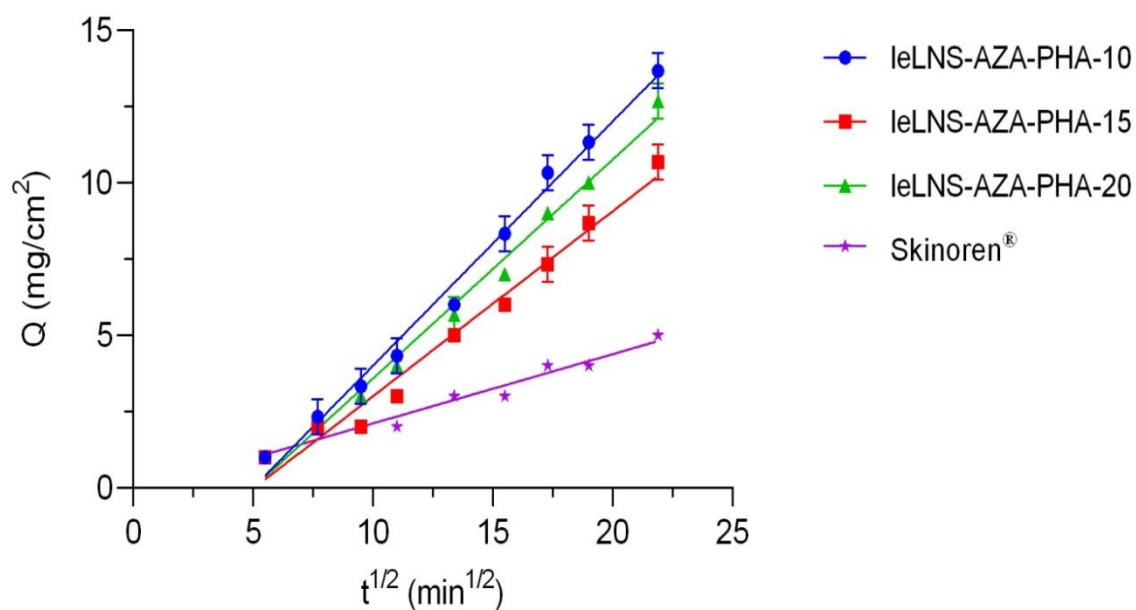
podloge koja se može odraziti na farmakokinetička svojstva uklopljene djelatne tvari. Uz to, na brzinu oslobađanja djelatne tvari iz podloge utječu topljivost i veličina čestica djelatne tvari, kristalni oblik lijeka, ali i reološka svojstva pripravka (135).

Uzorci za ispitivanje brzine oslobađanja AZA *in vitro* bili su leLNS-AZA-PHA hidrogelovi s koncentracijom P od 10, 15 ili 20 % (*m/m*) i HA u koncentraciji od 1 % (*m/m*) u koje je uklopljen liofilizirani oblik suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja u količini koja je potrebna za postizanje masenog udjela od 10 % AZA. Referentni uzorak bila je Skinoren[®] krema.

Ispitivanje brzine oslobađanja AZA *in vitro* provedeno je pri temperaturi od 32 °C koja odgovara fiziološkoj temperaturi na površini kože. Reološka karakterizacija uzoraka hidrogelova potvrdila je da uzorci geliraju pri temperaturi ispitivanja oslobađanja AZA *in vitro*, odnosno $T_{\text{sol-gel}}$ uzoraka manja je od 32 °C.

Cilj ispitivanja bio je ustanoviti i usporediti utjecaj koncentracije P na brzinu oslobađanja AZA iz hidrogela te usporediti s brzinom oslobađanja AZA iz Skinoren[®] kreme.

Za određivanje i usporedbu brzine oslobađanja AZA *in vitro* iz leLNS-AZA-PHA hidrogelova podaci su prikazani kao količina oslobođene AZA po jediničnoj površini u ovisnosti o kvadratnom korijenu iz vremena, Slika 15.



Slika 15. Profili *in vitro* oslobađanja azelatne kiseline (AZA) iz Pluronic[®] F-127/hijaluronska kiselina hidrogelova s koncentracijom Pluronic[®]-a F-127 od 10, 15 ili 20 % (*m/m*) i uklopljenim liofiliziranim oblikom suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja (leLNS-AZA-PHA) u usporedbi sa Skinoren[®] kremom.

Dobiveni su profili karakteristični za *in vitro* oslobađanje lijeka iz polučvrstih pripravaka korištenjem difuzijskih ćelija. Uočljivo je početno zastojno vrijeme nakon kojega se povećava brzina oslobađanja, a količina oslobođenog lijeka po jediničnoj površini je proporcionalna kvadratnom korijenu vremena u skladu s Higuchi-jevom kinetikom (136). Podaci linearne regresijske analize su prikazani u Tablici 7.

Proporcionalnost količine oslobođenog lijeka po jediničnoj površini i kvadratnog korijena iz vremena obično se smatra indikatorom difuzijom kontroliranog oslobađanja lijeka, iako i slijed više mehanizama (npr. bubrenje i otapanje polimera) može također pridonositi oslobađanju (137).

Tablica 7. Analiza podataka *in vitro* oslobađanja AZA iz leLNS-AZA-PHA hidrogelova u usporedbi sa Skinoren® kremom.

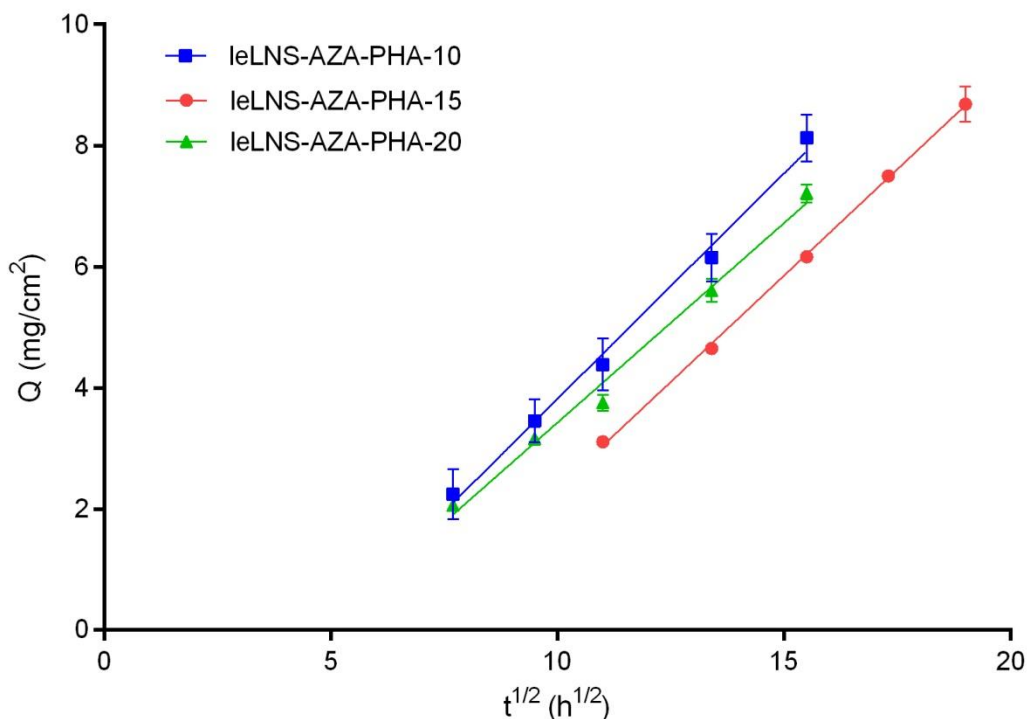
Linearna regresijska analiza	leLNS-AZA-PHA-10	leLNS-AZA-PHA-15	leLNS-AZA-PHA-20	Skinoren®
Jednadžba	$Y = 0,8009 * X - 4,009$	$Y = 0,6068 * X - 3,071$	$Y = 0,7180 * X - 3,599$	$Y = 0,2272 * X - 0,160$
R ²	0,9806	0,9715	0,9860	0,9576

leLNS-AZA-PHA, Pluronic® F-127/hijaluronska kiselina hidrogel s uklopljenom azelatnom kiselinom (AZA) u obliku liofilizata suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja.

Brzina oslobađanja AZA iz leLNS-AZA-PHA uzoraka veća je od brzine oslobađanja AZA iz Skinoren® kreme (Slika 15. i Tablica 7.), što je očekivano s obzirom na razliku oblika djelatne tvari i podloge u koju je djelatna tvar uklopljena, ali i prethodno pokazane razlike u intrinzičnoj brzini otapanja između nanonizirane i neprocesuirane AZA od 36,0 %.

Utjecaj koncentracije P na brzinu oslobađanja AZA iz leLNS-AZA-PHA uzoraka nije jednoznačan. S obzirom na to da je brzina difuzije obično obrnuto proporcionalna s viskoznosti (136, 137) očekivalo bi se najbrže oslobađanje AZA iz hidrogela s najmanjim masenim udjelom P (10 %, *m/m*). S obzirom na sličnost profila u ovom slučaju, uz difuziju, moguće je da na brzinu oslobađanja AZA iz hibridnih hidrogelova (P + HA) utječe otapanje polimera i/ili razgradnja hidrogela.

Ispitivanje brzine oslobađanja korištenjem imerzijske ćelije općenito se provodi u periodu od 4-6 sati, s najmanje pet točaka u linearnom dijelu profila oslobađanja (139). Prema prethodnim istraživanjima, za određivanje brzine oslobađanja najpouzdanije je koristiti podatke u dijelu profila nakon zastoynog vremena i prije nego što je oslobođeno oko 35-45 % lijeka (140). Konstantu brzine oslobađanja predstavlja nagib pravca. Stoga su analizirana područja profila oslobađanja AZA iz leLNS-AZA-PHA uzoraka koja odgovaraju 10-30 % oslobođene AZA (Slika 16. i Tablica 8.). Uzorci su međusobno uspoređeni računanjem omjera nagiba pravaca i određivanjem 90 %-tnog intervala pouzdanosti omjera nagiba pravaca. Kako bi zahtjev za sličnost uzoraka bio zadovoljen, 90 %-tni interval pouzdanosti omjera nagiba pravaca mora biti unutar raspona 75-133,33 % (141).



Slika 16. Profili *in vitro* oslobađanja azelatne kiseline (AZA) iz Pluronic® F-127/hijaluronska kiselina hidrogelova s uklopljenom AZA u obliku liofilizata suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja (leLNS-AZA-PHA) koji odgovaraju masenom udjelu 10-30 % oslobođenog lijeka.

Tablica 8. Analiza podataka *in vitro* oslobađanja AZA iz leLNS-AZA-PHA hidrogelova koji odgovaraju masenom udjelu 10-30 % oslobođenog lijeka.

Linearna regresijska analiza	leLNS-AZA-PHA-10	leLNS-AZA-PHA-15	leLNS-AZA-PHA-20
Jednadžba	$Y = 0,7452 * X - 3,636$	$Y = 0,7026 * X - 4,686$	$Y = 0,6593 * X - 3,169$
R^2	0,9937	0,9993	0,9902

leLNS-AZA-PHA, Pluronic® F-127/hijaluronska kiselina hidrogel s uklopljenom azelatnom kiselinom (AZA) u obliku liofilizata suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja.

Rezultati analize su pokazali da su uzorci leLNS-AZA-PHA hidrogelova slični s obzirom na brzinu oslobađanja AZA. Temeljem toga se može zaključiti da je za oslobađanje AZA iz leLNS-AZA-PHA hidrogelova važnija njihova struktura nego udio P. Za

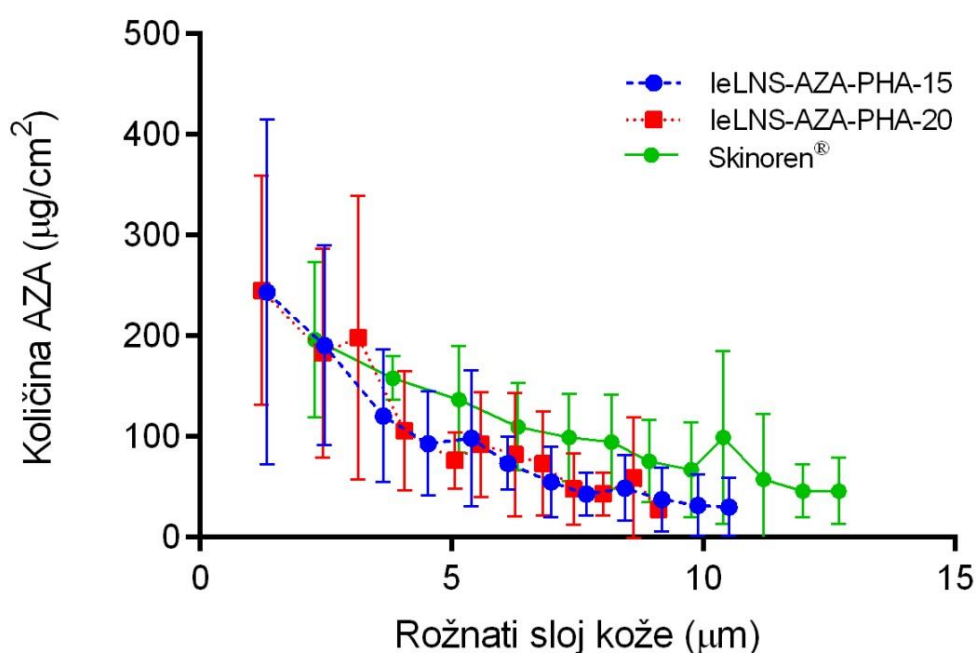
poloksamerske gelove je karakteristično gusto pakiranje micela u kubičnu fazu (104). Prisutnost HA svakako utječe na geliranje P (131). U hibridnim su gelovima najvjerojatnije micelle P međusobno povezane lancima HA. Iako je pokazano da na reološka svojstva leLNS-AZA-PHA hidrogelova, $T_{\text{sol-gel}}$, viskoznost i čvrstoću, utječe maseni udio P, rezultati ispitivanja *in vitro* oslobađanja upućuju na to da je za brzinu oslobađanja AZA odgovornija prisutnost HA. Odnosno, maseni udio od 1 % HA utječe na pakiranje P micela u hibridnim PHA gelovima na način da najviskozniji i najčvršći od ispitivanih leLNS-AZA-PHA uzoraka hidrogelova s masenim udjelom P od 20 % ne usporava oslobađanje AZA u odnosu na onoga s masenim udjelom P od 15 %.

4.4.3. Penetracija AZA u rožnati sloj kože *in vivo*

Rožnati sloj kože, zbog svoje specifične građe, glavna je prepreka koja ograničava ulazak djelatnih tvari u/kroz kožu te tako onemogućuje postizanje optimalnoga terapijskoga učinka pri liječenju kožnih oboljenja (15). Stoga je ispitivanje perkutane apsorpcije (penetracije/permeacije) djelatne tvari iz farmaceutskih oblika namijenjenih za (trans)dermalnu dostavu lijeka od izuzetne važnosti pri njihovom razvoju, jer omogućuje uvid u pravo mjesto dostave lijeka.

Ispitivanje penetracije AZA iz uzoraka hidrogelova u rožnati sloj kože provedeno je na koži unutrašnje strane podlaktice zdravih dobrovoljaca tzv. *tape stripping* metodom. Uzorci za ispitivanje penetracije AZA u rožnati sloj kože bili su hidrogelovi koji su se sastojali od P (15 ili 20 %, *m/m*), HA (1 %, *m/m*) i liofiliziranog oblika suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja u količini koja je potrebna za postizanje masenog udjela od 10 % AZA (leLNS-AZA-PHA-15 i leLNS-AZA-PHA-20 hidrogelovi). Referentni uzorak bila je Skinoren[®] krema.

Na označenu površinu kože primijenjena je AZA u dozi od 5 mg/cm² (103), a koncentracijski profil AZA u rožnatome sloju kože prikazan je na Slici 17. Izračunate vrijednosti dobivenih površina ispod krivulje (AUC) te ukupna količina AZA u rožnatome sloju izražena kao postotni udio (%), prikazane su za sve ispitivane uzorke u Tablici 9.



Slika 17. Koncentracijski profil azelatne kiseline (AZA) u rožnatome sloju kože: ovisnost količine AZA po jediničnoj površini o dubini penetracije rožnatog sloja kože iz Pluronic® F-127/hijaluronska kiselina hidrogelova s koncentracijom Pluronic®-a F-127 od 15 ili 20 % (*m/m*) i uklopljenim liofiliziranim oblikom suspenzije nanokristala AZA pripravljene niskoenergetskom metodom vlažnog mljevenja (leLNS-AZA-PHA) u odnosu na komercijalno dostupnu Skinoren® kremu. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost ± SD (*n*=6).

Tablica 9. Površina ispod krivulje (AUC), dubina penetracije AZA u rožnatome sloju kože i ukupna količina AZA u rožnatome sloju kože izražena kao postotni udio primijenjene doze.

Uzorak	AUC ($\times 10^{-4}$ µg/cm)	Dubina penetracije AZA u rožnati sloj kože (µm)	AZA (%)
leLNS-AZA-PHA-15	224,0±117,7	10,50±0,85	5,33±2,38
leLNS-AZA-PHA-20	234,5±143,3	9,10±0,91	6,17±3,09
Skinoren®	270,8±143,6	12,70±2,41	5,44±2,03

leLNS-AZA-PHA, Pluronic® F-127/hijaluronska kiselina hidrogel s koncentracijom Pluronic®-a F-127 od 15 ili 20 % (*m/m*) i uklopljenim liofilizatom suspenzije nanokristala azelatne kiseline (AZA) pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD (*n*=6).

Prema koncentracijskom profilu količine AZA u rožnatom sloju kože prikazanog na Slici 17. i rezultatima prikazanim u Tablici 9. uočava se da su svi ispitivani uzorci pokazali sličnu ukupnu količinu AZA po jediničnoj površini u ovisnosti o dubini penetracije u rožnati sloj kože. Pri tome je količina AZA u rožnatome sloju kože nakon primjene leLNS-AZA-PHA-15 i leLNS-AZA-PHA-20 uzoraka bila gotovo jednaka, $224,0 \pm 117,7 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\text{cm}$ i $234,5 \pm 143,3 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\text{cm}$, redom, dok je količina AZA u rožnatome sloju kože nakon primjene Skinoren[®] kreme bila nešto veća, $270,8 \pm 143,6 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\text{cm}$.

Iz Tablice 9. vidljivo je da je količina AZA u rožnatome sloju kože i nakon primjene hidrogelova i nakon primjene Skinoren[®] kreme, iznosila samo 5 do 6 % primijenjene doze.

Pelikh i suradnici (109) u nedavno objavljenom istraživanju uklopili su nanokristale rutina i hesperetina u različite podloge, hidrogel, oleogel i kremu. Istraživanje je pokazalo da hidrogel smanjuje penetraciju slabo topljivih tvari u rožnati sloj kože, dok oleogel i krema povećavaju. Pri tome je uklapanje nanokristala rutina i hesperetina u oleogel rezultiralo 400 puta većom penetracijom nanokristala u rožnati sloj kože, a uklapanje nanokristala u kremu čak 2500 puta u odnosu na penetraciju nanokristala iz hidrogela u rožnati sloj kože.

Za razliku od toga, u ovoj studiji, *in situ* hidrogel koji se sastojao od P pomiješanog sa HA velike molekulske mase i uklopljenim liofiliziranim oblikom suspenzije nanokristala AZA, pokazuje gotovo identičan koncentracijski profil ovisnosti količine AZA po jediničnoj površini o dubini penetracije u rožnati sloj kože kao i komercijalno dostupna Skinoren[®] krema. Iz dobivenih rezultata moguće je zaključiti da hidrogelovi mogu poslužiti kao odlična podloga za uklapanje nanokristala AZA.

4.5. SUSPENZIJE NANOKRISTALA AZA PRIPREMLJENE METODOM VISOKOENERGETSKOG VLAŽNOG MLJEVENJA

Niskoenergetski procesi proizvodnje nanokristala djelatnih tvari daju vrlo fine čestice uske raspodjele veličina, ali je vrijeme mljevenja dugo upravo zbog unosa relativno niske energije u sustav. Stoga se metodom vlažnog mljevenja u laboratorijskim uvjetima ne može proizvesti dovoljna količina nanokristala AZA koja bi se uklopila u topikalne pripravke u svrhu kliničkog ispitivanja te je bilo potrebno povećati njihovu proizvodnju (engl. *scale-up*). Pri tome su nanokristali AZA pripremljeni metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja u kugličnom mlinu, gdje je primjena veće energije pridonijela značajnom smanjenju utroška vremena proizvodnje.

4.5.1. Veličina čestica i PDI nanokristala AZA pripremljenih metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja

Nanokristali AZA pripremljeni su metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja u kugličnom mlinu kako bi se dobila dovoljna količina nanokristala AZA koja bi se uklopila u topikalne pripravke za potrebe kliničkog ispitivanja. U tu svrhu suspenzija AZA pripremljena je u ukupnoj masi od 200,0 g suspenzije s udjelom od 2,0 % (*m/m*) AZA i 0,3 % (*m/m*) P60 te je u sustav dodano 55,0 ml kuglica za mljevenje raspona dimenzija 0,1-0,2 mm. Nakon 4 h mljevenja pri brzini miješanja od 4000 okr/min, veličina nanokristala AZA iznosila je $321,1 \pm 11,6$ nm (PDI $0,604 \pm 0,102$). Da bi se smanjila količina otopljene frakcije lijeka i povećala stabilnost te se istodobno povećala učinkovitost procesa mljevenja, koncentracija AZA povećana je s 2,0 % (*m/m*) na 5,0 % (*m/m*). Pri tome je koncentracija P60 ostala nepromijenjena (0,3 %, *m/m*), a ukupna masa suspenzije povećana je s 200,0 g na 300,0 g uz jednake procesne parametre mljevenja. Koncentracija P60 u suspenziji (0,3 %, *m/m*) odgovarala je optimalnom omjeru PAT i djelatne tvari koji se nalazi u rasponu omjera od 0,05:1 do 0,5:1 (113) i iznosila je 0,06:1.

Postupno povećanje koncentracije AZA više od 5,0 % (*m/m*) u suspenziji za mljevenje uzrokovalo je povećanje viskoznosti suspenzije, što je onemogućilo kontinuirani proces mljevenja. Stoga je suspenzija AZA s koncentracijom AZA od 5,0 % (*m/m*) odabrana za daljnja ispitivanja.

Kako bi se odredilo optimalno vrijeme mljevenja, uzorci suspenzije AZA s koncentracijom AZA od 5 % (*m/m*) uzeti su nakon 2, 3 i 4 h mljevenja i izmjerena je veličina čestica i PDI nanokristala AZA. Rezultati veličine čestica i PDI prikazani su u Tablici 10.

Tablica 10. Veličina čestica i PDI nanokristala AZA pripremljenih metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja.

Uzorak	Vrijeme mljevenja (h)	Veličina čestica (nm)	PDI
heNS-AZA-1	2	188,7±34,1	0,493±0,045
heNS-AZA-2	3	148,1±6,5	0,399±0,020
heNS-AZA-3	4	144,8±4,7	0,356±0,007
heNS-AZA-2-FD*	3	269,9±14,8	0,426±0,031

heNS-AZA, suspenzija nanokristala azelatne kiseline (AZA) pripravljena metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja; *rekonstituirani heNS-AZA-2 uzorak suspenzije nanokristala AZA nakon liofilizacije. Prikazane vrijednosti veličine čestica i indeksa polidisperznosti (PDI) nanokristala AZA predstavljaju srednju vrijednost ± standardna devijacija (SD) (n=3).

Rezultati pokazuju da je veličina nanokristala AZA gotovo jednaka nakon 3 h (148,1±6,5 nm) i 4 h (144,8±4,7 nm) mljevenja visokoenergetskom metodom vlažnog mljevenja te da oba uzorka imaju sličan raspon veličina (PDI 0,399±0,020 i 0,356±0,007). Zbog manjeg utroška vremena na proces mljevenja, suspenzija nanokristala AZA koja je mljevena 3 h (heNS-AZA-2) odabrana je za daljnja ispitivanja.

Nakon 24 h mljevenja AZA niskoenergetskom metodom vlažnog mljevenja, veličina nanokristala AZA iznosila je 59,2±3,8 nm (PDI 0,142±0,112), dok je nakon 3 h mljevenja AZA visokoenergetskom metodom vlažnog mljevenja veličina nanokristala AZA iznosila 148,1±6,5 nm (PDI 0,399±0,020). Može se zaključiti da je veličina nanokristala AZA koji su pripremljeni visokoenergetskom metodom vlažnog mljevenja veća u odnosu na veličinu nanokristala AZA koji su pripremljeni niskoenergetskom metodom vlažnog mljevenja, međutim i dalje je prihvatljiva za dermalnu primjenu. Pri tome je visokoenergetskom metodom vlažnog mljevenja vrijeme mljevenja AZA smanjeno za čak 8 puta, a ukupna masa suspenzije za mljevenje povećala se 40 puta (7,5 g na 300,0 g) u usporedbi s metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja.

4.5.2. Sušenje smrzavanjem

Postupkom sušenja smrzavanjem izrađen je liofilizirani oblik heNS-AZA-2 suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja (heLNS-AZA). Nakon rekonstitucije liofiliziranog oblika suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja (heNS-AZA-2-FD), veličina nanokristala AZA iznosila je $269,9 \pm 14,8$ nm (PDI $0,426 \pm 0,031$) u odnosu na izvornih $148,1 \pm 6,5$ nm (PDI $0,399 \pm 0,020$) (Tablica 10.). Povećanje veličine nanokristala AZA nakon rekonstitucije liofiliziranog oblika suspenzije nanokristala AZA je približno 2 puta u odnosu na izvornu veličinu i u skladu je s povećanjem veličine nanokristala AZA nakon rekonstitucije liofiliziranog oblika suspenzije nanokristala AZA pripravljene niskoenergetskom metodom kod koje je veličina nanokristala AZA iznosila $117,3 \pm 2,4$ nm (PDI $0,363 \pm 0,102$) u odnosu na izvornih $59,2 \pm 3,8$ nm (PDI $0,142 \pm 0,112$).

Povećanje veličine nanokristala AZA i širi raspon veličina mogli bi se pripisati aglomeraciji nanokristala AZA koja je nastala tijekom procesa sušenja smrzavanjem. Povećanje veličine nanokristala AZA prihvatljivo je jer je u skladu s ranije objavljenim podacima o veličini nanokristala pripremljenih postupkom vlažnog mljevenja koje su bile u rasponu od 100-300 nm (49, 113).

4.6. TEKSTURNA ANALIZA

Razmazivost pripravka pri dermalnoj primjeni opisuje lakoću kojom se pripravak raspodjeljuje po površini kože i jako utječe na adherenciju bolesnika. Pripravci s lakšom razmazivošću pokrivaju veću površinu kože tijekom primjene što može poboljšati terapijski učinak (142). Usto, primjena je topikalnog pripravka na osjetljivu kožu ugodnija ukoliko pripravak ima zadovoljavajuća svojstva širenja po površini kože (143).

Za ispitivanje teksturnih svojstava hidrogela s nanokristalima AZA, liofilizirani oblik suspenzije nanokristala AZA u količini koja je potrebna za postizanje masenog udjela od 10 % AZA uklopljen je u hidrogel koji se sastojao od P (15 %, *m/m*) i HA (1 %, *m/m*), heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel. Teksturna svojstva heLNS-AZA-PHA-15 hidrogela uspoređena su s komercijalno dostupnom Skinoren[®] kremom. Teksturnom analizom određena je čvrstoća uz rad pri opterećenju silama smicanja uzoraka, a koji su u izravnoj korelaciji s razmazivošću uzorka.

Rezultati pokazuju da su čvrstoća i rad pri opterećenju silama smicanja heLNS-AZA-PHA-15 hidrogela manji u odnosu na Skinoren[®] kremu. Pri tome, vrijednost koja opisuje čvrstoću heLNS-AZA-PHA-15 hidrogela iznosi $510,8 \pm 20,0$ g uz rad pri opterećenju silama smicanja od $467,9 \pm 28,0$ g s. U odnosu na heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel, teksturna analiza Skinoren[®] kreme pokazala je veće vrijednosti koje se odnose na čvrstoću, $3050,6 \pm 61,0$ g, uz rad pri opterećenju silama smicanja od $1079,0 \pm 21,0$ g s. Iz toga se može zaključiti da heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel, zbog manje čvrstoće i posljedične mogućnosti širenja pri manjim smicanjima omogućuje jednostavniju i lakšu primjenu, a samim time poboljšanu adherenciju bolesnika u odnosu na primjenu Skinoren[®] kreme te je u skladu s literaturnim podacima (144).

4.7. UČINKOVITOST HIDROGELA S NANOKRISTALIMA AZA

Učinkovitost heLNS-AZA-PHA-15 hidrogela u liječenju kožnih oboljenja za koje je AZA indicirana, VA i rozaceje, procijenjena je u odnosu na referentni uzorak, Skinoren[®] kremu. Ispitivanje je dizajnirano kao randomizirano, dvostruko-slijepo i provedeno je na bolesnicima Sveučilišne kliničke bolnice u Mostaru. Hidrogel se sastojao od P u koncentraciji od 15 % (*m/m*), HA u koncentraciji od 1 % (*m/m*) i liofiliziranog oblika suspenzije nanokristala AZA u količini koja odgovara masenom udjelu od 10 % AZA.

4.7.1. Vulgarne akne

VA česta su, kronična, polietiološka upalna bolest koja zahvaća pilosebacealnu jedinicu kože. Obično se pojavljuje u vrijeme puberteta, ali može nastati i u kasnijoj životnoj dobi, osobito u ženskog spola (145). Kolonizacija pilosebacealnog folikula *C. acnes* predstavlja jedan od patofizioloških čimbenika odgovornih za nastanak kožnih poremećaja poput upalnih lezija VA (146). Zbog antibakterijskog učinka na *C. acnes*, ali i protuupalnog učinka, AZA se primjenjuje u liječenju VA.

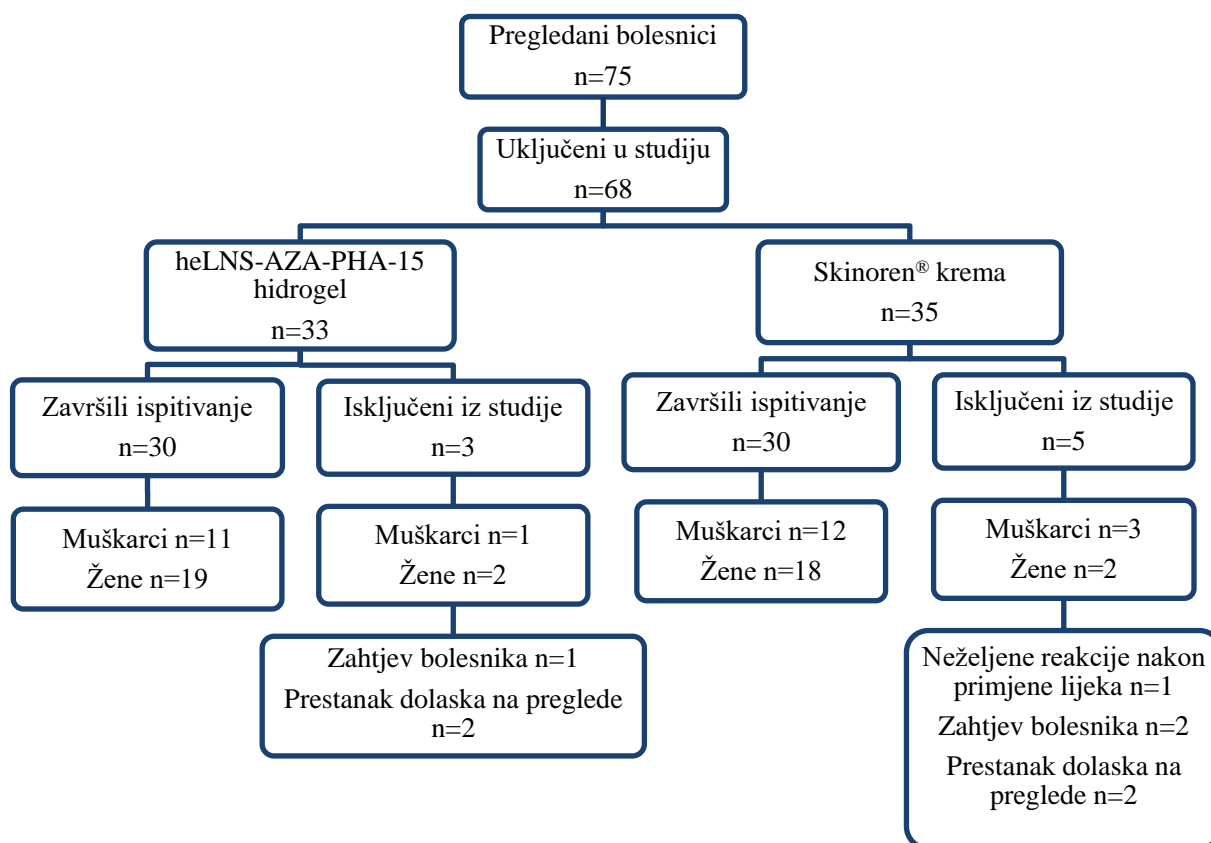
U ovom ispitivanju, procijenjena je učinkovitost heLNS-AZA-PHA-15 hidrogela u odnosu na komercijalno dostupnu Skinoren[®] kremu u bolesnika s blagim do umjerenim oblikom VA na koži lica. Uzorci su primjenjivani dva puta na dan tijekom 8 tjedana. Pri tome je kliničko stanje svakog bolesnika procijenjeno prije početka liječenja te nakon 4 i 8 tjedana liječenja.

VA klasificirane su prema Hayashi i suradnicima (147) ovisno o broju prisutnih lezija na koži lica. Klasifikacija uključuje četiri oblika VA: (i) blagi oblik koji podrazumijeva prisutnost do 5 lezija, (ii) umjereni oblik od 6-20 lezija, (iii) jaki oblik od 21-50 lezija i (iv) vrlo jaki (teški) više od 50 lezija. Prema tome, najvažniji uvjet za uključivanje bolesnika u ispitivanje bila je prisutnost do 20 lezija, a učinkovitost ispitivanih uzoraka praćena je smanjenjem njihovog broja nakon 4 i 8 tjedana liječenja.

Na prvom pregledu bolesnicima su izbrojane lezije na licu i potvrđena je dijagnoza blagog do umjerenog oblika VA te je ustanovljen broj upalnih i broj neupalnih lezija.

Ukupno je pregledano 75 bolesnika od kojih je 68 u potpunosti ispunilo kriterije za uključivanje u ispitivanje (poglavlje 3.2.12.) te su potpisali Informirani pristanak. Podijeljeni

su u dvije skupine: 33 bolesnika (48,53 %) je dobilo heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel, a 35 bolesnika (51,47 %) Skinoren® kremu. Tijekom ispitivanja isključeno je 8 bolesnika. Pri tome je razlog isključivanja jednog bolesnika bila pojava neželjenih učinaka, dok su ostali bolesnici isključeni na vlastitu inicijativu (n=3) ili su jednostavno prestali dolaziti na dogovorene kontrolne preglede (n=4). Dijagram bolesnika prikazan je na Slici 18.



Slika 18. Raspodjela bolesnika prema ispitivanom uzorku i razlozi isključivanja iz studije.

Ispitivanje je uspješno završilo 60 bolesnika (30 bolesnika je primjenjivalo heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel i 30 bolesnika Skinoren® kremu), od kojih je 38,3 % muškog spola (n=23) i 61,7 % ženskog spola (n=37). Veća zastupljenost ženskog spola je očekivana i u skladu je s literaturnim podacima koji navode da je kod muškog spola, zbog utjecaja androgena, češća pojavnost težih oblika akni koji za uspješno liječenje zahtijevaju sistemsku primjenu lijekova (148).

Nije bilo statistički značajne razlike u dobi između ispitivanih skupina bolesnika ($p=0,707$). Prosječna životna dob skupine bolesnika koja je primjenjivala heLNS-AZA-PHA-

15 hidrogel bila je $18,57 \pm 3,09$, a skupine koja je primjenjivala Skinoren[®] kremu $18,83 \pm 2,32$ godina. Raspodjela bolesnika prema spolu i drugim sociodemografskim karakteristikama koje bi potencijalno mogle utjecati na pojavnost akni, uključujući radni status i životne navike poput konzumacije duhana i alkohola bile su usporedive i nisu se statistički značajno razlikovale ($p < 1$) između skupina. Podaci su prikazani u Tablici 11.

Tablica 11. Sociodemografske karakteristike bolesnika u odnosu na ispitivani uzorak.

Karakteristike bolesnika	heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel	Skinoren [®] krema	Test	<i>p</i> -vrijednost
Dob (prosjeck±SD)	18,57±3,09	18,83±2,32	t-test t=0,378	0,707
Spol (n; %)			$\chi^2 > 0$	<1
M	11; 36,7 %	12; 40,0 %		
Ž	19; 63,3 %	18; 60,0 %		
Konzumiranje duhana (n; %)	11; 36,7 %	12; 40,0 %	$\chi^2 > 0$	<1
Konzumiranje alkohola (n; %)	9; 30,0 %	9; 30,0 %	$\chi^2 > 0$	<1
Radni status (n; %)			Fisherov egzaktni test $\chi^2 = 3,286$	0,231
Zaposlen	4; 13,3 %	2; 6,7 %		
Student	13; 43,3 %	20; 66,7 %		
Učenik	13; 43,3 %	8; 26,7 %		

heLNS-AZA-PHA-15, Pluronic[®] F-127/hijaluronska kiselina hidrogel s uklopljenom azelatnom kiselinom (AZA) u obliku liofilizata suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja; SD, standardna devijacija.

Broj upalnih, neupalnih i ukupnih lezija bio je usporediv na početku ispitivanja i nije se statistički značajno razlikovao između skupine bolesnika koja je primjenjivala heLNS-

AZA-PHA-15 hidrogel i skupine bolesnika koja je primjenjivala Skinoren[®] kremu ($p > 0,05$). Podaci su prikazani u Tablici 12.

Tablica 12. Broj upalnih, neupalnih i ukupnih lezija na početku liječenja vulgarne akne u odnosu na ispitivani uzorak.

Tip lezija_tjedan	heLNS-AZA-PHA-15	Skinoren [®]	t-test	p-vrijednost
	hidrogel prosje \pm SD	krema prosje \pm SD		
Upalne lezije_0	6,13 \pm 3,50	5,43 \pm 3,42	t=0,783	0,437
Neupalne lezije_0	8,00 \pm 3,88	7,63 \pm 4,19	t=0,352	0,726
Ukupne lezije_0	14,13 \pm 6,87	13,07 \pm 7,08	t=0,592	0,556

heLNS-AZA-PHA, Pluronic[®] F-127/hijaluronska kiselina hidrogel s uklopljenom azelatnom kiselinom (AZA) u obliku liofilizata suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja.

Usporedba učinkovitosti ispitivanih uzoraka u liječenju VA nakon 4 i 8 tjedana liječenja prikazana je u Tablici 13. Uočljivo je da se primjenom i heLNS-AZA-PHA-15 hidrogela i Skinoren[®] kreme smanjio broj upalnih i neupalnih, a samim time i ukupnih lezija već nakon 4 tjedna primjene. Također, učinkovitost se oba uzorka povećavala njihovom daljnjom kontinuiranom primjenom (do 8 tjedana ispitivanja).

Tablica 13. Broj upalnih, neupalnih i ukupnih lezija na početku liječenja te nakon 4 i 8 tjedana liječenja vulgarne akne heLNS-AZA-PHA-15 hidrogelom i Skinoren® kremom.

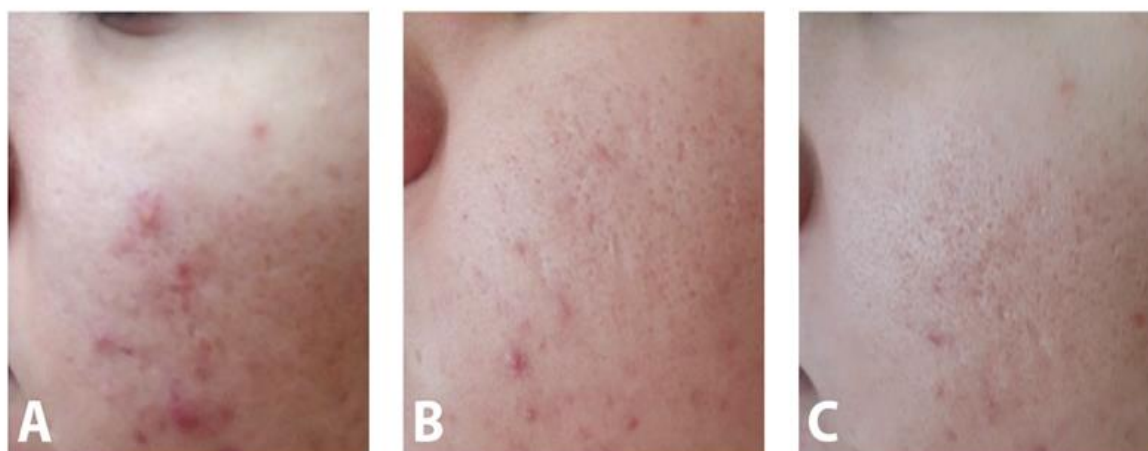
Tip lezija_tjedan	heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel prosjeck±SD	Skinoren® krema prosjeck±SD	t-test	p- vrijednost
Upalne lezije_0	6,13±3,50	5,43±3,42	t=0,783	0,437
Upalne lezije_4	5,30±3,15	4,80±3,25	t=0,605	0,548
Upalne lezije_8	3,73±2,61	3,60±2,43	t=0,205	0,839
Razlika upalnih lezija 0-4	0,83±0,79	0,63±0,56	t=1,132	0,262
Smanjenje 4 (%)	13,59	11,66		
Razlika upalnih lezija 0-8	2,40±1,25	1,83±1,20	t=1,788	0,079
Smanjenje_8 (%)	39,15	33,76		
Neupalne lezije_0	8,00±3,88	7,63±4,19	t=0,352	0,726
Neupalne lezije_4	6,90±3,61	6,73±3,82	t=0,174	0,863
Neupalne lezije_8	5,23±3,14	5,50±3,33	t=0,329	0,751
Razlika neupalnih lezija 0-4	1,10±0,84	0,93±0,74	t=0,813	0,420
Smanjenje_4 (%)	13,75	12,23		
Razlika neupalnih lezija 0-8	2,77±1,19	2,13±1,28	t=1,982	0,052
Smanjenje_8 (%)	34,58	27,96		

heLNS-AZA-PHA, Pluronic® F-127/hijaluronska kiselina hidrogel s uklopljenom azelatnom kiselinom (AZA) u obliku liofilizata suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja; SD, standardna devijacija.

Rezultati prikazani u Tablici 13. pokazuju da je nakon 4 tjedna liječenja VA heLNS-AZA-PHA-15 hidrogelom broj upalnih lezija smanjen za 13,59 %, a broj neupalnih za 13,75 %. Za razliku od toga, u skupini bolesnika koji su primjenjivali Skinoren® kremu, broj upalnih lezija smanjio se za 11,66 %, a broj neupalnih za 12,23 %.

Isti trend može se primijetiti i nakon 8 tjedana liječenja. Smanjenje broja upalnih i neupalnih lezija u skupini bolesnika koji su primjenjivali heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel iznosi 39,15 % i 34,58 %, a u skupini bolesnika koji su primjenjivali Skinoren® kremu broj upalnih lezija smanjio se za 33,76 %, a broj neupalnih za 27,96 %.

Učinkovitost liječenja VA heLNS-AZA-PHA-15 hidrogelom tijekom cjelokupnog vremena ispitivanja prikazan je na Slici 19.



Slika 19. Bolesnik s blagim do umjerenim oblikom vulgarne akne na početku liječenja (A), nakon 4 tjedna (B) i nakon 8 tjedana (C) liječenja Pluronic[®] F-127/hijaluronska kiselina hidrogelom s uklopljenom azelatnom kiselinom (AZA) u obliku liofilizata suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja (heLNS-AZA-PHA-15).

Rezultati provedenog kliničkog ispitivanja u skladu su s rezultatima ispitivanja kojeg su proveli Schaller i suradnici (149). Ispitali su učinkovitost komercijalno dostupne Skinoren[®] kreme u liječenju blagog do umjerenog oblika VA tijekom 12 tjedana primjene. Ispitivanje je pokazalo da je primjena Skinoren[®] kreme dva puta dnevno tijekom 8 tjedana rezultirala smanjenjem ukupnog broja lezija za 39,8 %. Također, daljnjom primjenom povećana je učinkovitost liječenja VA te se broj ukupnih lezija nakon 12 tjedana liječenja smanjio za 53,9 %.

Nadalje, analizirana je učinkovitost AZA u smanjenju broja upalnih, neupalnih i ukupnih lezija unutar pojedine skupine bolesnika, a rezultati su prikazani u Tablici 14.

Nakon 8 tjedana primjene lijeka dva puta dnevno, postignuto je statistički značajno ($p < 0,001$) smanjenje upalnih, neupalnih, a time i ukupnih lezija u obje ispitivane skupine bolesnika pojedinačno. Uz to, visoke vrijednosti parcijalnog η^2 potvrđuju značajan učinak i heLNS-AZA-PHA-15 hidrogela i Skinoren kreme[®] na smanjenje broja lezija.

U skupini bolesnika koji su primjenjivali heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel, vrijednost parcijalnog η^2 za upalne, neupalne i ukupne lezije iznosile su redom 0,794, 0,848 i 0,846. U

skupini bolesnika koja je primjenjivala Skinoren[®] kremu, vrijednosti parcijalnog η^2 bile su nešto niže i iznosile su 0,710 za upalne, 0,745 za neupalne i 0,797 za ukupne lezije.

Tablica 14. Broj upalnih, neupalnih i ukupnih lezija unutar određene skupine bolesnika nakon 8 tjedana liječenja vulgarne akne heLNS-AZA-PHA-15 hidrogelom i Skinoren® kremom.

Tip lezija_tjedan	heLNS-AZA- PHA-15 hidrogel prosjeak ± SD	Wilks λ	F (1; 29)	<i>p</i> - vrijednost	η ²	Skinoren® krema prosjeak ± SD	Wilks λ	F (1; 29)	<i>p</i> - vrijednost	η ²
Upalne lezije_0	6,13±3,50	0,206	54,094	<0,001	0,794	5,43±3,42	0,290	34,316	<0,001	0,710
Upalne lezije_8	3,73±2,61					3,60±2,43				
Smanjenje 0-8 (%)	39,15					33,76				
Neupalne lezije_0	8,00±3,88	0,152	77,941	<0,001	0,848	7,63±4,19	0,255	40,858	<0,001	0,745
Neupalne lezije_8	5,23±3,14					5,50±3,33				
Smanjenje 0-8 (%)	34,50					27,96				
Ukupne lezije_0	14,13±6,87	0,154	76,702	<0,001	0,846	13,07±7,08	0,203	55,059	<0,001	0,797
Ukupne lezije_8	8,97±5,19					9,10±5,42				
Smanjenje 0-8 (%)	36,51					30,37				

heLNS-AZA-PHA, Pluronic® F-127/hijaluronska kiselina hidrogel s uklopljenom azelatnom kiselinom (AZA) u obliku liofilizata suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja; SD, standardna devijacija.

Na osnovu prikazanih rezultata ispitivanja učinka heLNS-AZA-PHA-15 hidrogela i komercijalno dostupne Skinoren® kreme u liječenju VA, očito je da su oba uzorka pokazala bolji učinak na smanjenje broja upalnih lezija u odnosu na broj neupalnih lezija. Rezultati su u skladu s istraživanjem Shalleri i suradnika (149), ali i protuupalnim i antibakterijskim učinkom AZA na *C. acnes*, ključnog patogena u nastanku akni koji potiče upalni odgovor (150).

U konačnici treba naglasiti da heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel sadrži dvostruko manju koncentraciju djelatne tvari od komercijalno dostupne Skinoren® kreme, a njihovi učinci u liječenju VA su usporedivi.

4.7.2. Rozaceja

Rozaceja je česta, kronična dermatoza koja se najčešće pojavljuje u odrasloj životnoj dobi (30-50 godina), posebno u osoba svjetlije puti. Pojavljuje se na središnjem dijelu lica, često i očima, dok nešto rjeđe na drugim dijelovima tijela (151).

Dijeli se na četiri oblika: eritematozno-teleangiektatski, papulopustularni, fimatozni i okularni oblik rozaceje. Svaki oblik ima određene karakteristike prema kojima se postavlja dijagnoza, iako u isto vrijeme može biti prisutno više oblika (152).

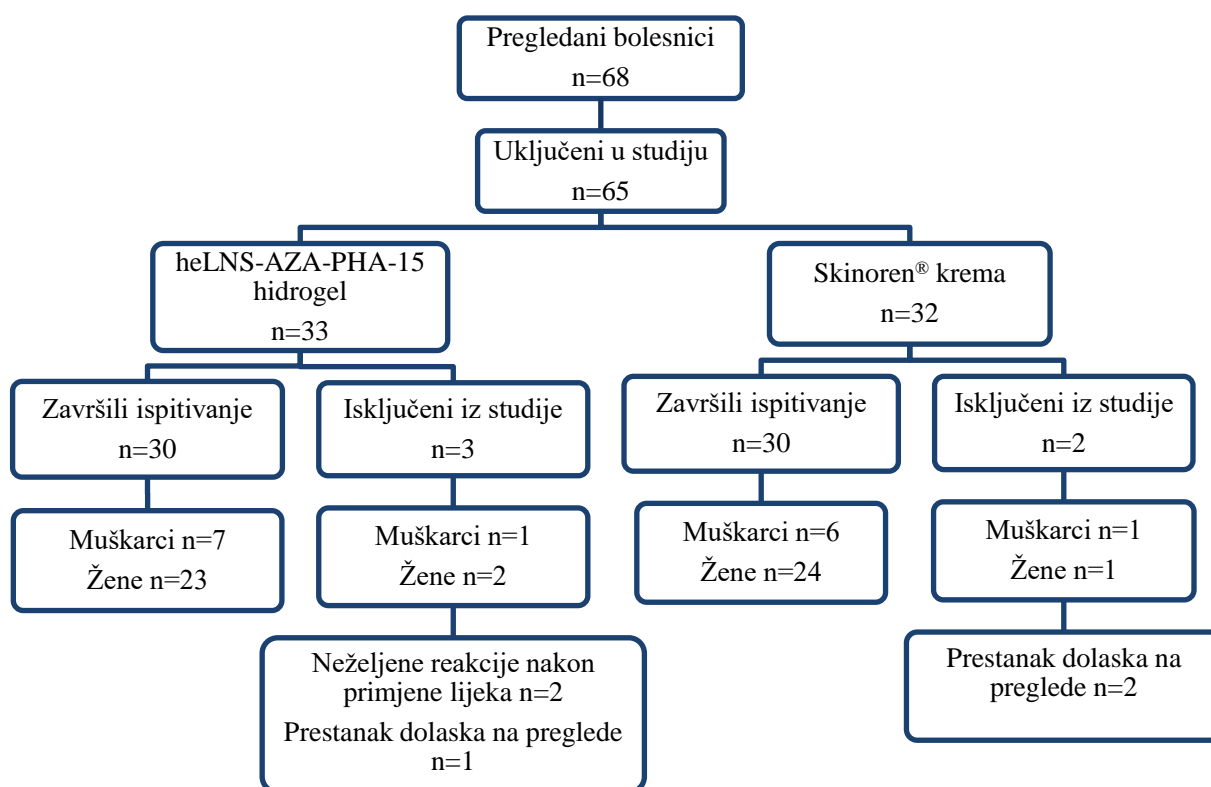
Provedena su razna istraživanja u cilju poboljšanja postojeće terapije u liječenju rozaceje. Shinde i suradnici (153) razvili su nanostrukturirane lipidne nosače (engl. *nanostructured lipid carriers*, NLC) metronidazola za ciljanu isporuku lijeka u epidermis i lokalni učinak na mjestu primjene. *In vitro* ispitivanje brzine oslobađanja djelatne tvari pokazalo je dvofazni profil oslobađanja metronidazola iz NLC pri čemu je došlo do naglo oslobađanja u prvih 60 min koje se zatim usporava. Usto, istraživanje je pokazalo superiorniju antibakterijsku aktivnost (*Staphylococcus epidermidis*) NLC metronidazola u odnosu na njegovu komercijalno dostupnu formulaciju u obliku gela. Nadalje, Torregosa i suradnici (154) razvili su emulgel metronidazola i niacinamida (nikotinamida) u cilju poboljšanja liječenja rozaceje. Brzina oslobađanja metronidazola iz emulgela uspoređena je s brzinom oslobađanja metronidazola iz dvije komercijalno dostupne kreme i jednog gela, pri čemu je brzina oslobađanja metronidazola iz emulgela bila veća u odnosu na brzinu oslobađanja metronidazola iz krema, a neznatno sporije u odnosu na gel.

Thiboutot i suradnici (155) ispitali su učinak AZA u liječenju umjerenog papulopustularnog oblika rozaceje, kojeg, kao što i samo ime kaže, karakterizira prisutnost papula i/ili pustula, trajno prisutni eritem s često izraženim teleangiektazijama na središnjem, ali i drugim dijelovima lica (152). Prema navedenom ispitivanju, umjereni papulopustularni oblik rozaceje podrazumijeva prisutnost minimalno 8, a maksimalno 50 upalnih papula i/ili pustula s određenom izraženosti eritema i teleangiektazija. Stoga se učinkovitost liječenja rozaceje pratila prema smanjenju broja papula i pustula te prema promjeni stupnja izraženosti eritema i teleangiektazija na osnovu 4 kategorije koje uključuju: (i) njihovu odsutnost, (ii) blagi oblik, (iii) umjereni oblik i (iv) jaki oblik. Blagi oblik podrazumijeva neznatno prisutni eritem i teleangiektazije, umjereni oblik izraženi eritem i teleangiektazije, dok jaki oblik podrazumijeva jako izražen eritem i teleangiektazije crvene do ljubičaste nijanse na središnjem dijelu kože lica ili je obuhvaćena cijela površina kože lica.

U ovom ispitivanju, procijenjena je učinkovitost heLNS-AZA-PHA-15 hidrogela u odnosu na Skinoren[®] kremu u liječenju umjerenog papulopustularnog oblika rozaceje koji je klasificiran prema navedenom ispitivanju Thiboutota i suradnika.

Bolesnici su detaljno pregledani na početku liječenja prilikom čega je potvrđena dijagnoza papulopustularnog oblika rozaceje, ustanovljen je broj papula i pustula i procijenjena je izraženost eritema i teleangiektazija. Postupak je ponovljen nakon 4 i 8 tjedana kontinuirane primjene lijeka.

Ukupno je pregledano 68 bolesnika od kojih je 65 u potpunosti ispunilo kriterije za uključivanje u studiju (poglavlje 3.2.12.) te su potpisali Informirani pristanak. Podijeljeni su u dvije skupine: 33 bolesnika (50,76 %) je dobilo heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel, a 32 bolesnika (49,23 %) Skinoren[®] kremu. Tijekom ispitivanja isključeno je 5 bolesnika. Pri tome je razlog isključivanja dvaju bolesnika bila pojava neželjenih učinaka, dok su ostali bolesnici isključeni jer su prestali dolaziti na dogovorene kontrolne preglede (n=3). Dijagram bolesnika prikazan je na Slici 20.



Slika 20. Raspodjela bolesnika prema ispitivanom uzorku i razlozi isključivanja iz studije.

Raspodjela bolesnika prema dobi i spolu prikazana je u Tablici 15. Nije bilo statistički značajne razlike u dobi između ispitivanih skupina bolesnika ($\chi^2=0,098$; $df=1$; $p=0,754$). Prosječna životna dob ukupnog broja bolesnika koji su primjenjivali heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel bila je $56,63 \pm 13,30$, a bolesnika koji su primjenjivali Skinoren® kremu $58,03 \pm 16,80$ godina.

Također, bolesnici se nisu značajno razlikovali prema spolu ($t=0,366$; $df=58$; $p=0,715$). Ženski spol bio je zastupljeniji u obje ispitivane skupine. Omjer bolesnika ženskog spola koji su primjenjivali heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel i Skinoren® kremu bio je 76,7:80,0 %, a muškog spola 23,3:20,0 %.

Tablica 15. Raspodjela bolesnika prema dobi i spolu u odnosu na ispitivani uzorak.

Karakteristike bolesnika	heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel	Skinoren® krema	Test
Dob (prosjeak±SD)	56,63±13,30	58,03±16,80	$\chi^2=0,098$; df=1; $p=0,754$
Spol			
Muškarci	23,3 %	20,0 %	$t=0,366$; df=58;
Žene	76,7 %	80,0 %	$p=0,715$

heLNS-AZA-PHA, Pluronic® F-127/hijaluronska kiselina hidrogel s uklopljenom azelatnom kiselinom (AZA) u obliku liofilizata suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja; SD, standardna devijacija.

Papule

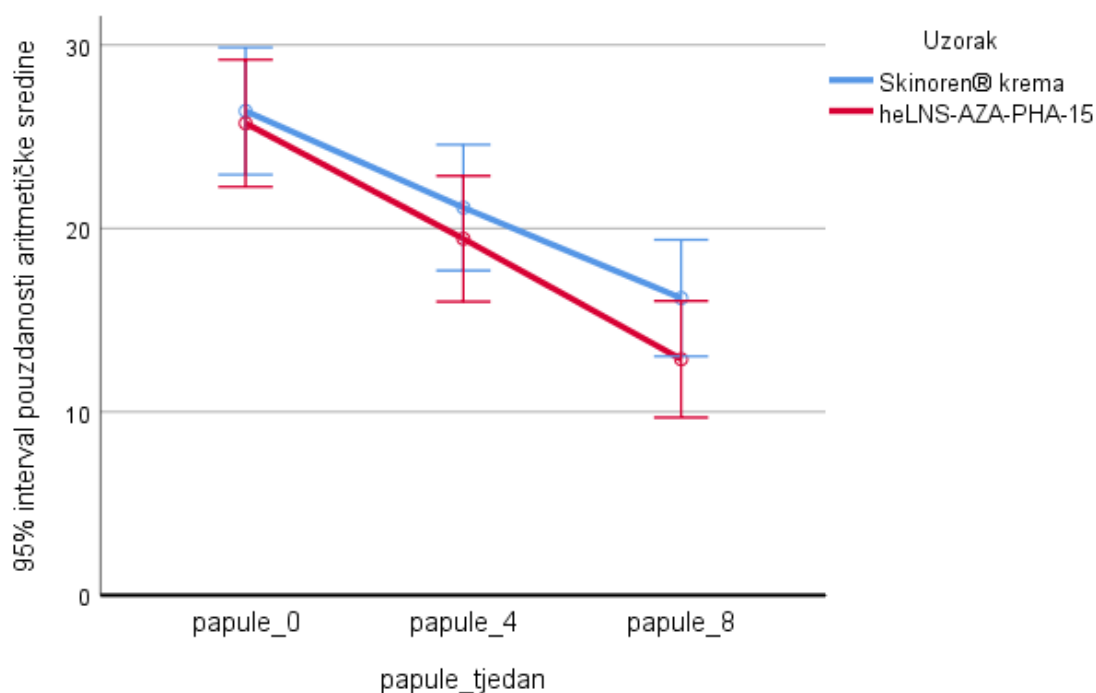
U Tablici 16. prikazan je broj papula u skupini bolesnika koja je primjenjivala heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel i Skinoren® kremu na početku liječenja i nakon 4 i 8 tjedana primjene lijeka. Rezultati pokazuju da je smanjen broj papula i nakon 4. i nakon 8. tjedna primjene lijeka, ali nije utvrđena statistički značajna razlika u broju papula između ispitivanih skupina bolesnika. Razlika nije bila značajna ni na početku liječenja niti nakon 4 i 8 tjedana primjene lijeka.

Tablica 16. Broj papula na početku te nakon 4 i 8 tjedana liječenja papulopustularnog oblika rozaceje heLNS-AZA-PHA-15 hidrogelom i Skinoren® kremom.

Mjerenje_tjedan	Uzorak		Test	
	heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel	Skinoren® krema		
Papule_0	M	25,7	26,4	Mann-Whitney U=420,500; p=0,662
	SD	8,9	10,0	
	C	28,0	29,5	
	Q1	18,0	18,0	
	Q3	34,0	35,0	
Papule_4	M	19,4	21,1	Mann-Whitney U=390,500; p=0,378
	SD	8,9	9,8	
	C	19,5	23,0	
	Q1	11,0	12,0	
	Q3	27,0	30,0	
Papule_8	M	12,9	16,2	Mann-Whitney U=348,500; p=0,133
	SD	8,4	9,0	
	C	11,0	18,0	
	Q1	6,0	8,0	
	Q3	20,0	24,0	

heLNS-AZA-PHA, Pluronic® F-127/hijaluronska kiselina hidrogel s uklopljenom azelatnom kiselinom (AZA) u obliku liofilizata suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja; M, aritmetička sredina; SD, standardna devijacija; C, medijan; Q1, prvi kvartil; Q3, treći kvartil.

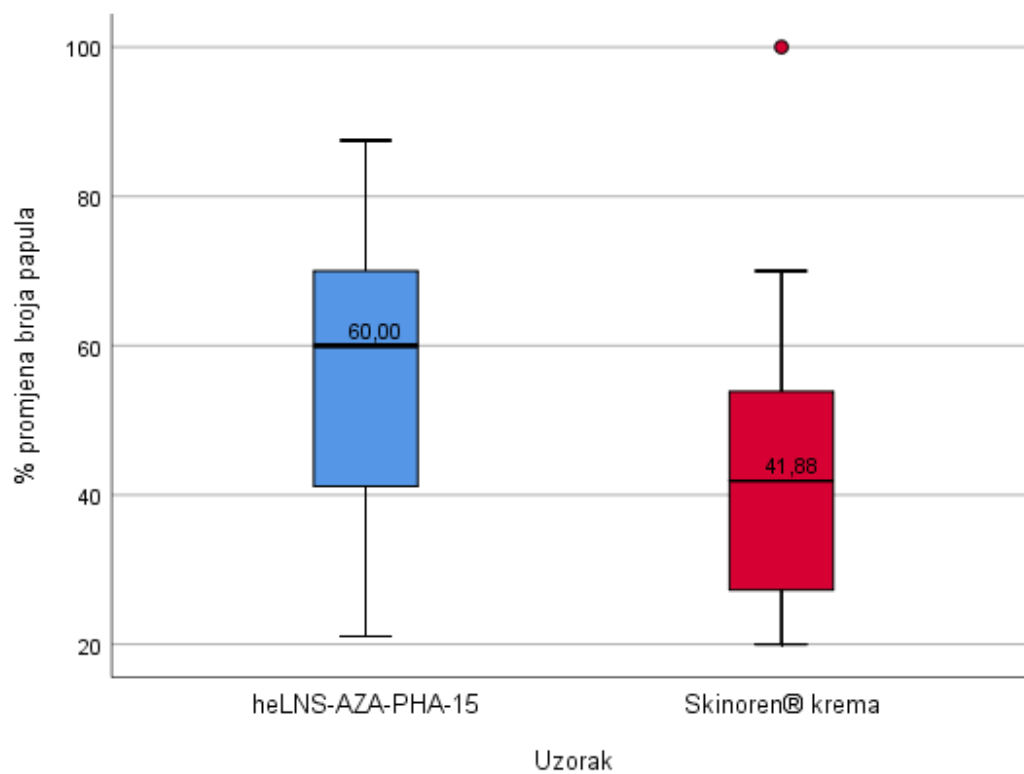
Na Slici 21. prikazan je interakcijski učinak ispitivanog lijeka i vremena primjene, na osnovu čega se može vidjeti da oblik lijeka i vremenski period primjene značajno utječu na smanjenje broja papula ($p=0,011$). Duža vremenska primjena lijeka rezultira boljim učinkom na smanjenje broja papula.



Slika 21. Smanjenje broja papula nakon 4 i 8 tjedana primjene Pluronic[®] F-127/hijaluronska kiselina hidrogela s uklopljenom azelatnom kiselinom (AZA) u obliku liofilizata suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja (heLNS-AZA-PHA-15) i Skinoren[®] kreme.

Smanjenje broja papula nakon primjene ispitivanih uzoraka analizirano je kroz postotnu promjenu broja papula od početka primjene lijeka do kraja 8. tjedna primjene lijeka (razlika između broja papula u dva navedena mjerenja iskazana je kao udio u broju papula na prvom mjerenju). Broj papula se kod bolesnika koji su koristili heLNS-AZA-PHA-15 u prosjeku smanjio za 55,11 % (SD=19,25 %; C=60,00 %; IQR=28,82 %), a kod bolesnika koji su koristili Skinoren[®] kremu 43,65 % (SD=18,53 %; C=41,88 %; IQR=26,58 %).

Testiranjem je utvrđeno da je postotna promjena (smanjenje) broja papula od početka primjene lijeka do kraja 8. tjedna primjene lijeka statistički značajna (Mann-Whitney U=286,000; $p=0,015$). Rezultati ukazuju na statistički značajno smanjenje broja papula nakon 8 tjedana primjene heLNS-AZA-PHA-15 hidrogela (Slika 22.).



Slika 22. Broj papula nakon 8 tjedana primjene Pluronic[®] F-127/hijaluronska kiselina hidrogela s uklopljenom azelatnom kiselinom (AZA) u obliku liofilizata suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja (heLNS-AZA-PHA-15) i Skinoren[®] kreme izražen kao postotni udio.

Pustule

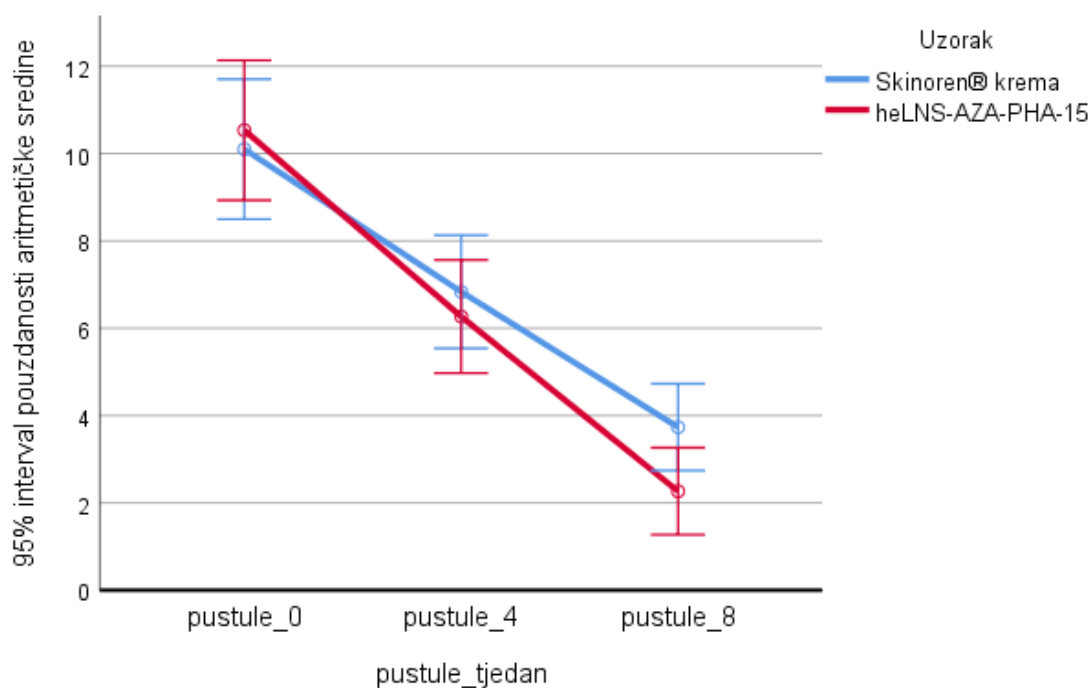
U Tablici 17. prikazan je broj pustula u skupini ispitanika koja je primjenjivala heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel i Skinoren® kremu na početku liječenja i nakon 4 i 8 tjedana primjene lijeka. Rezultati pokazuju da je smanjen broj pustula i nakon 4. i nakon 8. tjedna primjene lijeka, ali nije utvrđena statistički značajna razlika u broju pustula između ispitivanih skupina bolesnika. Razlika nije bila značajna ni na početku liječenja niti nakon 4 i 8 tjedana primjene lijeka.

Tablica 17. Broj pustula na početku te nakon 4 i 8 tjedana liječenja papulopustularnog oblika rozaceje heLNS-AZA-PHA-15 hidrogelom i Skinoren® kremom.

Pustule_tjedan	Uzorak		Test
	heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel	Skinoren® krema	
Pustule_0	M	10,5	Mann-Whitney U=420,500; p=0,662
	SD	3,9	
	C	10,0	
	Q1	8,0	
	Q3	14,0	
Pustule_4	M	6,3	Mann-Whitney U=390,500; p=0,378
	SD	3,1	
	C	6,0	
	Q1	4,0	
	Q3	9,0	
Pustule_8	M	2,3	Mann-Whitney U=348,500; p=0,133
	SD	2,3	
	C	2,0	
	Q1	0,0	
	Q3	3,0	

heLNS-AZA-PHA, Pluronic® F-127/hijaluronska kiselina hidrogel s uklopljenom azelatnom kiselinom (AZA) u obliku liofilizata suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja; M, aritmetička sredina; SD, standardna devijacija; C, medijan; Q1, prvi kvartil; Q3, treći kvartil.

Na Slici 23. prikazan je interakcijski učinak ispitivanog lijeka u odnosu na vremenski period primjene. Vidljivo je da oblik lijeka i vremenski period primjene značajno utječu na smanjenje broja pustula ($p=0,011$). Dulja vremenska primjena lijeka rezultira većim smanjenjem broja pustula.

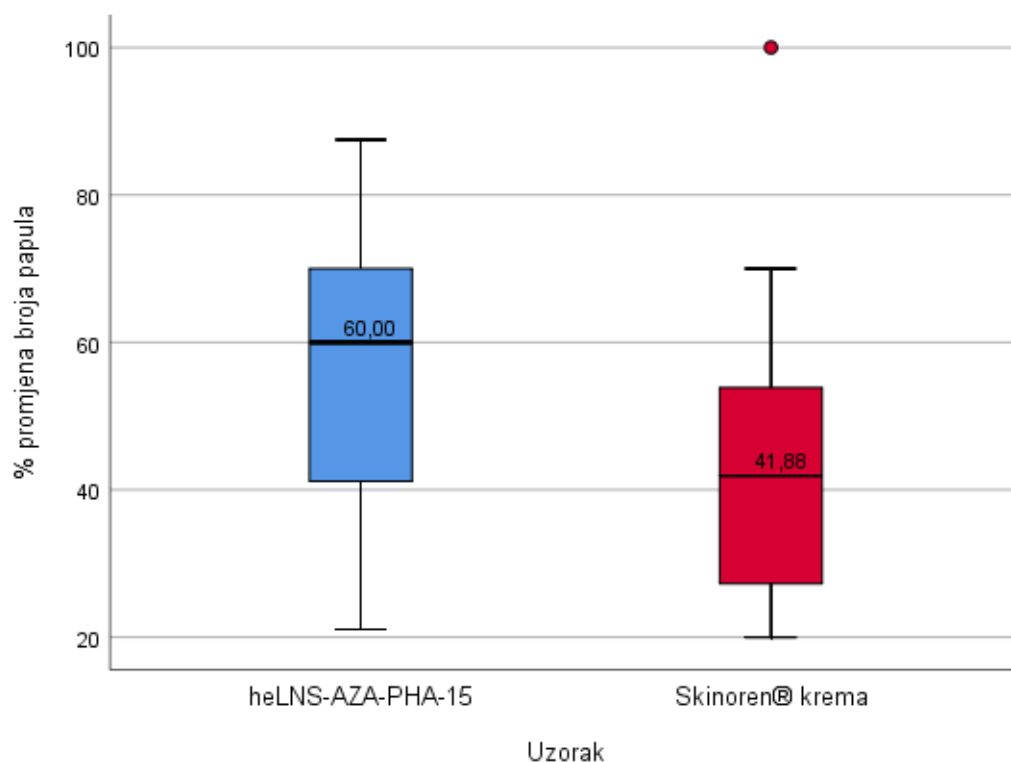


Slika 23. Smanjenje broja pustula nakon 4 i 8 tjedana primjene Pluronic® F-127/hijaluronska kiselina hidrogela s uklopljenom azelatnom kiselinom u obliku liofilizata suspenzije nanokristala azelatne kiseline pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja (heLNS-AZA-PHA-15) i komercijalno dostupne Skinoren® kreme.

Smanjenje broja pustula nakon primjene ispitivanih uzoraka analizirano je kroz postotnu promjenu broja pustula od početka primjene lijeka do kraja 8. tjedna primjene lijeka (razlika između broja pustula u dva navedena mjerenja iskazana je kao udio u broju pustula na prvom mjerenju). Broj pustula se kod bolesnika koji su koristili heLNS-AZA-PHA-15 u prosjeku smanjio za 81,71 % (SD=16,94 %; C=85,16 %; IQR=25,00 %), a kod bolesnika koji su koristili Skinoren® kremu za 69,21 % (SD=22,05 %; C=64,29 %; IQR=29,06 %).

Testiranjem je utvrđeno da je postotna promjena (smanjenje) broja pustula od početka primjene lijeka do kraja 8. tjedna primjene lijeka statistički značajna (Mann-Whitney

U=282,000; $p=0,019$). Rezultati ukazuju na statistički značajno smanjenje broja pustula nakon 8 tjedana primjene heLNS-AZA-PHA-15 (Slika 24.).



Slika 24. Broj pustula nakon 8 tjedana primjene Pluronic[®] F-127/hijaluronska kiselina hidrogela s uklopljenom azelatnom kiselinom (AZA) u obliku liofilizata suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja (heLNS-AZA-PHA-15) i komercijalno dostupne Skinoren[®] kreme izražen kao postotni udio.

Eritem

Rozaceju, uz papule, pustule i teleangiektazije, karakterizira i trajni eritem koji se očituje kao crvenilo u predjelu lica i jedan je od kliničkih znakova u dijagnozi rozaceje (156). Literaturni podaci navode da je eritem najvažnije primarno obilježje papulopustularne rozaceje, a da su papule, pustule i teleangiektazije dodatna obilježja (157).

U ovom istraživanju nije utvrđena statistički značajna razlika u stupnju eritema između dvije ispitivane skupine bolesnika ni na početku liječenja, niti nakon 4 niti 8 tjedana liječenja. Rezultati prikazani u Tablici 18. pokazuju da su svi bolesnici na početku liječenja imali neki stupanj eritema. Nakon 4 tjedna liječenja došlo je do neznatnog smanjenja stupnja eritema, dok se nakon 8 tjedana liječenja mogu uočiti značajnije promjene.

Tablica 18. Zastupljenost eritema na početku te nakon 4 i 8 tjedana liječenja papulopustularnog oblika rozaceje heLNS-AZA-PHA-15 hidrogelom i Skinoren® kremom.

Eritem_tjedan	Oblik eritema	heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel		Skinoren® krema		Test
		Broj bolesnika	%	Broj bolesnika	%	
Eritem_0	Nema	0	0,0 %	0	0,0 %	$\chi^2=0,091$; df=2; p=0,955
	Blagi	6	20,0 %	6	20,0 %	
	Umjereni	9	30,0 %	8	26,7 %	
	Jaki	15	50,0 %	16	53,3 %	
Eritem_4	Nema	0	0,0 %	1	3,3 %	p=0,755; Fisherov egzaktni test
	Blagi	10	33,3 %	10	33,3 %	
	Umjereni	9	30,0 %	6	20,0 %	
	Jaki	11	36,7 %	13	43,3 %	
Eritem_8	Nema	9	30,0 %	6	20,0 %	p=0,469; Fisherov egzaktni test
	Blagi	6	20,0 %	8	26,7 %	
	Umjereni	15	50,0 %	14	46,7 %	
	Jaki	0	0,0 %	2	6,7 %	

heLNS-AZA-PHA, Pluronic® F-127/hijaluronska kiselina hidrogel s uklopljenom azelatnom kiselinom (AZA) u obliku liofilizata suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja.

U cilju boljeg uočavanja značajnih promjena u liječenju eritema kod papulopustularnog oblika rozaceje, analizirani su oblici eritema koji su bili zastupljeni od početka do kraja liječenja u obje ispitivane skupine bolesnika pojedinačno. Rezultati su prikazani u Tablici 19. i može se uočiti da je kod bolesnika koji su prije početka liječenja imali blagi oblik eritema, nakon 8 tjedana došlo do njegovog potpunog izlječenja bez obzira jesu li primjenjivali heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel ili Skinoren® kremu.

Prije početka liječenja, 30,0 % bolesnika koji su primjenjivali heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel i 26,7 % bolesnika koji su primjenjivali Skinoren® kremu imali su umjereni oblik eritema. Nakon 8 tjedana, u skupini bolesnika koja je primjenjivala heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel, 20,0 % bolesnika je imalo blagi oblik eritema, dok je kod 10,0 % bolesnika došlo do potpunog izlječenja. Za razliku od toga, svi bolesnici koji su imali umjereni oblik eritema, a primjenjivali su Skinoren® kremu, nakon 8 tjedana od početka liječenja imali su blagi oblik eritema.

Jaki oblik eritema prije početka liječenja imalo je 50,0 % bolesnika koji su primjenjivali heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel i 53,3 % bolesnika koji su primjenjivali Skinoren® kremu. Nakon 8 tjedana primjene heLNS-AZA-PHA-15 hidrogela ni jedan bolesnik nije imao jaki oblik eritema. S druge strane, nakon 8 tjedana primjene Skinoren® kreme, kod 6,7 % (n=2) bolesnika nije došlo do poboljšanja, odnosno od početka do kraja liječenja bio je prisutan jaki oblik eritema.

Tablica 19. Zastupljenost oblika eritema na početku te nakon 8 tjedana liječenja papulopustularnog oblika rozaceje heLNS-AZA-PHA-15 hidrogelom i Skinoren® kremom.

		Nakon 8 tjedana primjene lijeka				
		Nema eritema	Blagi eritem	Umjereni eritem	Jaki eritem	Ukupno
heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel						
Na početku liječenja	Blagi eritem	6 (20,0 %)				
	Umjereni eritem	3 (10,0 %)	6 (20,0 %)			
	Jaki eritem			15 (50,0 %)		
	Ukupno					30 (100,0 %)
Skinoren® krema						
Na početku liječenja	Blagi eritem	6 (20,0 %)				
	Umjereni eritem		8 (26,7 %)			
	Jaki eritem			14 (46,7 %)	2 (6,7 %)	
	Ukupno					30 (100,0 %)

heLNS-AZA-PHA, Pluronic® F-127/hijaluronska kiselina hidrogel s uklopljenom azelatnom kiselinom (AZA) u obliku liofilizata suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja.

Teleangiektazije

Rozaceju karakteriziraju i teleangiektazije te su jedan od kliničkih obilježja u dijagnozi rozaceje (158). To su proširene i izražene kapilare ili arteriole u koži koje mogu biti svijetlo crvene do ljubičaste boje i promjera od 0,1 do 1 mm (159).

U ovom istraživanju, nije utvrđena statistički značajna razlika u stupnju teleangiektazija između dvije ispitivane skupine, ni na početku liječenja, niti nakon 4 niti 8 tjedana liječenja.

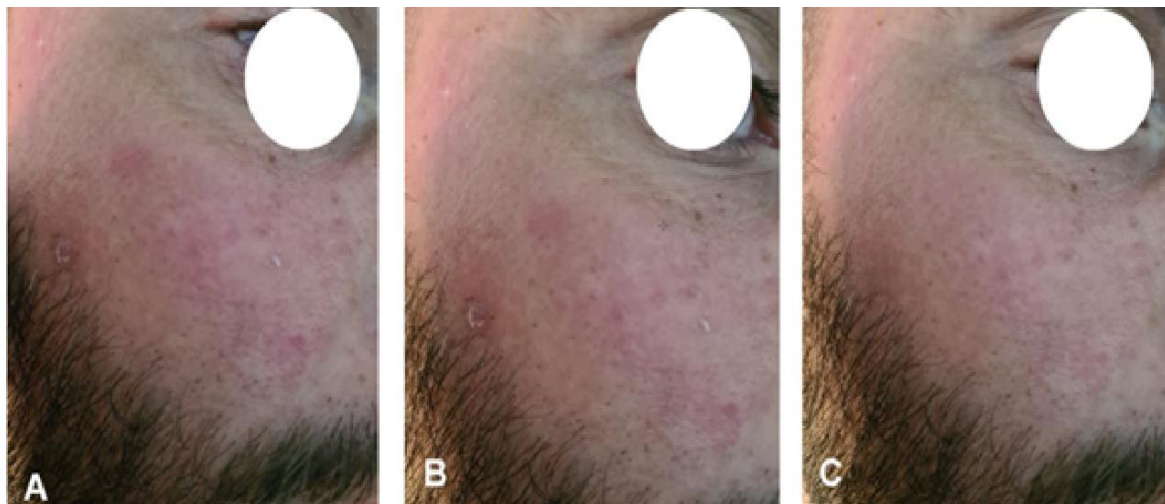
Rezultati prikazani u Tablici 20. ukazuju da nakon 4 tjedna primjene lijeka nije došlo do poboljšanja u liječenju teleangiektazija bez obzira na primjenjivani lijek. Nakon 8 tjedana liječenja vidljivost teleangiektazija smanjena je u 4 bolesnika (13,3 %) koja su primjenjivala heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel, od kojih su tri bolesnika prije početka liječenja imala blagi oblik teleangiektazije, a jedan bolesnik umjereni oblik. Na kraju liječenja kod bolesnika s blagim oblikom teleangiektazije došlo je do potpunog izlječenja, dok se kod jednog bolesnika umjereni oblik teleangiektazije poboljšao u blagi oblik. S druge strane, vidljivost teleangiektazija u skupini bolesnika koja je primjenjivala Skinoren® kremu smanjena je samo kod jednog bolesnika (3,3 %), koji je prije početka liječenja imao blagi oblik teleangiektazije, a nakon 8 tjedana je došlo do potpunog izlječenja.

Tablica 20. Zastupljenost teleangiektazija na početku te nakon 4 i 8 tjedana liječenja papulopustularnog oblika rozaceje heLNS-AZA-PHA-15 hidrogelom i Skinoren® kremom.

Teleangiektazije_tjedan	Oblik teleangiektazije	heLNS-AZA-PHA hidrogel-15		Skinoren® krema		p- vrijednost
		Broj bolesnika	%	Broj bolesnika	%	
Teleangiektazije_0	Nema	4	13,3 %	6	20,0 %	$\chi^2=1,859;$ df=2; p=0,395
	Blagi	4	13,3 %	7	23,3 %	
	Umjereni	22	73,3 %	17	56,7 %	
	Jaki	0	0,0 %	0	0,0 %	
Teleangiektazije_4	Nema	4	13,3 %	6	20,0 %	$\chi^2=1,859;$ df=2; p=0,395
	Blagi	4	13,3 %	7	23,3 %	
	Umjereni	22	73,3 %	17	56,7 %	
	Jaki	0	0,0 %	0	0,0 %	
Teleangiektazije_8	Nema	7	23,3 %	7	23,3 %	p=0,338; Fisherov egzaktni test
	Blagi	2	6,9 %	6	20,0 %	
	Umjereni	21	72,4 %	17	56,7 %	
	Jaki	0	0,0 %	0	0,0 %	

heLNS-AZA-PHA, Pluronic® F-127/hijaluronska kiselina hidrogel s uklopljenom azelatnom kiselinom (AZA) u obliku liofilizata suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja.

Učinkovitost liječenja papulopustularnog oblika rozaceje tijekom 8 tjedana primjene heLNS-AZA-PHA-15 hidrogela prikazan je na Slici 25.



Slika 25. Bolesnik s papulopustularnim oblikom rozaceje na početku liječenja (A), nakon 4 tjedna (B) i nakon 8 tjedana (C) liječenja Pluronic[®] F-127/hijaluronska kiselina hidrogelom s uklopljenom azelatnom kiselinom (AZA) u obliku liofilizata suspenzije nanokristala AZA pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja (heLNS-AZA-PHA-15).

Prema prikazanim rezultatima može se zaključiti da su i heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel i Skinoren[®] krema pokazali bolji učinak na smanjenje broja pustula u odnosu na papule. Nakon 8 tjedana primjene heLNS-AZA-PHA-15 hidrogela broj papula se smanjio za $\approx 55\%$, a broj pustula za $\approx 82\%$. U istom vremenskom periodu, nakon primjene Skinoren[®] kreme broj papula je smanjen za $\approx 44\%$, a broj pustula za $\approx 70\%$. Rezultati su u skladu s drugim istraživanjima. Carcmichael i suradnici (160) ispitali su učinkovitost kreme s AZA u koncentraciji od 20% (*m/m*) na papulopustularni oblik rozaceje. Nakon 9 tjedana ispitivanja broj papula se smanjio za $\approx 80\%$, dok su pustule u potpunosti izliječene. Bolji učinak AZA u smanjenju broja pustula potvrđuje i istraživanje Maddina i suradnika (161) koji su ispitali učinkovitost kreme s AZA u koncentraciji od 20% (*m/m*) na papulopustularni oblik rozaceje u vremenskom periodu od 15 tjedana. Pri tome je broj papula smanjen za $\approx 77\%$, a broj pustula za $\approx 85\%$.

Uzorak heLNS-AZA-PHA-15 hidrogela i Skinoren[®] krema u potpunosti su izliječili eritem kod $30,0\%$ i $20,0\%$ bolesnika nakon 8 tjedana kontinuirane primjene. Dobiveni

rezultati u skladu su s rezultatima Maddina i suradnika (161) koji su ispitali učinak kreme s AZA u koncentraciji od 20 % (*m/m*) u liječenju papulopustularnog oblika rozaceje i usporedili ga s učinkom metronidazola. Nakon 15 tjedana liječenja, izraženost eritema je smanjena za 25,5 % nakon primjene AZA kreme i 18,7 % nakon primjene metronidazola.

Rezultati ispitivanja heLNS-AZA-PHA-15 hidrogela i Skinoren[®] kreme u liječenju teleangiektazija ukazuju da nije bilo značajnog poboljšanja u njihovom liječenju nakon 8 tjedana primjene lijeka. Uočeno je smanjenje izraženosti teleangiektazija kod 13,3 % bolesnika koji su primjenjivali heLNS-AZA-PHA-15 hidrogel i 3,3 % bolesnika koji su primjenjivali Skinoren[®] kremu, a rezultati su u skladu s drugim istraživanjima. Bjerke i suradnici (162) ispitali su učinkovitost kreme s AZA u koncentraciji od 20 % (*m/m*) u liječenju teleangiektazija te su pokazali da se izraženost teleangiektazija smanjila kod 22,3 % bolesnika nakon 3 mjeseca primjene lijeka. Nadalje, Elewski i suradnici (163) pokazali su da u vremenskom periodu od 15 tjedana primjene gela s AZA u koncentraciji od 15 % (*m/m*), kod 73 % bolesnika nije došlo do poboljšanja u liječenju teleangiektazija.

5. ZAKLJUČCI

- Suspenzija nanokristala AZA uspješno je pripravljena metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja.
- Pri izradi suspenzije nanokristala AZA niskoenergetskom metodom vlažnog mljevenja veličina nanokristala AZA smanjivala se s porastom koncentracije P60 u suspenziji.
- Suhi oblik suspenzije nanokristala AZA pripravljene niskoenergetskom metodom vlažnog mljevenja izrađen je tehnikom sušenja smrzavanjem.
- Optimirana nanosuspenzija veličine nanokristala AZA od $59,2 \pm 3,8$ nm uspješno je rekonstituirana nakon liofilizacije. Veličina nanokristala AZA u rekonstituiranom uzorku iznosila je $117,3 \pm 2,4$ nm, što predstavlja prihvatljivo povećanje u odnosu na izvornu nanosuspenziju.
- DSC analizom potvrđen je kristalni oblik AZA, kao i da postupak mljevenja nije utjecao na svojstva AZA u čvrstom stanju, a rezultati su dodatno potvrđeni FTIR spektroskopskom analizom.
- Nanokristali AZA pripremljeni niskoenergetskom metodom vlažnog mljevenja pokazali su veću intrinzičnu brzinu otapanja u odnosu na neprocesuiranu AZA.
- Liofilizirani oblik suspenzije nanokristala AZA pripravljene niskoenergetskom metodom vlažnog mljevenja uklopljen je u količini koja odgovara masenom udjelu od 10 % AZA u hidrogel koji se sastojao od P (10-20 %, *m/m*) i HA (1 %, *m/m*).
- Reološkom karakterizacijom potvrđeno je da su hidrogelovi s 15 ili 20 % (*m/m*) P viskozni gelovi pri fiziološkoj temperaturi na površini kože. Sol-gel fazni prijelaz hidrogela s 20 % (*m/m*) P nastaje pri temperaturi nižoj od 20 °C, a hidrogela s 15 % (*m/m*) P pri ≈ 25 °C. Viskoznost hidrogelova je povećana uslijed povećanja koncentracije P, a utjecaj HA na viskoznost formulacije raste sa smanjenjem koncentracije P u sustavu. Uklapanje nanokristala AZA nije utjecalo na viskoznost hidrogelova. Ispitivanjem profila modula G' i G'' u ovisnosti o kutnoj frekvenciji pokazana je povećana elastičnost (čvrstoća) hidrogela uslijed povećanja koncentracije P u sustavu.
- Ispitivanje oslobađanja nanokristala AZA *in vitro* iz hidrogelova pokazalo je da su uzorci hidrogelova slični s obzirom na brzinu oslobađanja AZA te da je postignuto značajno brže oslobađanje AZA iz hidrogelova u odnosu na brzinu oslobađanja AZA iz komercijalno dostupne Skinoren® kreme.
- Analiza količine AZA po jediničnoj površini u ovisnosti o dubini penetracije rožnatog sloja kože pokazala je da koncentracija P u ispitivanim uzorcima hidrogelova nije

imala utjecaja na obim penetracije u rožnati sloj kože te je bila usporediva s komercijalno dostupnom Skinoren[®] kremom nanijetoj u istoj dozi.

- U cilju povećanja proizvodnje nanokristala AZA za potrebe kliničke studije, nanokristali AZA pripremljeni su metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja u kugličnom mlinu. Veličina nanokristala AZA analizirana je nakon 2, 3 i 4 h mljevenja i bila je u rasponu veličina $\approx 140\text{-}190$ nm.
- Suhi oblik suspenzije nanokristala AZA pripremljene visokoenergetskom metodom vlažnog mljevenja izrađen je tehnikom sušenja smrzanjem. Optimirana nanosuspenzija veličine nanokristala AZA od $148,1 \pm 6,5$ nm uspješno je rekonstituirana nakon liofilizacije. Veličina nanokristala AZA u rekonstituiranom uzorku iznosila je $269,9 \pm 14,8$ nm, što predstavlja prihvatljivo povećanje u odnosu na izvornu nanosuspenziju. Liofilizirani oblik suspenzije nanokristala AZA pripremljene visokoenergetskom metodom vlažnog mljevenja uklopljen je u količini koja odgovara masenom udjelu od 10 % AZA u hidrogel koji se sastojao od P u koncentraciji od 15 % (*m/m*) i HA 1 % (*m/m*).
- Teksturna analiza hidrogela s nanokristalima AZA pokazala je manju, ali prikladnu čvrstoću hidrogela u odnosu na čvrstoću komercijalno dostupne Skinoren[®] kreme što pri primjeni omogućuje lakše rasprostranjivanje pripravka po koži.
- Ispitivanje učinkovitosti hidrogela s nanokristalima AZA i komercijalno dostupne Skinoren[®] kreme u liječenju VA i rozaceje (*in vivo*) pokazalo je bolji ili jednak učinak hidrogela uz primjenu dvostruko manje doze u odnosu na Skinoren[®] kremu.

6. LITERATURA

1. Sieber MA, Hegel JKE. Azelaic acid: Properties and mode of action. *Skin Pharmacol Physiol*. 2014;27(1):9–17.
2. Frampton JE, Wagstaff AJ. Azelaic acid 15% gel: In the treatment of papulopustular rosacea. *Am J Clin Dermatol*. 2004;5(1):57–64.
3. National Library of Medicine. Azelaic acid. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Azelaic-acid>. [Pristupljeno: 10. svibnja 2021.].
4. Fitton A, Goa KL. Azelaic Acid. *Drugs*. 1991;41(5):780–98.
5. Rossi AM, Perez MI. Treatment of Hyperpigmentation. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2011;19(2):313–24.
6. Charnock C, Brudeli B, Klaveness J. Evaluation of the antibacterial efficacy of diesters of azelaic acid. *Eur J Pharm Sci*. 2004;21(5):589–96.
7. Young MC, Zito PM. Azelaic Acid in Acne Vulgaris. *J Dermatology Nurses' Assoc*. 2018;10(3):152–3.
8. Chien AL, Qi J, Rainer B, Sachs DL, Helfrich YR. Treatment of Acne in pregnancy. *J Am Board Fam Med*. 2016;29(2):254–62.
9. Ma H, Yu M, Tan F, Li N. Improved percutaneous delivery of azelaic acid employing microemulsion as nanocarrier: formulation optimization, in vitro and in vivo evaluation. *RSC Adv*. 2015;5(37):28985–95.
10. Aytekin M, Gursoy RN, Ide S, Soylu EH, Hekimoglu S. Formulation and characterization of liquid crystal systems containing azelaic acid for topical delivery. *Drug Dev Ind Pharm*. 2013;39(2):228–39.
11. Burchacka E, Potaczek P, Padaszyński P, Karłowicz-Bodalska K, Han T, Han S. New effective azelaic acid liposomal gel formulation of enhanced pharmaceutical bioavailability. *Biomed Pharmacother*. 2016;83:771–5.
12. Mistry A, Ravikumar P. Development and Evaluation of Azelaic Acid Based Ethosomes for Topical Delivery for the Treatment of Acne. *Indian J Pharm Educ Res* |. 2016;50:S232–43.

13. Kumar A, Rao R. Enhancing efficacy and safety of azelaic acid via encapsulation in cyclodextrin nanosponges: development, characterization and evaluation. *Polym Bull.* 2020;1–28.
14. Kumar D, Singh J, Antil M, Kumar V. Emulgel-novel topical drug delivery system-a comprehensive review. *Int J Pharm Sci Res.* 2016;7(12):4733.
15. Trommer H, Neubert RHH. Overcoming the stratum corneum: The modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacol Physiol.* 2006;19(2):106–21.
16. Touitou E. Drug delivery across the skin. *Expert Opin Biol Ther.* 2002;2(7):723–33.
17. Bolzinger MA, Briançon S, Pelletier J, Chevalier Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2012;17(3):156–65.
18. Lane ME. Skin penetration enhancers. *Int J Pharm.* 2013;447(1–2):12–21.
19. Karadzovska D, Brooks JD, Monteiro-Riviere NA, Riviere JE. Predicting skin permeability from complex vehicles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(2):265–77.
20. Stevens JR, Justin Coffey M, Fojtik M, Kurtz K, Stern TA. The Use of Transdermal Therapeutic Systems in Psychiatric Care: A Primer on Patches. *Psychosomatics.* 2015;56(5):423–44.
21. Tadicherla S, Berman B. Percutaneous dermal drug delivery for local pain control. *Ther Clin Risk Manag.* 2006;2(1):99–113.
22. Rehman K, Zulfakar MH. Recent advances in gel technologies for topical and transdermal drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm.* 2014;40(4):433–40.
23. Naik A, Kalia YN, Guy RH. Transdermal drug delivery: Overcoming the skin's barrier function. *Pharm Sci Technol Today.* 2000;3(9):318–26.
24. Verma DD, Verma S, Blume G, Fahr A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *Int J Pharm.* 2003;258(1–2):141–51.
25. Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2001;14(2):101–14.

26. Müller R, Junghanns. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomedicine*. 2008;3:295–309.
27. Malamataris M, Taylor KMG, Malamataris S, Douroumis D, Kachrimanis K. Pharmaceutical nanocrystals: production by wet milling and applications. *Drug Discov Today*. 2018;23(3):534–47.
28. Wu L, Zhang J, Watanabe W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(6):456–69.
29. Raghava Srivalli KM, Mishra B. Drug nanocrystals: A way toward scale-up. *Saudi Pharm J*. 2016;24(4):386–404.
30. Singh Y, Meher JG, Raval K, Khan FA, Chaurasia M, Jain NK, i sur. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J Control Release*. 2017;252:28–49.
31. Agarwal V, Bajpai M. Stability Issues Related to Nanosuspensions: A Review. *Pharm Nanotechnol*. 2013;1(2):85–92.
32. Lourenco C, Teixeira M, Simões S, Gaspar R. Steric stabilization of nanoparticles: Size and surface properties. *Int J Pharm*. 1996;138(1):1–12.
33. Hang J, Shi L, Feng X, Xiao L. Electrostatic and electrosteric stabilization of aqueous suspensions of barite nanoparticles. *Powder Technol*. 2009;192(2):166–70.
34. Shegokar R. What nanocrystals can offer to cosmetic and dermal formulations. U: *Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics: Applications of Nanobiomaterials*. Elsevier Inc.; 2016. str. 69–91.
35. Peltonen L, Tuomela A, Hirvonen J. Polymeric Stabilizers for Drug Nanocrystals. U: Kumar Thakur V, Kumari Thakur M, editors. *Handbook of Polymers for Pharmaceutical Technologies*. New Jersey: John Wiley & Sons, Ltd; 2016. str. 67–89.
36. Yue PF, Wang Y, Wan J, Wu ZF, Hu PY, Zheng Q, i sur. The research progress of preparation methods of solid nanocrystal delivery system. *Yaoxue Xuebao*. 2012;47(9):1120–7.
37. Müller RH, Gohla S, Keck CM. State of the art of nanocrystals - Special features,

- production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;78(1):1–9.
38. Pelikh O, Hartmann SF, Abraham AM, Keck CM. *Nanocrystals for Dermal Application. U: Nanocosmetics.* Cham: Springer International Publishing; 2019. str. 161–77.
 39. Khadka P, Ro J, Kim H, Kim I, Kim JT, Kim H, i sur. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian J Pharm Sci.* 2014;9(6):304–16.
 40. Buckton G, Beezer AE. The relationship between particle size and solubility. *Int J Pharm.* 1992;82(3).
 41. Gao L, Zhang D, Chen M. Drug nanocrystals for the formulation of poorly soluble drugs and its application as a potential drug delivery system. *J Nanoparticle Res.* 2008;10(5):845–62.
 42. Lovrić J, Hafner A, Radiković M, Juretić M, Dürriegl M, Lakoš GP, i sur. Nanokristali djelatne tvari: fizičko-kemijska, farmaceutsko-tehnološka, biofarmaceutska i terapijska svojstva. *Farmaceutski glasnik.* 2015;355–84.
 43. Kraml M, Dubuc J, Gaudry R. Gastrointestinal Absorption of Griseofulvin: II Influence of Particle Size in Man. *Antibiot & Chemother.* 1962;12(4):239–42.
 44. Liversidge GG, Cundy KC. Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. *Int J Pharm.* 1995;125(1):91–7.
 45. Müller RH, Shegokar R, Gohla S, Keck CM. *Nanocrystals: Production, Cellular Drug Delivery, Current and Future Products.* 2011;411–32.
 46. Tuomela A, Saarinen J, Strachan CJ, Hirvonen J, Peltonen L. Production, applications and in vivo fate of drug nanocrystals. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2016;34:21–31.
 47. Chan HK, Kwok PCL. Production methods for nanodrug particles using the bottom-up approach. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(6):406–16.
 48. Sinha B, Müller RH, Möschwitzer JP. Bottom-up approaches for preparing drug

- nanocrystals: Formulations and factors affecting particle size. *Int J Pharm.* 2013;453(1):126–41.
49. Möschwitzer JP. Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process. *Int J Pharm.* 2013;453(1):142–56.
 50. Romero GB, Keck CM, Müller RH. Simple low-cost miniaturization approach for pharmaceutical nanocrystals production. *Int J Pharm.* 2016;501(1–2):236–44.
 51. Kumar S, Burgess DJ. *Nanosuspensions. U: Long Acting Injections and Implants.* Springer US; 2012. str. 239–61.
 52. Dumay E, Chevalier-Lucia D, Picart-Palmade L, Benzaria A, Gràcia-Julià A, Blayo C. Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation. *Trends Food Sci Technol.* 2013;31(1):13–26.
 53. Junyaprasert VB, Morakul B. Nanocrystals for enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Asian J Pharm Sci.* 2015;10(1):13–23.
 54. Keck CM, Müller RH. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2006;62(1):3–16.
 55. Fontana F, Figueiredo P, Zhang P, Hirvonen JT, Liu D, Santos HA. Production of pure drug nanocrystals and nano co-crystals by confinement methods. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018;131:3–21.
 56. Shegokar R, Müller RH. Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *Int J Pharm.* 2010;399(1–2):129–39.
 57. Rabinow BE. Nanosuspensions in drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(9):785–96.
 58. Hao J, Gao Y, Zhao J, Zhang J, Li Q, Zhao Z, i sur. Preparation and Optimization of Resveratrol Nanosuspensions by Antisolvent Precipitation Using Box-Behnken Design. *AAPS PharmSciTech.* 2014;16(1):118–28.
 59. Mohyeldin SM, Mehanna MM, Elgindy NA. The relevancy of controlled nanocrystallization on rifampicin characteristics and cytotoxicity. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:2209–22.

60. Zu Y, Li N, Zhao X, Li Y, Ge Y, Wang W, i sur. In vitro dissolution enhancement of micronized l-nimodipine by antisolvent re-crystallization from its crystal form H. *Int J Pharm.* 2014;464(1–2):1–9.
61. Baba K, Nishida K. Steroid nanocrystals prepared using the nano spray dryer B-90. *Pharmaceutics.* 2013;5(1):107–14.
62. Peltonen L, Hirvonen J. Drug nanocrystals – Versatile option for formulation of poorly soluble materials. *Int J Pharm.* 2018;537(1–2):73–83.
63. Zhang D, Tan T, Gao L, Zhao W, Wang P. Preparation of Azithromycin Nanosuspensions by High Pressure Homogenization and its Physicochemical Characteristics Studies. *Drug Dev Ind Pharm.* 2007;33(5):569–75.
64. Mishra PR, Shaal L Al, Müller RH, Keck CM. Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. *Int J Pharm.* 2009;371(1–2):182–9.
65. Kassem MA, Abdel Rahman AA, Ghorab MM, Ahmed MB, Khalil RM. Nanosuspension as an ophthalmic delivery system for certain glucocorticoid drugs. *Int J Pharm.* 2007;340(1–2):126–33.
66. Jacobs C, Müller RH. Production and characterization of a budesonide nanosuspension for pulmonary administration. *Pharm Res.* 2002;19(2):189–94.
67. Hong C, Dang Y, Lin G, Yao Y, Li G, Ji G, i sur. Effects of stabilizing agents on the development of myricetin nanosuspension and its characterization: An in vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm.* 2014;477(1–2):251–60.
68. Ahuja BK, Jena SK, Paidi SK, Bagri S, Suresh S. Formulation, optimization and in vitro–in vivo evaluation of febuxostat nanosuspension. *Int J Pharm.* 2015;478(2):540–52.
69. Shariare MH, Altamimi MA, Marzan AL, Tabassum R, Jahan B, Reza HM, i sur. In vitro dissolution and bioavailability study of furosemide nanosuspension prepared using design of experiment (DoE). *Saudi Pharm J.* 2019;27(1):96–105.
70. Li F, Li L, Wang S, Yang Y, Li J, Liu D, i sur. Improved dissolution and oral absorption by co-grinding active drug probucol and ternary stabilizers mixtures with planetary beads-milling method. *Asian J Pharm Sci.* 2019;14(6):649–57.

71. Zhou Y, Du J, Lulu W, Yancai W. Nanocrystals technology for improving bioavailability of poorly soluble drugs: A mini-review. *J Nanosci Nanotechnol.* 2017;17(1):18–28.
72. Jarvis M, Krishnan V, Mitragotri S. Nanocrystals: A perspective on translational research and clinical studies. *Bioeng Transl Med.* 2019;4(1):5–16.
73. Ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res.* 2015;6(2):105–21.
74. 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.
75. Mahinroosta M, Jomeh Farsangi Z, Allahverdi A, Shakoori Z. Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications. *Mater Today Chem.* 2018;8:42–55.
76. Peppas NA, Hoffman AS. Hydrogels. U: *Biomaterials Science.* Elsevier; 2020. str. 153–66.
77. Gupta A, Kowalczyk M, Heaselgrave W, Britland ST, Martin C, Radecka I. The production and application of hydrogels for wound management: A review. *Eur Polym J.* 2019;111:134–51.
78. Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. *Biomaterials.* 2003;24(24):4337–51.
79. Gu D, O'Connor AJ, G.H. Qiao G, Ladewig K. Hydrogels with smart systems for delivery of hydrophobic drugs. *Expert Opin Drug Deliv.* 2017;14(7):879–95.
80. Giuliano E, Paolino D, Fresta M, Cosco D. Drug-Loaded Biocompatible Nanocarriers Embedded in Poloxamer 407 Hydrogels as Therapeutic Formulations. *Medicines.* 2018;6(1):7.
81. Zarrintaj P, Ramsey JD, Samadi A, Atoufi Z, Yazdi MK, Ganjali MR, i sur. Poloxamer: A versatile tri-block copolymer for biomedical applications. *Acta Biomater.* 2020;110:37–67.
82. Jeong B, Kim SW, Bae YH. Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. *Adv Drug*

- Deliv Rev. 2012;64:154–62.
83. Kirchof S, Goepferich AM, Brandl FP. Hydrogels in ophthalmic applications. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;95:227–38.
 84. Fakhari A, Corcoran M, Schwarz A. Thermogelling properties of purified poloxamer 407. *Heliyon.* 2017;3(8):e00390.
 85. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res.* 2006;23(12):2709–28.
 86. Shin SC, Cho CW. Physicochemical characterizations of piroxicam-poloxamer solid dispersion. *Pharm Dev Technol.* 1997;2(4):403–7.
 87. Fakhari A, Anand Subramony J. Engineered in-situ depot-forming hydrogels for intratumoral drug delivery. *J Control Release.* 2015;220:465–75.
 88. Ur-Rehman T, Tavelin S, Gröbner G. Chitosan in situ gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. *Int J Pharm.* 2011;409(1–2):19–29.
 89. Mayol L, Quaglia F, Borzacchiello A, Ambrosio L, Rotonda MI La. A novel poloxamers/hyaluronic acid in situ forming hydrogel for drug delivery: Rheological, mucoadhesive and in vitro release properties. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;70(1):199–206.
 90. Stern R, Maibach HI. Hyaluronan in skin: aspects of aging and its pharmacologic modulation. *Clin Dermatol.* 2008;26(2):106–22.
 91. Bourguignon L, Ramez M, Gilad E, Singleton P, Man M, Crumrine D. Hyaluronan–CD44 interaction stimulates keratinocyte differentiation, lamellar body formation/secretion, and permeability barrier homeostasis. *Elsevier.* 2006;126:1356–65.
 92. Papakonstantinou E, Roth M, Karakiulakis G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Taylor Fr.* 2012;4(3).
 93. Beasley KL, Weiss MA, Weiss RA. Hyaluronic acid fillers: A comprehensive review. *Facial Plast Surg.* 2009;25(2):86–94.
 94. Weindl G, Schaller M, Schäfer-Korting M, Korting HC. Hyaluronic acid in the

- treatment and prevention of skin diseases: Molecular biological, pharmaceutical and clinical aspects. *Skin Pharmacol Physiol*. 2004;17(5):207–13.
95. Mandal A, Clegg JR, Anselmo AC, Mitragotri S. Hydrogels in the clinic. *Bioeng Transl Med*. 2020;5(2):1–12.
 96. Brown MB, Jones SA. Hyaluronic acid: A unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2005;19(3):308–18.
 97. Wei S, Xie J, Luo Y, Ma Y, Tang S, Yue P, i sur. Hyaluronic acid based nanocrystals hydrogels for enhanced topical delivery of drug: A case study. *Carbohydr Polym*. 2018;202:64–71.
 98. Brown MB, Marriott C, Martin GP. The effect of hyaluronan on the in vitro deposition of diclofenac within the skin. *Int J Tissue React*. 1995;17(4):133–40.
 99. Zaki H. Studying the effect of different gelling agent on the preparation and characterization of metronidazole as topical emulgel. *Asian J Pharm Clin Res*. 2019;12(3):571–7.
 100. Gupta M, Agrawal U, Vyas SP. Nanocarrier-based topical drug delivery for the treatment of skin diseases. *Expert Opin Drug Deliv*. 2012;9(7):783–804.
 101. Patel V, Sharma OP, Mehta T. Nanocrystal: a novel approach to overcome skin barriers for improved topical drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2018;15(4):351–68.
 102. Mura P, Maestrelli F, Cirri M, Furlanetto S, Pinzauti S. Differential scanning calorimetry as an analytical tool in the study of drug-cyclodextrin interactions. *J Therm Anal Calorim*. 2003;73(2):635–46.
 103. Jaksic I, Lukic M, Malenovic A, Reichl S, Hoffmann C, Müller-Goymann C, i sur. Compounding of a topical drug with prospective natural surfactant-stabilized pharmaceutical bases: Physicochemical and in vitro/in vivo characterization – A ketoprofen case study. *Eur J Pharm Biopharm*. 2012;80(1):164–75.
 104. Dragicevic-Curic N, Winter S, Stupar M, Milic J, Krajišnik D, Gitter B, i sur. Temoporfin-loaded liposomal gels: Viscoelastic properties and in vitro skin penetration. *Int J Pharm*. 2009;373(1–2):77–84.

105. Romero GB, Keck CM, Müller RH. Simple low-cost miniaturization approach for pharmaceutical nanocrystals production. *Int J Pharm.* 2016;501(1–2):236–44.
106. Romero GB, Keck CM, Müller RH, Bou-Chacra NA. Development of cationic nanocrystals for ocular delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016;107:215–22.
107. Li Y, Wang D, Lu S, Zeng L, Wang Y, Song W, i sur. Pramipexole nanocrystals for transdermal permeation: Characterization and its enhancement micro-mechanism. *Eur J Pharm Sci.* 2018;124:80–8.
108. Reis S, Neves, Lúcio, Martins, Lima. Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:177–87.
109. Pelikh O, Stahr P-L, Huang J, Gerst M, Scholz P, Dietrich H, i sur. Nanocrystals for improved dermal drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018;128:170–8.
110. Otto A, du Plessis J, Wiechers JW. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *Int J Cosmet Sci.* 2009;31(1):1–19.
111. Romero GB, Arntjen A, Keck CM, Müller RH. Amorphous cyclosporin A nanoparticles for enhanced dermal bioavailability. *Int J Pharm.* 2016;498(1–2):217–24.
112. Vidlářová L, Romero GB, Hanuš J, Štěpánek F, Müller RH. Nanocrystals for dermal penetration enhancement – Effect of concentration and underlying mechanisms using curcumin as model. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016;104:216–25.
113. Merisko-Liversidge E, Liversidge GG, Cooper ER. Nanosizing: A formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur J Pharm Sci.* 2003;18(2):113–20.
114. Peltonen L, Hirvonen J. Pharmaceutical nanocrystals by nanomilling: Critical process parameters, particle fracturing and stabilization methods. *J Pharm Pharmacol.* 2010;62(11):1569–79.
115. Martins ICB, Sardo M, Santos SM, Fernandes A, Antunes A, André V, i sur. Packing Interactions and Physicochemical Properties of Novel Multicomponent Crystal Forms of the Anti-Inflammatory Azelaic Acid Studied by X-ray and Solid-State NMR. *Cryst Growth Des.* 2016;16(1):154–66.

116. Manosroi J, Apriyani MG, Foe K, Manosroi A. Enhancement of the release of azelaic acid through the synthetic membranes by inclusion complex formation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Int J Pharm.* 2005;293(1–2):235–40.
117. Biswas N, Kuotsu K. Chronotherapeutically Modulated Pulsatile System of Valsartan Nanocrystals—an In Vitro and In Vivo Evaluation. *AAPS PharmSciTech.* 2017;18(2):349–57.
118. Fu Q, Xue Y, Cui Z. Size- and shape-dependent surface thermodynamic properties of nanocrystals. *J Phys Chem Solids.* 2018;116:79–85.
119. Oktay AN, Karakucuk A, Ilbasimis-Tamer S, Celebi N. Dermal flurbiprofen nanosuspensions: Optimization with design of experiment approach and in vitro evaluation. *Eur J Pharm Sci.* 2018;122:254–63.
120. Liu T, Müller RH, Möschwitzer JP. Consideration of the solid state for resveratrol nanocrystal production. *Powder Technol.* 2018;332:63–9.
121. Soisuwan S, Teeranachaideekul V, Wongrakpanich A, Langguth P, Junyaprasert VB. In vitro performances and cellular uptake of clarithromycin nanocrystals produced by media milling technique. *Powder Technol.* 2018;338:471–80.
122. Gnanamani A, Mitra T, Gnanamani A, Sailakshmi G. Use of Dicarboxylic Acid (Azelaic Acid) to Prepare Carbohydrate and Protein Based Scaffold Biopolymer with Improved Mechanical and Thermal Property for Biomedical Applications Injectable hydrogel for drug delivery for breast cancer treatment View project. *Artif Organs.* 2012;26(4):183–96.
123. Issa M, Issa MG, Ferraz HG. Intrinsic Dissolution as a Tool for Evaluating Drug Solubility in Accordance with the Biopharmaceutics Classification System. 2002.
124. Sarnes A, Østergaard J, Jensen SS, Aaltonen J, Rantanen J, Hirvonen J, i sur. Dissolution study of nanocrystal powders of a poorly soluble drug by UV imaging and channel flow methods. *Eur J Pharm Sci.* 2013;50(3–4):511–9.
125. Rawat A, Gupta SS, Kalluri H, Lowenborg M, Bhatia K, Warner K. Rheological Characterization in the Development of Topical Drug Products. U: *AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series.* Springer Verlag; 2019. str. 3–45.

126. Owen DH, Peters JJ, Katz DF. Comparison of the rheological properties of Advantage-S and Replens. *Contraception*. 2001;64(6):393–6.
127. Baloglu E, Karavana SY, Senyigit ZA, Guneri T. Rheological and mechanical properties of poloxamer mixtures as a mucoadhesive gel base. *Pharm Dev Technol*. 2011;16(6):627–36.
128. Matanović MR, Kristl J, Grabnar PA. Thermoresponsive polymers: Insights into decisive hydrogel characteristics, mechanisms of gelation, and promising biomedical applications. *Int J Pharm*. 2014;472(1–2):262–75.
129. Zahir-Jouzani F, Wolf JD, Atyabi F, Bernkop-Schnürch A. In situ gelling and mucoadhesive polymers: why do they need each other? *Expert Opin Drug Deliv*. 2018;15(10):1007–19.
130. Park E, Song K. Rheological Properties of Poloxamer 407 Solutions and Gels. *Annu Trans Nord Rheol Soc*. 2011;19:1–5.
131. 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.
132. Lee CH, Moturi V, Lee Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *J Control Release*. 2009;136(2):88–98.
133. Nižić L, Ugrina I, Špoljarić D, Saršon V, Kučuk MS, Pepić I, i sur. Innovative sprayable in situ gelling fluticasone suspension: Development and optimization of nasal deposition. *Int J Pharm*. 2019;563:445–56.
134. Shah VP, Williams RL. Importance of In Vitro Drug Release. U: *Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence, and Penetration*. Springer New York; 2014. str. 61–7.
135. Lauterbach A, Müller-Goymann CC. Comparison of rheological properties, follicular penetration, drug release, and permeation behavior of a novel topical drug delivery system and a conventional cream. *Eur J Pharm Biopharm*. 2014;88(3):614–24.
136. Higuchi T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *J Pharm Sci*. 1961;50(10):874–5.

137. Siepmann J, Peppas NA. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;48:139–57.
138. Dong K, Dong Y, You C, Xu W, Huang X, Yan Y, i sur. Assessment of the drug loading, in vitro and in vivo release behavior of novel pH-sensitive hydrogel. *Drug Deliv.* 2016;23(1):174–84.
139. USP, 2015a. <1724> Semisolid drug products – performance tests. U: USP 38/NF 33, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, SAD, str. 1625-1637.
140. Olejnik A, Goscianska J, Nowak I. Active compounds release from semisolid dosage forms. *J Pharm Sci.* 2012;101(11):4032–45.
141. Lusina Kregar M, Dürriegl M, Rožman A, Jelčić Ž, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J. Development and validation of an in vitro release method for topical particulate delivery systems. *Int J Pharm.* 2015;485(1–2):202–14.
142. Kulawik-Pióro A, Ptaszek A, Kruk J. Effective tool for assessment of the quality of barrier creams - relationships between rheological, textural and sensory properties. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2019;103:113–23.
143. Doktorovova S, Souto EB. Nanostructured lipid carrier-based hydrogel formulations for drug delivery: A comprehensive review. *Izd. 6, Expert Opinion on Drug Delivery.* Taylor & Francis; 2009. str. 165–76.
144. 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;125(1):180–8.
145. AK Mohiuddin. A Comprehensive Review of Acne Vulgaris. *Clin Res Dermatology Open Access.* 2019;6(2):1–34.
146. Dréno B, Pécastaings S, Corvec S, Veraldi S, Khammari A, Roques C. Cutibacterium acnes (Propionibacterium acnes) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates. *Izd. 32, Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* Blackwell Publishing Ltd; 2018. str. 5–14.
147. Hayashi N, Akamatsu H, Kawashima M. Establishment of grading criteria for acne severity. *J Dermatol.* 2008;35(5):255–60.

148. Ghodsi SZ, Orawa H, Zouboulis CC. Prevalence, severity, and severity risk factors of acne in high school pupils: A community-based study. *J Invest Dermatol.* 2009;129(9):2136–41.
149. Schaller M, Sebastian M, Röss C, Seidel D, Hennig M. A multicentre, randomized, single-blind, parallel-group study comparing the efficacy and tolerability of benzoyl peroxide 3%/clindamycin 1% with azelaic acid 20% in the topical treatment of mild-to-moderate acne vulgaris. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2016;30(6):966–73.
150. Mastrofrancesco A, Ottaviani M, Aspite N, Cardinali G, Izzo E, Graupe K, et al. Azelaic acid modulates the inflammatory response in normal human keratinocytes through PPAR γ activation. *Exp Dermatol.* 2010;19(9):813–20.
151. Wilkin JK. Rosacea: Pathophysiology and Treatment. *Arch Dermatol.* 1994;130(3):359–62.
152. Wilkin J, Dahl M, Detmar M, Drake L, Feinstein A, Odom R, et al. Standard classification of rosacea: Report of the National Rosacea Society expert committee on the classification and staging of rosacea. *J Am Acad Dermatol.* 2002;46(4):584–7.
153. Shinde UA, Parmar SJ, Easwaran S. Metronidazole-loaded nanostructured lipid carriers to improve skin deposition and retention in the treatment of rosacea. *Drug Dev Ind Pharm.* 2019;45(7):1039–51.
154. Torregrosa A, Ochoa-Andrade AT, Parente ME, Vidarte A, Guarinoni G, Savio E. Development of an emulgel for the treatment of rosacea using quality by design approach. *Drug Dev Ind Pharm.* 2020;46(2):296–308.
155. Thiboutot D, Thieroff-Ekerdt R, Graupe K. Efficacy and safety of azelaic acid (15%) gel as a new treatment for papulopustular rosacea: Results from two vehicle-controlled, randomized phase III studies. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48(6):836–45.
156. Del Rosso JQ. Management of facial erythema of rosacea: What is the role of topical α -adrenergic receptor agonist therapy? *J Am Acad Dermatol.* 2013;69(6):S44–56.
157. Saleem MD, Wilkin JK. Evaluating and Optimizing the Diagnosis of Erythematotelangiectatic Rosacea. *Dermatologic Clinics.* 2018;127–34.
158. Scheinfeld N, Berk T. A review of the diagnosis and treatment of rosacea. *Postgrad*

- Med. 2010;122(1):139–43.
159. Goldman MP, Bennett RG. Treatment of telangiectasia: A review. *J Am Acad Dermatol.* 1987;17(2):167–82.
 160. Carmichael A, Marks R, Graupe K, Zaumseil R. Topical azelaic acid in the treatment of rosacea. *J Dermatolog Treat.* 1993;4(S1).
 161. Maddin S. A comparison of topical azelaic acid 20% cream and topical metronidazole 0.75% cream in the treatment of patients with papulopustular rosacea. *J Am Acad Dermatol.* 1999;40(6 I):961–5.
 162. Bjerke R, Fyrand O, Graupe K, Fyrand O. Double-blind Comparison of Azelaic Acid 20% Cream and its Vehicle in Treatment of Papulo-pustular Rosacea. *Acta Derm Venereol.* 1999;79:456–9.
 163. Elewski BE, Fleischer AB, Pariser DM. A Comparison of 15% Azelaic Acid Gel and 0.75% Metronidazole Gel in the Topical Treatment of Papulopustular Rosacea: Results of a Randomized Trial. *Arch Dermatol.* 2003;139(11):1444–50.

7. POPIS KRATICA

AZA	azelatna kiselina
ANOVA	jednosmjerna analiza varijance
ADHD	poremećaj hiperreaktivnosti i deficita pažnje
AUC	površina ispod krivulje
C	medijan
CMC	kritična micelarna koncentracija
DMSO	dimetil-sulfoksid
COPD	kronična opstruktivna bolest pluća
DLS	metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti
DSC	diferencijalna pretražna kalorimetrija
FDA	Agencije za hranu i lijekove
FTIR	infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom
G'	modul pohrane
G''	modul gubitka
GRAS	sigurne pomoćne tvari
HA	hijaluronska kiselina
heLNS-AZA	liofilizirani oblik suspenzije nanokristala azelatne kiseline pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja
heLNS-AZA-PHA	Pluronic [®] F-127/hijaluronska kiselina hidrogel s uklopljenom azelatnom kiselinom u obliku liofilizata suspenzije nanokristala azelatne kiseline pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja
heNS-AZA	suspenzija nanokristala azelatne kiseline pripravljena metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja
heNS-AZA-FD	rekonstituirani uzorak suspenzije nanokristala azelatne kiseline pripravljene metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja nakon liofilizacije
HPH	metoda visokotlačnog homogeniziranja
HPC	hidroksipropilceluloza
HP-β-CD	hidroksipropil-β-ciklodekstrin
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
IDR	intrinzična brzina otapanja
PDI	indeks polidisperznosti
IQR	interkvartilni raspon
L-npAZA	liofilizirani oblik suspenzije neprocesuirane azelatne kiseline i polisorbata 60

leLNS-AZA	liofilizirani oblik suspenzije nanokristala azelatne kiseline pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja
leNS-AZA-FD	rekonstituirani uzorak suspenzije nanokristala azelatne kiseline pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja nakon liofilizacije
leLNS-AZA-PHA	Pluronic [®] F-127/hijaluronska kiselina hidrogel s uklopljenom azelatnom kiselinom u obliku liofilizata suspenzije nanokristala azelatne kiseline pripravljene metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja
leNS-AZA	suspenzija nanokristala azelatne kiseline pripravljena metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja
NLC	nanostrukturirani lipidni nosači
npAZA	neprocesuirani oblik azelatne kiseline
NSAID	nesteroidni protuupalni lijek
P	Pluronic [®] F-127
P407	poloksamer 407
P60	polisorbat 60
PAT	površinski aktivna tvar
PCS	fotonska korelacijska spektroskopija
PEG	polietilenglikol
PEO	polietilenoksid
PHA	Pluronic [®] F-127/hijaluronska kiselina hidrogel
PPO	polipropilenoksid
RDC	relativni udio kristalične frakcije
RDS	relativno standardno odstupanje
SD	standardna devijacija
SDS	natrijev dodecil sulfat
TPGS	tokoferol polietilenglikol sukcinat
$T_{sol-gel}$	temperatura faznog prijelaza
UV	ultraljubičasto zračenje
VA	vulgarne akne
Q	kvartil
WBM	metoda vlažnog mljevenja

ŽIVOTOPIS

Ivona Tomić rođena je 26. ožujka 1993. u Širokom Brijegu, Bosna i Hercegovina. Osnovnu školu i opću gimnaziju završila je također u Širokom Brijegu. Studij farmacije na Farmaceutskom fakultetu Sveučilišta u Mostaru upisala je 2011. godine. Tijekom studija nagrađena je Dekanovom i Rektorovom nagradom. Diplomirala je 2016. godine i stekla naziv magistre farmacije. Stručni ispit magistra farmacije položila je 2016. godine i time dobila odobrenje za samostalni rad u ljekarničkoj djelatnosti. Od 2017. godine zaposlena je na Farmaceutskom fakultetu Sveučilišta u Mostaru kao asistent u nastavi. Sudjeluje u izvođenju nastave iz kolegija Farmaceutika 1 i 2, Oblikovanje lijekova 1 i 2, Magistralna receptura, Kozmetologija i Odabrana poglavlja dermatofarmacije. Poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti (grana Farmacija) na Farmaceutko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2016. godine. Do sada je u koautorstvu objavila četiri znanstvena rada zastupljena u bazi *Web of Science*, od čega su tri citirana u *Current Contents* te jednu knjigu. Aktivno je sudjelovala na domaćim i međunarodnim znanstvenostručnim skupovima pri čemu je nekoliko puta bila član Organizacijskog odbora. Član je komore magistara farmacije Federacije Bosne i Hercegovine od 2018. godine.

Popis objavljenih radova i knjige:

1. **Tomić I**, Juretić M, Jug M, Pepić I, Cetina Čižmek B, Filipović-Grčić J. Preparation of in situ hydrogels loaded with azelaic acid nanocrystals and their dermal application performance study. *Int J Pharm.* 2019;563:249–58.
2. Gunarić A, **Tomić I**, Babić R, Gunarić F, Prlić M, Mandić M, i sur. Sensitive skin in the population of Herzegovina-Neretva country: Prevalence and clinical data. *Psychiatr Danub.* 2020;32:290–7.
3. **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;13(4):567.
4. Kondža M, Bojić M, **Tomić I**, Maleš Ž, Rezić V, Čavar I. Characterization of the CYP3A4 Enzyme Inhibition Potential of Selected Flavonoids. *Molecules.* 2021;26(10):3018.

5. Filipović-Grčić J, Pepić I, Šimić D, **Tomić I**, Zeljko Penavić J. Odabrana poglavlja dermatofarmacije. Mostar: Sveučilište u Mostaru; 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorski rad

RAZVOJ FUNKCIONALNOGA HIDROGELA S NANOKRISTALIMA AZELATNE KISELINE

Ivona Tomić

SAŽETAK

Azelatna kiselina (AZA) topikalno se primjenjuje u liječenju vulgarne akne (VA), rozaceje i hiperpigmentacija kože. Cilj ovog rada bio je ispitati može li se AZA nanonizirati metodom vlažnog mljevenja i uklopiti u hidrogel za topikalnu primjenu namijenjen liječenju indiciranih kožnih bolesti. AZA je uspješno nanonizirana metodom niskoenergetskog vlažnog mljevenja s malim udjelom, 0,3 % (*m/m*) površinski aktivne tvari, polisorbata 60, P60. Veličina nanokristala AZA u optimiranoj nanosuspenciji, leNS-AZA, iznosila je $59,2 \pm 3,8$ nm (PDI $0,142 \pm 0,112$). Uzorci nanosuspencija prevedeni su u suhi oblik, leLNS-AZA, liofilizacijom te su karakterizirani s obzirom na termička svojstva i intrinzičnu brzinu otapanja i uklapani u hidrogelove, leLNS-AZA-PHA, koji su pripremljeni mehaničkim miješanjem Pluronic[®]-a F-127 (10-20 %, *m/m*) (P) i hijaluronske kiseline (1 %, *m/m*) (HA) (PHA hidrogel) u količini koja odgovara masenom udjelu od 10 % AZA. Hidrogelovima su određena reološka svojstva, brzina oslobađanja AZA *in vitro* te penetracija AZA u rožnati sloj kože *in vivo*. Termičkom analizom je potvrđena kristalna struktura AZA u leLNS-AZA uzorcima s udjelom od oko 13 % amorfne strukture. Potvrđena je i interakcija nanokristala AZA s P60. Nanonizacijom je postignuto povećanje brzine otapanja leLNS-AZA u odnosu na neprocesuirani oblik AZA, npAZA, od 36,0 %, a 16,4 % u odnosu na liofilizirani oblik suspencije npAZA i polisorbata 60, L-npAZA. Povećanjem koncentracije P povećavala se viskoznost leLNS-AZA-PHA hidrogelova i smanjivala temperatura faznog prijelaza ($T_{sol-gel}$). Postotni udio oslobođene AZA iz leLNS-AZA-PHA hidrogelova bio je približno 10 puta veći u odnosu na komercijalno dostupnu Skinoren[®] kremu dok je brzina oslobađanja AZA iz hidrogelova bila neovisna o udjelu P. Koncentracijski profili ovisnosti količine AZA po jediničnoj površini o dubini penetracije u rožnati sloj kože uzoraka hidrogela leLNS-AZA-PHA-15 i leLNS-AZA-PHA-20 gotovo su identični s profilom Skinoren[®] kreme. Hidrogelu s udjelom P od 15 % (*m/m*), HA od 1 % (*m/m*) i AZA od 10 % (*m/m*) u obliku nanokristala procijenjena je učinkovitost u odnosu na Skinoren[®] kremu u bolesnika s blagim do umjerenim oblikom VA na koži lica. U tu svrhu nanosuspencija AZA pripravljena je metodom visokoenergetskog vlažnog mljevenja, heNS-AZA, s veličinom nanokristala AZA od $148,1 \pm 6,5$ nm (PDI $0,399 \pm 0,020$) te uspješno prevedena u suhi oblik, heLNS-AZA, liofilizacijom i uklopljena u PHA hidrogel, heLNS-AZA-PHA. Teksturnom analizom je određena čvrstoća heLNS-AZA-PHA hidrogela od $510,8 \pm 20,0$ g uz rad pri opterećenju silama smicanja od $467,9 \pm 28,0$ g s što ukazuje na prikladnu razmazivost hidrogela. U provedenom randomiziranom, dvostruko-slijepom kliničkom ispitivanju potvrđena je bolja ili jednaka učinkovitosti heLNS-AZA-PHA hidrogela u liječenju VA i rozaceje u odnosu na Skinoren[®] kremu.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 126 stranica, 25 slika, 20 tablica i 163 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: azelatna kiselina, nanokristali, hidrogel, akne, rozaceja, topikalna primjena

Mentor: **Dr. sc. Jelena Filipović-Grčić**, redovita profesorica, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Hafner**, redovita profesorica, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Dr. sc. Branka Marinović, redovita profesorica, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Dr. sc. Donatella Verbanac, izvanredna profesorica, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Rad prihvaćen: srpanj 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Pharmaceutical Technology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Doctorial dissertation

DEVELOPMENT OF A FUNCTIONAL HYDROGEL WITH AZELAIC ACID NANOCRYSTALS

Ivona Tomić

SUMMARY

Azelaic acid (AZA) is used topically to treat acne vulgaris (VA), rosacea, and hyperpigmentation of the skin. The aim of this study was to investigate whether AZA could be nanonized by wet milling and incorporated into a topical hydrogel intended for the treatment of the above skin conditions. AZA was successfully nanonized by low-energy wet milling method with a low content, 0.3 % (w/w) of surfactant, polysorbate 60, P60. The size of AZA nanocrystals in the optimized nanosuspension, leNS-AZA, was 59.2 ± 3.8 nm (PDI 0.142 ± 0.112). Samples of the nanosuspensions were converted to the dry form, leLNS-AZA, by lyophilization and characterized by thermal properties and intrinsic dissolution rate and incorporated into hydrogels, leLNS-AZA-PHA, prepared by mechanical mixing of Pluronic® F-127 (10-20 %, w/w) (P) and hyaluronic acid (1 %, w/w) (HA) (PHA hydrogel) in an amount equivalent to 10 wt % AZA. The hydrogels were used to determine the rheological properties, the rate of AZA release *in vitro*, and the penetration of AZA into the stratum corneum *in vivo*. Thermal analysis confirmed the crystal structure of AZA in the leLNS-AZA samples, with approximately 13 % of the structure being amorphous. The interaction of AZA nanocrystals with P60 was also confirmed. Nanonization resulted in a 36 % increase in the dissolution rate of leLNS-AZA compared to the unprocessed form of AZA, npAZA, and a 16.4 % increase compared to the lyophilized form of npAZA suspension and P60, L-npAZA. The increase in P concentration increased the viscosity of leLNS-AZA-PHA hydrogels and decreased the phase transition temperature ($T_{\text{sol-gel}}$). The percentage of AZA released from leLNS-AZA-PHA hydrogels was approximately 10-fold higher than that of commercial Skinoren® cream, while the rate of AZA release from hydrogels was independent of P. The concentration profiles of AZA per unit area as a function of depth of penetration into the stratum corneum of the leLNS-AZA-PHA-15 and leLNS-AZA-PHA-20 hydrogel samples were nearly identical to that of Skinoren® cream.

The efficacy of hydrogel with a P content of 15 % (w/w), HA of 1 % (w/w) and AZA of 10 % (w/w) in the form of nanocrystals was studied in comparison with Skinoren® cream in patients with mild to moderate VA on facial skin. For this purpose, an AZA nanosuspension was prepared by high-energy wet milling, heNS-AZA, with an AZA nanocrystal size of 148.1 ± 6.5 nm (PDI 0.399 ± 0.020) and successfully converted to a dry form by lyophilization, heLNS-AZA, and incorporated into a PHA hydrogel, heLNS-AZA-PHA. Texture analysis revealed strength of the heLNS-AZA-PHA hydrogel of 510.8 ± 20.0 g with a shear work of 467.9 ± 28.0 g s, indicating suitable spreadability of the hydrogel. A randomized, double-blind clinical trial confirmed better or equal efficacy of heLNS-AZA-PHA hydrogel in the treatment of VA and rosacea compared to Skinoren® cream.

The thesis is deposited in the Central Library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 126 pages, 25 figures, 20 tables and 163 references. Original is in Croatian language.

Key words: azelaic acid, nanocrystals, hydrogel, acne, rosacea, topical drug delivery

Supervisor: **Jelena Filipović-Grčić, Ph.D.**, Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.

Reviewers: **Anita Hafner, Ph.D.**, Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.

Branka Marinović, Ph.D., Professor, School of Medicine, University of Zagreb.

Donatella Verbanac, Ph.D., Associate Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.

Thesis accepted: July 2021.

PRILOG

Prilog sadrži dva originalna znanstvena rada objavljena u časopisima koji su zastupljeni u bazi *Web of Science Core Collection*, koji obrađuju problematiku iznesenu u ovom doktorskom radu:

1. **Tomić I**, Juretić M, Jug M, Pepić I, Cetina Čižmek B, Filipović-Grčić J. Preparation of in situ hydrogels loaded with azelaic acid nanocrystals and their dermal application performance study. *Int J Pharm.* 2019;563:249–58.
2. **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;13(4):567.



Preparation of *in situ* hydrogels loaded with azelaic acid nanocrystals and their dermal application performance study

Ivona Tomić^a, Marina Juretić^b, Mario Jug^c, Ivan Pepić^c, Biserka Cetina Čižmek^b, Jelena Filipović-Grčić^{c,*}

^a University of Mostar, Faculty of Pharmacy, Matice hrvatske bb, 88000 Mostar, Bosnia and Herzegovina

^b R&D, PLIVA Croatia Ltd, TEVA Group Member, Prilaz baruna Filipovica 25, 10000 Zagreb, Croatia

^c University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, A. Kovacica 1, 10000 Zagreb, Croatia

ARTICLE INFO

Keywords:

Azelaic acid
Nanocrystals
Hydrogels
Dermal application

ABSTRACT

Azelaic acid (AZA) is a dicarboxylic acid that is topically used in the treatment of acne and rosacea since it possesses antibacterial and keratolytic activity. The primary objective of this study was to develop an AZA nanocrystal suspension. It is expected that improved solubility and dissolution rate will result in advanced biopharmaceutical properties, primarily the dermal bioavailability. Furthermore, a topical nanocrystal AZA-loaded hydrogels composed of Pluronic® F127 and hyaluronic acid mixture that are able to deliver AZA into the stratum corneum and deeper skin layers were considered. This study was conducted in order to: 1) determine the effect of non-ionic Polysorbate 60 on the stabilization and particle size of the AZA nanocrystals, as well as the effect of Pluronic® F127, used as an *in situ* gelation agent, and hyaluronic acid on the viscoelastic properties and the drug release of composed hydrogels, 2) determine the relationship between the rheological properties of the gels and the penetration of AZA into the stratum corneum. The composed hydrogels revealed pseudoplastic flow behaviour. The increase in Pluronic® F127 concentration induced a domination of elastic over viscous behaviour of the gels. The gel containing 15% of Pluronic® F127, 1% of hyaluronic acid and lyophilised 10% nanocrystal AZA suspension was considered to be an optimal formulation, since it possessed the rheological and drug delivery properties desirable for an *in situ* gelling platform for dermal application.

1. Introduction

Azelaic acid (AZA) is a saturated, straight-chained dicarboxylic acid naturally produced by *Malassezia furfur*. This drug is topically used in the treatment of acne and rosacea since it possesses antibacterial (*Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*) and keratolytic activity. AZA also possesses a direct anti-inflammatory effect due to its scavenger activity of free oxygen radicals (Sieber and Hegel, 2014). AZA is a diprotic acid with pKa values of 4.53 and 5.33 and it has a limited solubility in water (≈ 0.24 g/100 g of water at 25 °C). At this concentration, it is therapeutically ineffective. Therefore, dosage forms and carrier-based delivery systems of AZA could have a significant effect on its skin absorption and penetration, and consequently, on its therapeutic efficacy (Li et al., 2012). Also, there is a need for magistral formulations of AZA in different concentrations related to the severity of acne and patients' needs for the best efficacy, tolerability, compliance, and cosmetic acceptability. That implies the existence of a soluble AZA form that can be incorporated in a range of vehicles with

high bioavailability upon topical application.

Prescription drugs containing AZA are generally available in the form of creams or gels in which AZA is present as a suspended solid. Regarding the AZA solubility enhancement, the various studies have been focused on its incorporation into microemulsions (Gasco et al., 1991; Ma et al., 2015), liquid crystals (Aytekin et al., 2013), lipid nanocarriers (Burchacka et al., 2016) and ethosomes (Mistry and Ravikumar, 2016). Also, the effect of 1,4-cyclohexanediol as a penetration retardant (Li et al., 2010) as well as the synthesis of the co-drug of hydroquinone and AZA (Hsieh et al., 2012) were studied with the aim of improving the AZA dermal delivery.

One of the novel technologies that can alter the drug penetration into the skin or even into the pilosebaceous unit is nanocrystal technology (Al-Kassas et al., 2017; Liu et al., 2011; Pawar et al., 2014). Nanocrystals are nanosized drug particles with an increased aqueous solubility and dissolution rate in comparison to larger sized materials (Pelikh et al., 2018).

Drug nanocrystals can be produced by the bottom-up technologies

* Corresponding author.

E-mail address: jfilipov@pharma.hr (J. Filipović-Grčić).

(anti solvent precipitation) or top-down technologies (media milling and high-pressure homogenization). They are usually produced as nanosuspensions in water and stabilized by ionic or non-ionic surfactants, polymers or a mixture of both (Ghosh et al., 2011; Verma et al., 2011). Nanocrystal suspensions can be further transformed into solid nanocrystals by spray-drying or freeze-drying. Nanocrystals have received considerable attention in dermal application due to these features: increased drug saturation solubility and dissolution rate due to the large surface area, increased concentration gradient between the formulation and the skin surface and increased adhesion properties of nanocrystals to the skin (Malamatari et al., 2018; Vidlářová et al., 2016).

Hydrogels are generally used as useful vehicles for nanocrystal suspensions (Patel et al., 2018). They can be structured only with water, which is greatly beneficial for nanocrystal carriers. The available literature data imply that mucoadhesive *in situ* forming hydrogels can provide an improved local therapy, controlled systemic therapeutic effects and drug targeting to the brain as well as an efficient delivery of the labile biopharmaceuticals such as vaccines or plasmid DNA. The main advantage of *in situ* formation of hydrogels is the ability to store and apply the formulation as a solution that rapidly transforms into a gel under the physiological conditions present at the site of application. The thus formed hydrogel prevents rapid clearance and thus increases the retention time and therapeutic efficacy of the drug. Numerous factors can lead to phase transition, including temperature increase, pH alteration, presence of ions at the application site or enzyme and oxidation triggered crosslinking (He et al., 2008; Zahir-Jouzdani et al., 2018). Thermoresponsive hydrogels are widely explored due to their simple application and low adverse effects on tissues compared to other stimuli. At a certain concentration, they represent a sol at an ambient temperature that undergoes temperature dependent gelation. The temperature above which a sol-to-gel phase transition occurs is defined as the lower critical solution temperature (LCST) and in the case of drug delivery systems, it should be between the average ambient temperature of 25 °C and the body temperature of 37 °C (Matanović et al., 2014; Zahir-Jouzdani et al., 2018).

Pluronics are perhaps the most extensively used *in situ* gelling polymers for topical drug delivery as they are relatively easy to manufacture and are generally considered as safe (GRAS) excipients widely employed in pharmaceutical fields (Matanović et al., 2014; Mayol et al., 2008). However, pluronic hydrogels have weak mechanical properties, poor mucoadhesion, and their LCST is largely dependent on the concentration of the polymer, which requires the application of a relatively high polymer concentration of 20–30% (w/V) which could lead to local toxic effects (Matanović et al., 2014). However, adverse properties of pluronic can be mitigated by mixing it with various mucoadhesive polymers in the appropriate ratio and concentration to obtain desirable formulation properties, such as specific sol-gel transition temperature (T_{gel}), gelation time, gel viscosity and mucoadhesive properties, that are capable to improve the therapeutic efficacy of such formulation (Zahir-Jouzdani et al., 2018). Some examples of such mucoadhesive thermal *in situ* gels consist of pluronic/hyaluronic acid hydrogel for topical application of acyclovir (Mayol et al., 2008), mucoadhesive nasal gel of itopride hydrochloride consisting of pluronic/hypromellose blend (Marzouk et al., 2018) and *in situ* forming Pluronic® F127/chitosan hydrogel that provides localised vaginal delivery of metronidazole (Malli et al., 2017). Functionality of such formulations can be further enhanced by the addition of various drug carrier systems, such as cyclodextrins (Cho et al., 2011) and liposomes (Mura et al., 2018).

In this study, attempts have been made to prepare and evaluate the *in situ* formation of hydrogels composed of Pluronic® F127 (P) and Hyaluronic Acid (HA) and loaded with a low dose of AZA in the form of nanocrystals to improve its solubility, dissolution rate and to enhance local bioavailability of AZA after topical application. For this purpose, AZA nanocrystal suspensions (NS-AZAs) were prepared by wet media milling technology and were further converted to solid AZA nanocrystals by freeze drying. The size of the NS-AZA particles has been

characterized. The solid state of LNS-AZA was tested by DSC and FTIR analysis. Moreover, rheological behaviour, *in vitro* release and *in vivo* skin permeability test for AZA loaded hydrogels were performed.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Azelaic acid (AZA) and Pluronic® F127 (P) were obtained from Sigma Aldrich (Chemie GmbH, Steinheim, Germany), Potassium dihydrogen phosphate was purchased from Gram-Mol (Zagreb, Croatia), Natriihyaluronas cosmetic (HA) and Polysorbate 60 (P60) were purchased from Kemig (Zagreb, Croatia), 20% AZA commercial cream (Skinoren®) was obtained from Bayer (Zagreb, Croatia). Disodium hydrogen phosphate was obtained from Kemika (Zagreb, Croatia). Phosphoric acid was obtained from Merck-Millipore (Billerica, MA, US). Acetonitrile and methanol, used as solvents, were obtained from Merck-Millipore (Darmstadt, Germany) and were of analytical grade. For all experiments the redistilled water was used.

SartolonPolyamid 0.45 µm membranes were obtained from Sartorius Stedim Biotech (Gottingen, Germany). Regenerated cellulose 0.2 µm membranes were obtained from Whatman (Freiburg, Germany).

Corneofix® F 20 roll of adhesive tapes with a surface area of 4.0 cm² were obtained from Courage + Khazaka electronic GmbH (Köln, Germany).

2.2. Preparation of AZAnanocrystal suspensions (NS-AZA)

The AZAnanocrystal suspensions were prepared using the wet media milling technique proposed by Romero et al. (2016b), with a slight modification. The milling chamber consisted of a round vial of 12 × 35 mm size containing five cylindrical magnetic stirrers of 6 × 10 mm in dimension. As a grinding media, a mixture of yttrium-stabilized zirconium oxide beads of 3 different diameter ranges (0.1 mm, 0.2 mm and 0.4 to 0.6 mm) were used, each present in equal ratio. The stirring was performed on a magnetic stirring plate (Magnetic stirrer MIX 15 eco, Berlin, Germany). Six samples were prepared by varying the P60 concentration and the batch size while keeping the AZA concentration (2% w/w), milling beads to batch size ratio (1:4 w/w), milling speed (350 rpm) and milling time (24 h) constant.

The abbreviation and composition of each sample are shown in Table 1.

The NS-AZA-5 nanocrystal suspension was selected for further use in all experiments. It was freeze-dried by freeze dryer Christ Alpha 1–4 (Martin Christ GmbH, Germany). The frozen samples were immediately inserted in the freeze dryer, pre-stabilized at –50 °C. After 24 h of freeze-drying, the vials containing lyophilizate of AZAnanocrystal suspension (LNS-AZA) were tightly closed and stored at 4 °C. To assess the influence of the selected drying process and P60 content on AZA physicochemical properties, a sample of non-milled AZA in 0.3% P60 aqueous solution was prepared and freeze-dried as described above.

Table 1

The abbreviation, composition and the applied milling conditions of AZAnanocrystal suspension samples.

Formulation (NS-AZA)	AZA (% w/w)	Polysorbate 60 (% w/w)	Batch size (g)	Weight of milling beads (g)
NS-AZA-1	2.0	2.0	2.5	0.6
NS-AZA-2	2.0	1.0	2.5	0.6
NS-AZA-3	2.0	0.5	2.5	0.6
NS-AZA-4	2.0	0.3	2.5	0.6
NS-AZA-5	2.0	0.3	5.0	1.2
NS-AZA-6	2.0	0.3	7.5	1.8

NS-AZA, nanocrystal suspension of azelaic acid.

Table 2
The abbreviation and composition of the hydrogels prepared.

Formulation	Pluronic® F127 (P) (% w/w)	Hyaluronic acid (HA) (% w/w)	Polysorbate 60 (P60) (% w/w)	AZA (% w/w)	AZA as lyophilizate of nanocrystal suspension (% w/w)	AZA as nanocrystal suspension (% w/w)
PHA-10	10	1				
PHA-15	15	1				
PHA-20	20	1				
AZA-PHA-10	10	1		10		
AZA-PHA-15	15	1		10		
AZA-PHA-20	20	1		10		
LNS-AZA-PHA-10	10	1	0.3		10	
LNS-AZA-PHA-15	15	1	0.3		10	
LNS-AZA-PHA-20	20	1	0.3		10	
NS-AZA-PHA-10	10	1	0.3			10
NS-AZA-PHA-15	15	1	0.3			10
NS-AZA-PHA-20	20	1	0.3			10

PHA, Pluronic® F127 /hyaluronic acid hydrogels; AZA-PHA, azelaic acid loaded Pluronic® F127 /hyaluronic acid hydrogels; LNS-AZA-PHA, Pluronic® F127 /hyaluronic acid hydrogels loaded with lyophilizate of azelaic acid nanocrystal suspension; NS-AZA-PHA, Pluronic® F127 /hyaluronic acid hydrogels loaded with azelaic acid nanocrystal suspension.

2.3. Hydrogels formulation

2.3.1. PHA hydrogels formulations

Hydrogels were prepared from Pluronic® F127 (P) at different concentrations (10, 15 and 20% w/w) and hyaluronic acid (HA) at constant concentration (1% (w/w)) and denoted as PHA hydrogels. PHA hydrogels were prepared by mechanical mixing of P and HA in the ratios given in Table 2, using FagronLab™ PRO unguator (Schefflitz, Germany) as follows: 50 mL of purified water was placed in the original FagronLab™ vessel, followed by the addition of the required amount of P and HA. Finally, the remaining amount of water was added, and the sample was kept overnight at 4 °C. The hydrated samples were further mixed for 18 min by 6 interchanging speed intervals (600 rpm vs. 1400 rpm) and time (340 s vs. 20 s). Composition and the abbreviation of the prepared PHA hydrogels are summarized in Table 2.

2.3.2. AZA-loaded PHA hydrogel formulations

The AZA-loaded PHA hydrogels were prepared with AZAnanocrystal suspension (NS-AZA), lyophilizate of AZAnanocrystal suspensions (LNS-AZA) and AZA powder. Composition and acronyms of prepared hydrogel samples are given in Table 2. In all samples, the final concentration of AZA was 10% (w/w). The HA content of all hydrogels was 1% (w/w) while the P content ranged from 10 to 20% (w/w). The preparation procedure and conditions were the same as described above for PHA hydrogels.

2.4. Characterizations

2.4.1. Particle size analysis of AZAnanocrystals

The mean particle size and polydispersity index (PDI) of nanocrystal suspensions were determined by photon correlation spectroscopy technique using Zetasizer HSA 3000 (Malvern Instruments, UK). The measurements were carried out at a temperature of 25 °C at a fixed angle of 90°. The average particle size and PDI of each sample were analysed in triplicate.

2.4.2. Solid state characterisation of AZAnanocrystals

Thermal analysis of samples was performed on Perkin-Elmer Diamond Differential Scanning Calorimeter (Perkin Elmer, Inc., USA) calibrated with indium (99.98% purity; melting point 156.61 °C and fusion enthalpy of 28.71 Jg⁻¹). The accurately weighed samples (3–5 mg, Mettler XS195 DualRange analytical balance) were placed in sealed aluminium pans with pierced lids and scanned at a 10 °C min⁻¹ heating rate at a temperature range of 25–125 °C under nitrogen purge (25 mL/min). The relative degree of drug crystallinity (RDC) in the samples was calculated according to Eq. (1)

$$RDC = \frac{\Delta H_{\text{sample}}}{\Delta H_{\text{drug}}} \times 100\% \quad (1)$$

where ΔH_{sample} and ΔH_{drug} are the fusion enthalpies of AZA in the analysed product (normalised to the drug content) and in the pure compound, respectively. The measurements were carried out in triplicate and the relative standard deviation of crystallinity data was < 2.5%.

Fourier-transform infrared spectra (FTIR) were acquired on a PerkinElmer Frontier spectrometer in the transmission mode using solid samples prepared as KBr pellets. For each pellet, 1 mg of the solid sample and 100 mg of KBr were weighed, grounded in an agate mortar and pressed. Spectra were recorded in a spectral range between 4000 and 400 cm⁻¹ at 4 cm⁻¹ resolution, averaging 32 scans to obtain a final spectrum.

2.4.3. Intrinsic dissolution rate measurements

The intrinsic dissolution rate test was performed using the Intrinsic Dissolution Apparatus (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US) and Dissolution Apparatus VK 7010 (Varian, Palo Alto, CA, US). Approximately 100 mg of the sample was manually compacted with a hydraulic bench-top press (Carver, Wabash, IN, US) using a compression force of 1.5 tons for 10 s to obtain a smooth compact pellet of 0.5 cm² surface area. The intrinsic dissolution rate of AZA was tested in 400 mL of degassed phosphate buffer of pH = 2.0.

For the preparation of phosphate buffer of pH = 2.0, Na₂HPO₄·x12H₂O (22.6 g/L) and KH₂PO₄ (3.4 g/L) were dissolved in double-distilled water and the pH was adjusted using phosphoric acid. The testing was performed at 32 °C and 50 rpm rotation speed. At appropriate time intervals a sample of 1 mL was taken. The intrinsic dissolution rate test was performed until around 10% of AZA was dissolved. AZA concentration in the obtained samples was determined by HPLC analysis as described in Section 2.4.5.2. The results are graphically displayed as the cumulative amount of AZA dissolved per unit of area as a function of time, where the slope of the obtained linear curve represents the intrinsic dissolution rate.

2.4.4. In vitro release study

Enhancer cells with an exposure area of 4 cm² (Agilent Technologies, USA) were used with a small volume configuration of the paddle apparatus (Agilent 708-DS Dissolution Apparatus, US) to study the release of AZA from prepared PHA hydrogel samples. The reservoir of the enhancer cells was filled with the tested formulation using a spatula and covered with a membrane that was pre-soaked in the *in vitro* release medium for at least 60 min. The compatibility of the membrane used and the hydrogel components was confirmed in preliminary experiments. The enhancer cells assembled according to the

manufacturer's instruction were placed at the bottom of the 200 mL dissolution vessels with the membranes facing up and then the 150 mL of the pre-heated *in vitro* release medium (0.05 M Phosphate buffer solution, pH 4.5) was added to start the experiment. For the preparation of phosphate buffer of pH = 4.5, potassium dihydrogen phosphate buffer (6.80 g/L) was dissolved in double-distilled water. The release medium temperature was maintained at 32 ± 0.5 °C and agitated using a mini paddle at a rotation speed of 50 rpm. At pre-determined time intervals (15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360 and 480 min), 1 mL of the release medium was withdrawn and replaced with equal volume of fresh thermostated medium. For each formulation, the release test was made in triplicate. The amount of AZA released in the collected samples was analysed by HPLC method as described in Section 2.4.5.2.

2.4.5. Rheological characterization of hydrogels

Rheological measurements were carried out using a Modular Compact Rheometer MCR 102 (Anton Paar GmbH, Austria) equipped with a parallel plate PP50 with a diameter of 50 mm and a cone plate CP50 with a cone diameter of 50 mm, an angle of 1° and a gap of 0.102 mm measuring system. The bottom plate temperature was controlled with a Peltier temperature control system with accuracy of 0.01 °C for fast and precise temperature control. Rheometer data analysis software RheoCompass TM Light (Anton Paar) was used to calculate the storage modulus (G'), loss modulus (G''), viscosity (η) and shear rate ($\dot{\gamma}$) and to analyse the rheological data. In all measurements, a fresh sample was used and it rested for 15 min after loading to allow material relaxation and temperature equilibration. All measurements were done in triplicate.

2.4.5.1. Oscillatory measurements. The temperature sweep test was performed to determine the T_{gel} , the temperature dependence of complex viscosity (η^*), the storage temperature dependence (G') and loss modulus (G''). The temperature sweep test was carried out on empty and AZA-loaded hydrogels at a strain of 0.1% and frequency of 1 Hz and the temperature was increased by 0.5 °C/min from 20 to 40 °C. Measurements were performed using a parallel plate of PP50 measuring system and the gap was set at 1.2 mm. The gelation temperature was determined as the temperature point at which intersection of the curves of measured G'' and G' occurred.

The frequency sweep measurements were conducted to clarify the relationship between the linear viscoelastic behaviour and microstructures of PHA and AZA-loaded PHA gels. The measurements were carried out in the angular frequency range from 0.1 to 100 rad/s at constant strain amplitude of 0.1%.

2.4.5.2. Rotation measurement. The viscosity (η) versus shear rate ($\dot{\gamma}$) was also determined for all formulations. Measurements of PHA gel formulations were performed using a cone plate measuring system employing a gap size of 0.102 mm. Measurements of AZA-loaded PHA gel formulations were performed with a parallel plate with a gap size of 1.2 mm and the temperature was set at 32°C. The viscosity was measured as a shear rate function in the range of 0.01 s^{-1} – 100 s^{-1} .

2.4.6. In vivo skin absorption assessment – tape stripping method

The tape stripping (TS) method was performed on volar forearm skin of the three healthy female volunteers aged between 25 and 28 (mean 26), who had no history of skin diseases or allergic reactions. They were involved in this study after each volunteer signed the consent for this minimally invasive technique. The volunteers spent 30 min in the study room prior to measurements in order to adapt to room conditions. The volunteers were asked not to apply cosmetic or skin care products up to 12 h prior to the experiment. The skin was not cleaned before the tape stripping test. At first, the area intended for the tape stripping procedure was marked with a permanent marker pen on both forearms.

A dose of 5 mg/cm^2 (Jaksic et al., 2012) was applied onto the assigned skin sites and gently distributed for 30 s with the latex glove. The finger of glove was previously dipped into tested formulations in order to fill the crevices and furrows and thus reached the exact amount of the formulation on the tested sites. Before the formulation was distributed, the finger glove was wiped clean. After a sitting time of 2 h at room temperature, the excess of formulation was removed with a soft and wet tissue. The adhesive tapes of constant surface area (4.0 cm^2) were used in the tape stripping procedure.

They were pressed on the skin using a roller to stretch the surface of the skin. The method of testing consisted of stripping the treated area (3 areas for each formulation) and each area was rapidly tape striped up to 12 times in a single movement on the same forearm of each volunteer. Each tape was weighed on the analytical balance (Mettler Toledo XS105, Zagreb, Croatia) prior to and immediately after stripping, and the amount of stratum corneum (SC) was deduced from the difference between the two weights. The weight of each SC layer was used to calculate the thickness of each SC layer using Eq. (2):

$$T = \frac{d}{a \cdot \rho} \quad (2)$$

where T is the thickness of the removed SC (μm), d is the difference in the weight of tape-strips before and after stripping (μg), a is the stripping area (μm^2), and ρ is the density of SC ($10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{m}^3$). Using Eq. (2) the cumulative SC thickness was obtained (Dragicevic-Curic et al., 2009).

The tape strips were placed in a centrifuge tube and 1.5 mL of methanol/H₂O (50/50% V/V) mixture was added. The tubes were submitted to sonification (BandelinSonorexDigitec; Berlin, Germany) for 15 min and centrifuged (HettichZentrifugen; Tuttlingen, Germany) at 4000 rpm for 5 min and the concentration of AZA on each strip was analysed by HPLC method. The LNS-AZA-15 and LNS-AZA-20 formulations were used as the test products and 20% of a commercial cream (Skinoren®) was used as a reference product.

After analysis of the tape strips by HPLC, the accumulated amount of penetrated AZA was calculated as follows: the amount of AZA on each of the sequential tape strips was summed for each individual examination area. The values thus obtained were used to calculate a mean value and standard deviation of accumulated AZA for each individual formulation. Depicted values are means and standard deviations of 6 individual tape stripping areas ($n = 6$).

2.4.7. Quantification

The quantitative determination of AZA in samples from the intrinsic dissolution rate study, *in vitro* release study and tape stripping study was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC). The HPLC method was developed specifically for the purpose of the analysis of the samples in this study. The HPLC analysis was performed on Agilent 1100 series (Agilent Technologies) using Waters XTerra RP18 Column (3.5 μm , 4.6 mm \times 100 mm) (Waters, Milford, MA, USA) and isocratic elution. Phosphate buffer of pH = 2.0 was prepared by dissolving KH₂PO₄ (6.8 g/L) in Milli-Q™ water (Merck-Millipore). The pH was adjusted to 2.0 by phosphoric acid and the buffer was filtered through a regenerated cellulose membrane filter (0.2 μm) before use.

A mixture of phosphate buffer pH = 2.0/acetonitrile (75/25%, V/V) was used as the mobile phase. The HPLC analysis was performed at 35 °C, 1.2 mL/min flow rate and 210 nm detection wavelength. The standard stock solution of AZA was prepared in methanol. The standard solutions were prepared by diluting the standard stock solution with phosphate buffer pH = 2.0, phosphate buffer pH = 4.5 and methanol/water (50/50%, V/V) for the purpose of HPLC analysis of samples from intrinsic dissolution rate, *in vitro* release and tape stripping study, respectively.

The injection volume was 50 μL and the samples were analysed undiluted. For each sequence, the standard solutions were prepared in duplicate and injected alternately. At least five standard solution

injections were done in each injection sequence. System suitability was evaluated according to the following criteria: the relative standard deviation (RSD) of the detector response factor for each injection of the standard solution in the sequence was not greater than 2.0%, and tailing factor of the drug peak was not greater than 2.0.

2.5. Statistical analysis

Statistical analysis of all data was made using a 1-way ANOVA followed by a multiparametric Tukey's post-hoc test with $P < 0.05$ as the minimal level of significance. Calculations were performed using the GraphPadPrism program (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA; www.graphpad.com). Rheological data were analysed using the Rheoplus software before further analysis with Microsoft Excel 16.2 and GraphPadPrism7.

3. Results and discussion

3.1. Particle size and PDI

The bead milling is frequently employed for industrial production of nanocrystals and requires the use of costly equipment. The milling chamber used in this study represents a simple, accessible, low-cost miniaturized setup. It contains 5 stirring bars and yttrium stabilized zirconium oxide milling beads of various sizes. The stirrer arrangement creates consistent stirring in the system, providing homogeneous energy dissipation in the milling volume thus creating similar movement of all the beads and suspension. This reduces to a minimum the volume of the suspension not being processed thus making the milling process efficient and reproducible (Romero et al., 2016b).

Such a simple milling chamber was proven to be as efficient as commercially available ball mills and high pressure homogenizer in nanonization of different compounds, like resorcinol, hesperidin, ascorbylpalmitate, apigenin, hesperidin and it was efficiently applied for the preparation of a cationic nanocrystal formulation containing dexamethasone acetate and polymyxin (0.10%) for ophthalmic application and pramipexolenanocrystals with enhanced transdermal delivery (Li et al., 2018; Vidlářová et al., 2016). Furthermore, such a simple small batch setup has a potential to be applied in preparation of magistral preparation containing nanocrystals, providing an enhanced individualized therapy (Lesko and Schmidt, 2012).

The wet milling of AZA was carried out using various concentrations of P60 (Table 1), a non-ionic surfactant used to increase stability and avoid aggregation of nanocrystals by introducing the steric repulsion (Reis et al., 2013). Pelikh et al. showed that dermal penetration is dependent on the drug particle size (Pelikh et al., 2018); therefore, the aim was to obtain the minimal achievable size of AZAnanocrystals using the lowest possible concentration of P60 due to the fact that surfactants can cause skin irritation (Otto et al., 2009). The milling was performed using the milling beads of various size (0.1 mm, 0.2 mm and 0.4–0.6 mm), each present in an equal ratio.

It is known that the particle size achieved by bead milling is related to the size of the milling beads used, with the general rule of thumb that the final dimension of nanocrystal is 1/1000 of the milling bead dimension. In this light, the smaller beads seem to be more acceptable as they move faster, accordingly having higher capacity to erode the surface and/or break the crystals being milled, but at the same time, cause a stronger wearing of the equipment, thereby introducing the impurities in the preparation. The application of the milling beads of various size range combined with prolonged milling time up to 24 h provides an acceptable option, with highly efficient milling without wearing the equipment (Romero et al., 2016b). The size and polydispersity of the prepared AZAnanocrystal suspension are given in Table 3.

Although the size of the prepared nanocrystals was slightly increased by decreasing the P60 concentration (38.3 ± 1.3 nm for NS-

Table 3

The particle size and polydispersity index (PDI) of AZAnanocrystal suspension samples.

Formulation (NS-AZA)	Particle size (nm \pm SD)	PDI
NS-AZA-1	38.3 ± 1.3	0.264
NS-AZA-2	40.3 ± 1.6	0.207
NS-AZA-3	61.7 ± 2.8	0.222
NS-AZA-4	58.8 ± 2.5	0.247
NS-AZA-5	59.2 ± 3.8	0.142
NS-AZA-6	117.7 ± 10.9	0.372

AZA-1 and 58.8 ± 2.5 nm for NS-AZA-4), the obtained results showed that the observed effect was not statistically significant. The size of the obtained nanocrystals was comparable to that of cyclosporine A, hesperidin and apigenin processed under similar conditions (Romero et al., 2016a; Vidlářová et al., 2016).

When the batch size was doubled with proportionately increased amount of the milling beads (NS-AZA-5), the size of the obtained nanocrystals was the same as in case of NS-AZA-4 (Table 3). However, any further increase of the processed batch size (NS-AZA-6) lead to less efficient milling process, resulting in nanocrystals that were twice as large as those of NS-AZA-4 and NS-AZA-5 ($P < 0.05$). Therefore, the NS-AZA-5 formulation was selected for further processing by freeze-drying in order to prepare a sample suitable for incorporation into a hydrogel at therapeutically relevant concentration.

3.2. Solid state characterisation of AZAnanocrystals

AZAnanocrystals in the solid state were isolated by freeze-drying of freshly prepared nanocrystal suspensions (NS-AZA). To investigate the influence of the freeze-drying procedure and P60 presence on the solid-state properties of AZA, the drug was dispersed in the 0.3% surfactant solution and freeze-dried (L-AZA) as well.

The thermal properties of both samples were compared to those of pure AZA powder. The obtained thermograms are presented in Fig. 1A. AZA presented a sharp endothermic peak with an onset temperature of 108.7°C (Fig. 1B) corresponding to a pure compound fusion, with the fusion enthalpy of 219.34 J/g . These results are in a good agreement with literature data (Manosroi et al., 2005; Martins et al., 2016). The L-AZA sample presented a comparable thermogram and the same fusion temperature, indicating that the presence of P60 and freeze-drying procedure alone did not affect the solid-state properties of the drug. In the case of lyophilizate of the AZAnanocrystal suspension (LNS-AZA), the peak of drug fusion was also observed, confirming the crystalline nature of the product obtained, but the fusion occurred at a lower temperature (Fig. 1B).

Such behaviour is also observed in the case of other nanocrystal formulations and it was attributed to the scale-down of the particles size into a nanometre range that increased the free energy of the systems and reduced the lattice energy (Biswas and Kuotsu, 2017; Fu et al., 2017; Oktay et al., 2018). The slight broadening of AZA fusion peak observed in the case of freeze-dried nanocrystals could be attributed to the *in situ* interaction of the drug and P60 present on nanocrystals surface during thermal analysis (Liu et al., 2018; Soisuwan et al., 2018). Furthermore, a significant reduction of AZA crystallinity was observed in the case of freeze-dried nanocrystal suspension, indicating the presence of 13% of the amorphous AZA in the milled sample (Fig. 1C). This could be attributed to an increased molecular disorder on the nanocrystal surfaces caused by the shear stress applied by the milling process (Soisuwan et al., 2018).

Further information on the solid-state properties of AZAnanocrystals was obtained by FTIR analysis. A spectrum of pure AZA presented a broad absorption band in the wave number range of $3300\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$ corresponding to overlapping of the stretching vibration of the C–H and OH groups (Fig. 1D). A single peak observed at

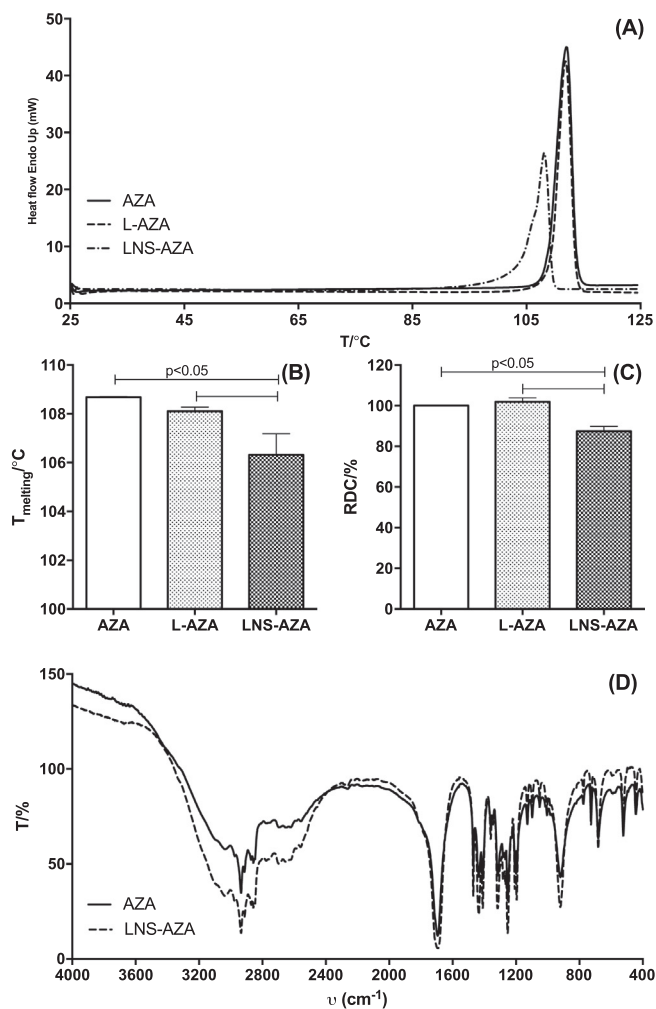


Fig. 1. Solid state characterization of AZA nanocrystals: DSC thermographs (A), melting temperature (B), relative degree of crystallinity (RDC, C) and FTIR spectra of pure AZA, lyophilised AZA in the presence of P60 (L-AZA) and lyophilised AZA nanocrystal suspension (LNS-AZA).

1704 cm^{-1} corresponds to the carbonyl group vibrations, while the peaks at 1439 , 1254 and 927 cm^{-1} could be attributed to the C–O–H in-plane bending, C–O stretching vibration and out of plane bending of the bonded O–H, respectively (Gnanamani et al., 2012). The LNS-AZA sample presented a comparable FTIR spectrum, confirming that the milling procedure did not alter the solid state of AZA, thus further contributing to the conclusion derived from DSC data.

3.3. Intrinsic dissolution rate

The intrinsic dissolution studies were performed in phosphate buffer pH 2.0 thermostated at $32\text{ }^{\circ}\text{C}$. This pH value was selected to ensure the presence of AZA in a completely unionized form (pKa values of AZA were 4.53 and 5.33, respectively), thereby avoiding problems related to changes in the compound solubility caused by slight variations in pH of the dissolution medium, while the temperature was set to resemble that of the skin surface. The obtained intrinsic dissolution profiles are presented in Fig. 2.

The calculated intrinsic dissolution rates (IDR) were $0.125 \pm 0.001\text{ mg min}^{-1}\text{ cm}^{-2}$, $0.146 \pm 0.003\text{ mg min}^{-1}\text{ cm}^{-2}$, $0.17 \pm 0.004\text{ mg min}^{-1}\text{ cm}^{-2}$ for pure AZA, L-AZA and LNS-AZA, respectively. The slight increase in IDR of 16.8% observed for the L-AZA sample could be attributed to local action of P60 that lead to increased wettability and solubilization of the drug (Sarnes et al., 2013). A further

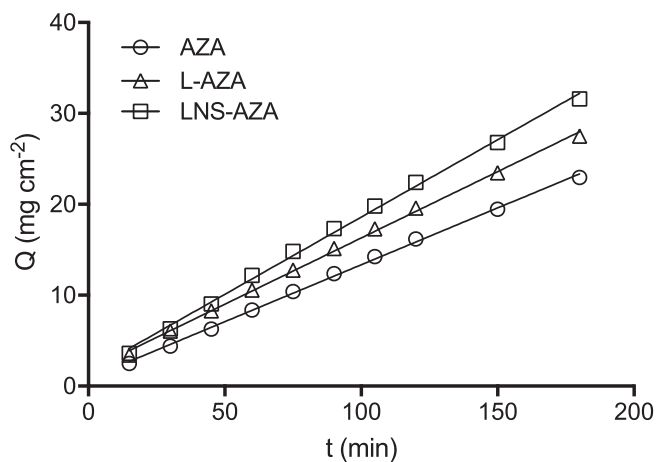


Fig. 2. Intrinsic dissolution profile of AZA, L-AZA and LNS-AZA in phosphate buffer pH 2 at $32\text{ }^{\circ}\text{C}$.

increase in IDR of 36% observed for the LNS-AZA with respect to that of pure drug could be related to increased surface energy of the sample caused by nanonization (Fu et al., 2018).

3.4. In vitro release study

Enhancer cell release tests are generally performed for 4–6 h hours, with at least 5 sampling points in the linear portion of the drug release profile (Lusina Kregar et al., 2015; USP, 2014). In selecting the sampling points for the release test of AZA-loaded PHA hydrogels these guidelines have been taken into account, as well as the characteristics of the obtained release curves. The obtained hydrogels and commercial cream release data against the square root of time were plotted. The release curves (Fig. 3) resemble the release curves typically obtained for semisolid formulations.

After the initial lag phase, a linear relationship between the amount of AZA released per unit area and the square root of time was observed for all samples. The linear relationship between the cumulative amount of drug released per unit area and the square root of time is commonly regarded as an indicator of diffusion-controlled drug release. However, the conclusions on the release mechanism should be made with caution.

The superposition of several different effects (such as diffusion, swelling, polymer dissolution) may also result in an apparent square root of time kinetics (Siepmann and Peppas, 2001). In the case of the tested hydrogels, although the diffusion mechanism is certainly

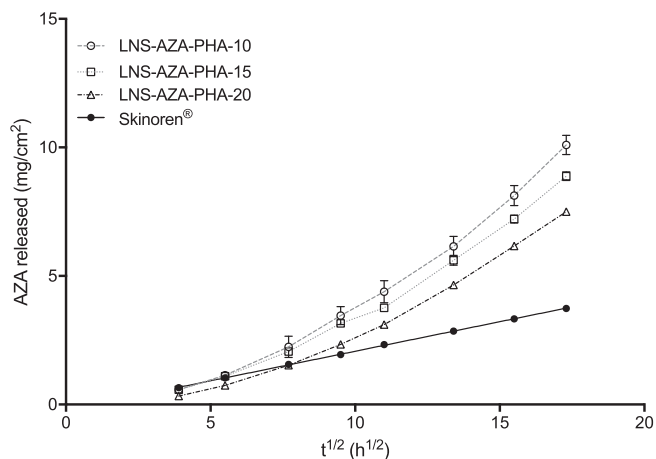


Fig. 3. In vitro release profiles of LNS-AZA-loaded PHA hydrogels in comparison to 20% AZA commercial cream plotted against square root of time (mean \pm SD, $n = 3$).

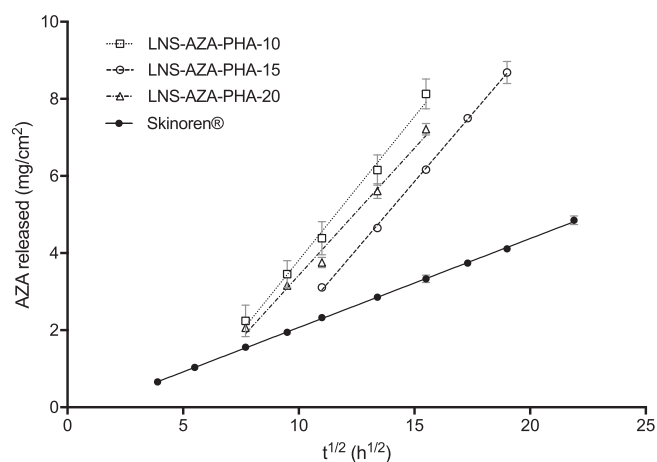


Fig. 4. *In vitro* release profiles corresponding to 10–30% of AZA released (mean \pm SD, $n = 3$).

involved in the drug release process, the contribution of other release mechanisms cannot be excluded on the basis of available data.

In the comparison to 20% AZA commercial cream which released 5% of AZA in 480 min, approximately 10 times higher AZA percentage of LNS-AZA-loaded hydrogels is released over the same time period, namely $49 \pm 5\%$, $36 \pm 7\%$ and $59 \pm 8\%$ of AZA was released from LNS-AZA-PHA-10, LNS-AZA-PHA-15 and LNS-AZA-PHA-20, respectively. Also, the release slopes of each test LNS-AZA loaded PHA hydrogel sample were compared with the reference 20% commercial cream sample by calculating 90% confidence interval of slope ratios (Lusina Kregar et al., 2015).

The release slope ratios failed the first stage requirement for sameness (the 90% confidence intervals were not within the range of 75–133.33%). The release rates were higher for LNS-AZA loaded PHA hydrogels than for the reference 20% commercial cream (Fig. 4). Also, the drug release from PHA hydrogels generally decreases with an increase in concentration of P. An increase in P concentration leads to an increase in the rheological strength of the gel, which influences the diffusion of the drug as well as the erosion (Dong et al., 2016; Lusina Kregar et al., 2015). However, when the release slopes corresponding to 10–30% of AZA release of test LNS-AZA loaded PHA hydrogel samples were compared mutually (Fig. 4) by calculating the 90% confidence interval of the slope ratios, the release slope ratios passed the first stage requirements for the product sameness.

3.5. Rheological characterization of hydrogels

The rheological behaviour of the gel vehicle for dermal administration can significantly affect the spreading and covering of the formulation over the skin as well as the residence time on the skin surface and enhance the bioavailability of drug nanocrystals (Wei et al., 2018). Therefore, the influence of P concentration and types of AZA load on the rheological behaviour of the PHA hydrogel was studied.

As illustrated in Fig. 5, the viscosity increased as the concentration of the P increased for both the P only hydrogels and PHA hydrogels. At shear rates up to 100 s^{-1} , the applied force would be less than the interaction forces of P or PHA micelles except for the P-10 gel where the applied force became greater than the interaction forces and gel therefore flowed. The viscosity of all gels decreased with respect to the applied shear rate, indicating that the gels belonged to a pseudoplastic fluid due to the typical shear thinning behaviour.

The incorporation of HA into P mostly influenced the PHA gels with the lowest P concentration (10%), namely PHA-10. The viscosity of PHA-10 gel almost does not change with the application of lower shear rates (up to 1 s^{-1}) following the slow viscosity decrease in accordance with the other tested gels with a higher P concentration (15% and

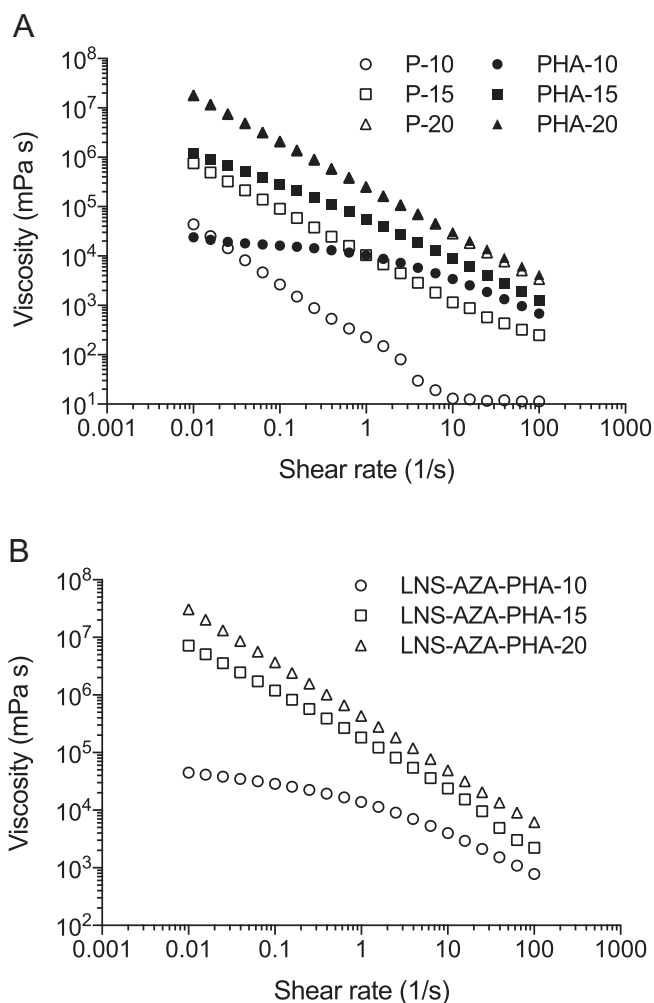


Fig. 5. Viscosity curves of P, PHA (A) and LNS-AZA-loaded PHA hydrogels (B) at $32 \text{ }^\circ\text{C}$ ($n = 3$).

20%).

The viscosity curves of the PHA hydrogels loaded with LNS-AZA are shown in Fig. 5B. It can be seen that LNS-AZA incorporation did not have a significant influence on the viscosity. The same was established for the gels with incorporated AZA nanocrystal suspension (NS-AZA), lyophilised AZA crystals and P60 (L-AZA) and AZA crystals (AZA) (data not shown).

The T_{gel} of *in situ* forming gels is the most critical parameter related to efficacy and safety as well as patient compliance since it influences the accuracy of dosing (dis)comfort associated with the application, and residence time on the skin surface. T_{gel} , G' , and η^* were determined by a temperature sweep test for LNS-AZA-loaded PHA hydrogels containing 15% and 20% of P. Fig. 6 reports the behaviour of viscosity as a function of temperature during sol–gel transition. In the investigated temperature range of $20\text{--}40 \text{ }^\circ\text{C}$, the decrease of viscosity as a function of temperature that would be typical for fluid systems (sol phase) was not seen and therefore it can be concluded that both LNS-AZA-loaded gels samples showed high viscosity through an inspected temperature interval, namely from 20 to $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Samples with a higher P concentration (20%) are more viscous than samples with a lower P concentration (15%), as expected. Also, the type of loading didn't have any effect on the gel rheology regardless of the P concentration (data not shown). An almost linear relationship is found between the P concentration and T_{gel} over a concentration range of 10–25% (w/w); the transition temperature is linearly decreased with increasing concentration (Park and Song, 2011). The PHA hydrogels showed a substantially different sol-gel

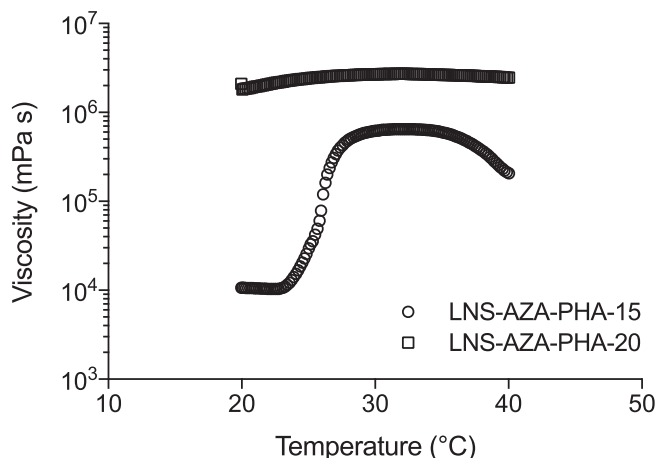


Fig. 6. Viscosity measurements of the LNS-AZA-loaded PHA hydrogels as a function of temperature.

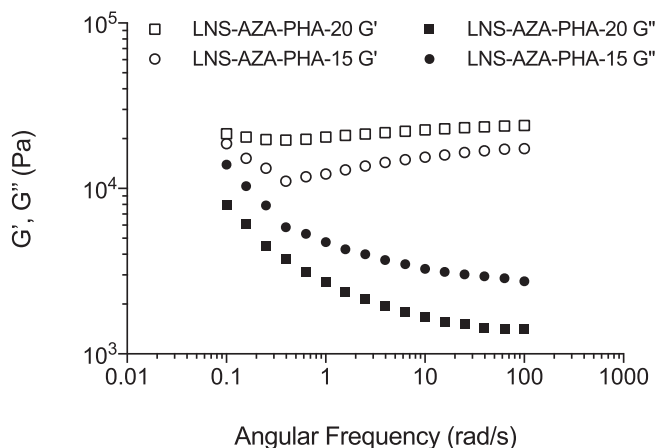


Fig. 7. Frequency sweep of LNS-AZA-loaded PHA hydrogels at 32°C. Empty symbols represent the storage modulus G' , while full symbols represent the loss modulus G'' ($n = 3$).

transition behaviour compared to the P only hydrogel exhibiting a superior sol-gel transition behaviour at low P concentration (Jung et al., 2017). The Fig. 7 shows the storage modulus and loss modulus as a function of angular frequency for LNS-AZA loaded PHA hydrogels. The LNS-AZA loaded PHA hydrogels revealed the dominance of elastic over viscous behaviour, since the magnitude of their G' was greater than that of the G'' throughout the range of examined angular frequencies. In addition, the G' is found to be weak function of angular frequency and the G'' is gradually decreased as an increase in angular frequency (Park and Song, 2011). The values of G' moduli increased with an increment in P concentration, indicating an increase in the elastic solid behaviour of gels due to the formation of more interactions in the polymer chains. When P is alone in aqueous solution, its gelation is explained by the organization of the P micelles under a micellar cubic phase (Dragicevic-Curic et al., 2009). The gelation mechanism might be quite different in the presence of HA and LNS-AZA. For instance, the HA chains might be able to bridge the P micelles, thus leading to the formation of a network of interconnected micelles (Jung et al., 2017). However, complementary studies of the P micellization in the presence of HA and LNS-AZA should be performed for example by small angle X-ray diffraction to elucidate the mechanism of gelation in ternary systems.

3.6. *In vivo* skin absorption assessment – Tape stripping method

The tape stripping (TS) was used to gain an insight into the AZA

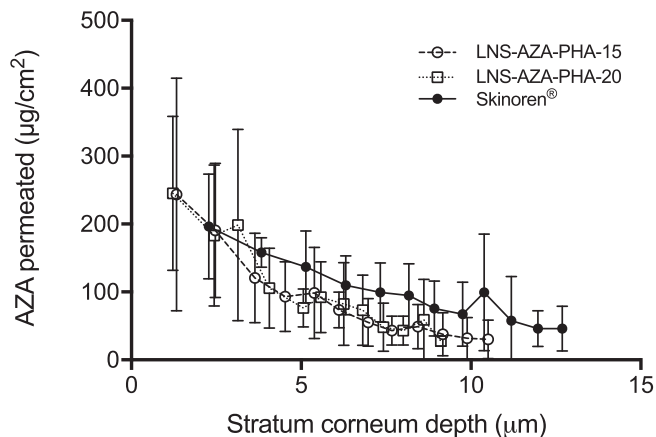


Fig. 8. *In vivo* concentration profiles of AZA across the SC of three subjects after 2 h treatment with the LNS-AZA in PHA-15 (open circle), PHA-20 (open square) or 20% AZA commercial cream (closed circle). The individual data points were evaluated by HPLC during sequential tape stripping of the SC. Values are means and standard deviations of 6 measurements ($n = 6$).

concentration profiles within the stratum corneum (SC) upon application of LNS-AZA-PHA-15 and LNS-AZA-PHA-20 hydrogels in comparison to 20% AZA commercial cream. The representative AZA concentration profiles delivered from the three vehicles are shown in Fig. 8. The values for the “AUC” calculated from the dependence of the penetrated amount of AZA expressed in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and SC penetration depth (μm) of each formulation as well as the accumulated penetrated amount of AZA expressed as percent of the applied dose can be found in Table 4.

All formulations showed similar total SC penetration depth (Fig. 8 and Table 4). Both, LNS-AZA-PHA-15 and LNS-AZA-PHA-20 hydrogels showed SC penetration depths and amounts of penetrated drug in the same range. A higher yet not statistically significant trend can be observed in 20% AZA commercial cream. As indicated in Table 4, the amount of AZA penetrated into the stratum corneum reached only values between 5 and 6% of the applied dose in the case of all formulations. After a 2 h incubation period in a defined area of the volar forearm, the rest of the formulation was dabbed away and thereby lost for analysis, so a low percentage of AZA in the SC indicates that both type of formulations, lipophilic commercial cream and hydrophilic PHA hydrogels were not able to penetrate deep into the skin and therefore have been removed.

In comparison to the tape stripping results, the rheological characteristics of the examined hydrogel samples seem to have little influence on the skin penetration behaviour, as differences in rheological characterisation due to the P concentration were not correlated to differences in the skin penetration behaviour.

However, the important influence of the AZA crystal size and the vehicle used for delivery was confirmed in the *in vitro* release characterisation of the examined formulations. Recently published results (Pelikh et al., 2018) suggest that oleogels and creams are the most suitable vehicles for dermal delivery of rutin and hesperetin nanocrystals resulting in a 400 and more than 2500-fold higher penetration compared to data achieved by carbopol hydrogels. Here, the *in situ* gelling system composed of a low concentration of thermoresponsive P

Table 4

“AUC”, stratum corneum penetration depth in μm and accumulated amount of AZA in % of the applied dose as found in tape stripping experiments. The values are means \pm SD of 6 experiments ($n = 6$).

	“AUC” \pm SD	SC penetration depth ($\mu\text{m} \pm$ SD)	AZA (% \pm SD)
PHA-15	224.0 \pm 117.7	10.5 \pm 0.85	5.33 \pm 2.38
PHA-20	234.5 \pm 143.3	9.1 \pm 0.91	6.17 \pm 3.09
Skinoren®	270.8 \pm 143.6	12.7 \pm 2.41	5.44 \pm 2.03

polymer physically mixed with a high molecular weight hyaluronic acid loaded with the AZAnanocrystals, produces similar SC penetration profile as a commercially available cream product of a double AZA concentration. It is generally accepted that skin type and conditions, as well as the characteristics of the application site should be also considered while selecting the vehicle. Additional benefit of hydrogel base is in its simplicity and ease of preparation. Therefore, it can be concluded that AZAnanocrystal-loaded PHA hydrogels may serve as a good platform for AZA magistral preparations.

4. Conclusions

Our study suggests that nanonization of AZA and its incorporation into a PHA composite thermosensitive hydrogel leads to an improved skin bioavailability since the similar effect in terms of stratum corneum penetration was obtained in comparison to a commercial product which contains double AZA concentration. The AZA nanocrystals of desirable size can be produced using the low concentration of P60 and simple milling procedure and equipment, which makes it feasible and possible to be potentially applied in magistral preparations suited for the individual needs of the patient. The rheology of the PHA composite hydrogel can be tailored by controlling the addition of P without causing the alteration of the sol-gel transition property.

The gel containing 15% of P and 1% of HA could be considered as an *in situ* gelling platform for the dermal application of nanonized AZA, as it showed the desirable drug delivery properties.

Acknowledgments

Authors are thankful to Iva Reljić from PLIVA Croatia Ltd. and Maja Radiković and Mirna Perkušić, both from the University of Zagreb, Faculty of Pharmacy for their help in conducting the experiments. The financial support of the Federal Ministry of Education and Science of Bosnia and Herzegovina and the University of Mostar in the frame of the NIR project “Development of an innovative dermal formulation with azelaic acid nanocrystals to improve the outcome of acne therapy” is kindly acknowledged.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest in this work.

Declaration of interest

None.

References

- Al-Kassas, R., Bansal, M., Shaw, J., 2017. Nanosizing techniques for improving bioavailability of drugs. *J. Control. Release* 260, 202–212.
- Aytemkin, M., Gursoy, R.N., Ide, S., Soylu, E.H., Hekimoglu, S., 2013. Formulation and characterization of liquid crystal systems containing azelaic acid for topical delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 39, 228–239.
- Biswas, N., Kuotsu, K., 2017. Chronotherapeutically modulated pulsatile system of valsartan nanocrystals – an *in vitro* and *in vivo* evaluation. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 18, 349–357. <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0511-5>.
- Burchacka, E., Potaczek, P., Padaszyński, P., Karłowicz-Bodalska, K., Han, T., Han, S., 2016. New effective azelaic acid liposomal gel formulation of enhanced pharmaceutical bioavailability. *Biomed. Pharmacother.* 83, 771–775.
- Cho, H.J., Balakrishnan, P., Park, E.K., Song, K.W., Hong, S.S., Jang, T.Y., Kim, K.S., Chung, S.J., Shim, C.K., Kim, D.D., 2011. Poloxamer/cyclodextrin/chitosan-based thermoreversible gel for intranasal delivery of fexofenadine hydrochloride. *J. Pharm. Sci.* 100, 681–691. <https://doi.org/10.1002/jps.22314>.
- Dong, K., Dong, Y., You, C., Xu, W., Huang, X., Yan, Y., Zhang, L., Wang, K., Xing, J., 2016. Drug Delivery Assessment of the drug loading, *in vitro* and *in vivo* release behavior of novel pH-sensitive hydrogel Assessment of the drug loading, *in vitro* and *in vivo* release behavior of novel pH-sensitive hydrogel. *Drug Deliv.* 23, 174–184.
- Dragicevic-Curic, N., Winter, S., Stupar, M., Milic, J., Krajišnik, D., Gitter, B., Fahr, A., 2009. Temoporfin-loaded liposomal gels: Viscoelastic properties and *in vitro* skin penetration. *Int. J. Pharm.* 373, 77–84.
- Fu, Q., Ma, M., Li, M., Wang, G., Guo, M., Li, J., Hou, Y., Fang, M., 2017. Improvement of oral bioavailability for nisoldipine using nanocrystals. *Powder Technol.* 305, 757–763. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2016.10.068>.
- Fu, Q., Xue, Y., Cui, Z., 2018. Size- and shape-dependent surface thermodynamic properties of nanocrystals. *J. Phys. Chem. Solids* 116, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2018.01.018>.
- Gasco, M.R., Gallarate, M., Pattarino, F., 1991. *In vitro* permeation of azelaic acid from viscosized microemulsions. *Int. J. Pharm.* 69, 193–196.
- Ghosh, I., Bose, S., Vippagunta, R., Harmon, F., 2011. Nanosuspension for improving the bioavailability of a poorly soluble drug and screening of stabilizing agents to inhibit crystal growth. *Int. J. Pharm.* 409, 260–268.
- Gnanamani, A., Sailakshmi, G., Mitra, T., 2012. Use of dicarboxylic acid (azelaic acid) to prepare carbohydrate and protein based scaffold biopolymer with improved mechanical and thermal property for biomedical applications. *Trends Biomater. Artif. Organs* 26, 183–196.
- He, C., Kim, S.W., Lee, D.S., 2008. *In situ* gelling stimuli-sensitive block copolymer hydrogels for drug delivery. *J. Control. Release* 127, 189–207. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.01.005>.
- Hsieh, P.-W., Al-Suwayeh, S.A., Fang, C.-L., Lin, C.-F., Chen, C.-C., Fang, J.-Y., 2012. The co-drug of conjugated hydroquinone and azelaic acid to enhance topical skin targeting and decrease penetration through the skin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 81, 369–378.
- Jakšić, I., Lukic, M., Malenovic, A., Reichl, S., Hoffmann, C., Müller-Goymann, C., Daniels, R., Savić, S., 2012. Compounding of a topical drug with prospective natural surfactant-stabilized pharmaceutical bases: Physicochemical and *in vitro/in vivo* characterization – a ketoprofen case study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 80, 164–175.
- Jung, Y., Park, W., Park, H., Lee, D.-K., Na, K., 2017. Thermo-sensitive injectable hydrogel based on the physical mixing of hyaluronic acid and Pluronic F-127 for sustained NSAID delivery. *Carbohydr. Polym.* 156, 403–408.
- Lesko, L.J., Schmidt, S., 2012. Individualization of drug therapy: history, present state, and opportunities for the future. *Clin. Pharmacol. Ther.* 92, 458–466. <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.113>.
- Li, N., Su, Q., Tan, F., Zhang, J., 2010. Effect of 1,4-cyclohexanediol on percutaneous absorption and penetration of azelaic acid. *Int. J. Pharm.* 387, 167–171.
- Li, N., Wu, X., Jia, W., Zhang, M.C., Tan, F., Zhang, J., 2012. Effect of ionization and vehicle on skin absorption and penetration of azelaic acid. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 38, 985–994.
- Li, Y., Wang, D., Lu, S., Zeng, L., Wang, Y., Song, W., Liu, J., 2018. Pramipexole nanocrystals for transdermal permeation: characterization and its enhancement micro-mechanism. *Eur. J. Pharm. Sci.* 124, 80–88.
- Liu, P., Rong, X., Laru, J., van Veen, B., Kiesvaara, J., Hirvonen, J., Laaksonen, T., Peltonen, L., 2011. Nanosuspensions of poorly soluble drugs: preparation and development by wet milling. *Int. J. Pharm.* 411, 215–222.
- Liu, T., Müller, R.H., Möschwitzer, J.P., 2018. Consideration of the solid state for resveratrol nanocrystal production. *Powder Technol.* 332, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.03.028>.
- Lusina Kregar, M., Dürrigl, M., Rožman, A., Jelčić, Ž., Cetina-Čižmek, B., Filipović-Grčić, J., 2015. Development and validation of an *in vitro* release method for topical particulate delivery systems. *Int. J. Pharm.* 485, 202–214.
- Ma, H., Yu, M., Tan, F., Li, N., 2015. Improved percutaneous delivery of azelaic acid employing microemulsion as nanocarrier: formulation optimization, *in vitro* and *in vivo* evaluation. *RSC Adv.* 5, 28985–28995.
- Malamatari, M., Taylor, K.M.G., Malamataris, S., Douroumis, D., Kachrimanis, K., 2018. Pharmaceutical nanocrystals: production by wet milling and applications. *Drug Discov. Today* 23, 534–547.
- Malli, S., Bories, C., Pradines, B., Loiseau, P.M., Ponchel, G., Bouchemal, K., 2017. *In situ* forming pluronic® F127/chitosan hydrogel limits metronidazole transmucosal absorption. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 112, 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.11.024>.
- Manosroi, J., Apriyani, M.G., Foe, K., Manosroi, A., 2005. Enhancement of the release of azelaic acid through the synthetic membranes by inclusion complex formation with hydroxypropyl-β-cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* 293, 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.01.009>.
- Martins, I.C.B., Sardo, M., Santos, S.M., Fernandes, A., Antunes, A., André, V., Mafra, L., Duarte, M.T., 2016. Packing interactions and physicochemical properties of novel multicomponent crystal forms of the anti-inflammatory azelaic acid studied by X-ray and solid-state NMR. *Cryst. Growth Des.* 16, 154–166. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b01057>.
- Marzouk, M.A., Osman, D.A., Abd El-Fattah, A.I., 2018. Formulation and *in vitro* evaluation of a thermoreversible mucoadhesive nasal gel of itopride hydrochloride. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 44, 1857–1867. <https://doi.org/10.1080/03639045.2018.1504059>.
- Matanović, M.R., Kristl, J., Grabnar, P.A., 2014. Thermoresponsive polymers: Insights into decisive hydrogel characteristics, mechanisms of gelation, and promising biomedical applications. *Int. J. Pharm.* 472, 262–275. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.029>.
- Mayol, L., Quaglia, F., Borzacchiello, A., Ambrosio, L., Rotonda, M.I.La., 2008. A novel poloxamers/hyaluronic acid *in situ* forming hydrogel for drug delivery: rheological, mucoadhesive and *in vitro* release properties. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.04.025>.
- Mistry, A., Ravikumar, P., 2016. Development and evaluation of azelaic acid based ethosomes for topical delivery for the treatment of acne. *Indian J. Pharm. Educ. Res.* 50, S232–S243. <https://doi.org/10.5530/ijper.50.3.34>.
- Mura, P., Mennini, N., Nativi, C., Richichi, B., 2018. *In situ* mucoadhesive-thermo-sensitive liposomal gel as a novel vehicle for nasal extended delivery of opiorphin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 122, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.10.008>.
- Oktya, A.N., Karakucuk, A., Ilbasim-Tamer, S., Celebi, N., 2018. Dermal flurbiprofen

- nanosuspensions: optimization with design of experiment approach and in vitro evaluation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 122, 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.07.009>.
- Otto, A., du Plessis, J., Wiechers, J.W., 2009. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *Int. J. Cosmet. Sci.* 31, 1–19.
- Park, E., Song, K., 2011. Rheological properties of poloxamer 407 solutions and gels. *Annu. Trans. Nord. Rheol. Soc.* 19, 1–5.
- Patel, V., Sharma, O.P., Mehta, T., 2018. Nanocrystal: a novel approach to overcome skin barriers for improved topical drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 15, 351–368.
- Pawar, V.K., Singh, Y., Meher, J.G., Gupta, S., Chourasia, M.K., 2014. Engineered nanocrystal technology: in-vivo fate, targeting and applications in drug delivery. *J. Control. Release* 183, 51–66.
- Pelikh, O., Stahr, P.-L., Huang, J., Gerst, M., Scholz, P., Dietrich, H., Geisel, N., Keck, C.M., 2018. Nanocrystals for improved dermal drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 128, 170–178.
- Reis, S., Neves, Lúcio, Martins, Lima, 2013. Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. *Int. J. Nanomed.* 177.
- Romero, G.B., Arntjen, A., Keck, C.M., Müller, R.H., 2016a. Amorphous cyclosporin A nanoparticles for enhanced dermal bioavailability. *Int. J. Pharm.* 498, 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.12.019>.
- Romero, G.B., Keck, C.M., Müller, R.H., 2016b. Simple low-cost miniaturization approach for pharmaceutical nanocrystals production. *Int. J. Pharm.* 501, 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.11.047>.
- Sarnes, A., Østergaard, J., Jensen, S.S., Aaltonen, J., Rantanen, J., Hirvonen, J., Peltonen, L., 2013. Dissolution study of nanocrystal powders of a poorly soluble drug by UV imaging and channel flow methods. *Eur. J. Pharm. Sci.* 50, 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.08.030>.
- Sieber, M.A., Hegel, J.K.E., 2014. Azelaic acid: properties and mode of action. *Skin Pharmacol. Physiol.* 27 (Suppl 1), 9–17.
- Siepmann, J., Peppas, N.A., 2001. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv. Drug Deliv. Rev.* 48, 139–157.
- Soiswan, S., Teeranachaideekul, V., Wongrakpanich, A., Langguth, P., Junyaprasert, V.B., 2018. In vitro performances and cellular uptake of clarithromycin nanocrystals produced by media milling technique. *Powder Technol.* 338, 471–480. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.07.036>.
- USP, 2014. < 1724 > Semisolid Drug Products-Performance Tests. Rockville, USA, pp. 1273–1284.
- Verma, S., Kumar, S., Gokhale, R., Burgess, D.J., 2011. Physical stability of nanosuspensions: investigation of the role of stabilizers on Ostwald ripening. *Int. J. Pharm.* 406, 145–152.
- Vidlářová, L., Romero, G.B., Hanuš, J., Štěpánek, F., Müller, R.H., 2016. Nanocrystals for dermal penetration enhancement – effect of concentration and underlying mechanisms using curcumin as model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 104, 216–225.
- Wei, S., Xie, J., Luo, Y., Ma, Y., Tang, S., Yue, P., Yang, M., 2018. Hyaluronic acid based nanocrystals hydrogels for enhanced topical delivery of drug: a case study. *Carbohydr. Polym.* 202, 64–71.
- Zahir-Jouzani, F., Wolf, J.D., Atyabi, F., Bernkop-Schnürch, A., 2018. In situ gelling and mucoadhesive polymers: why do they need each other? *Expert Opin. Drug Deliv.* 15, 1007–1019.

Article

Efficacy and Safety of Azelaic Acid Nanocrystal-Loaded In Situ Hydrogel in the Treatment of Acne Vulgaris

Ivona Tomić^{1,†}, Sandra Miočić^{2,†}, Ivan Pepić³, Dubravka Šimić^{1,4} and Jelena Filipović-Grčić^{3,*} 

¹ Faculty of Pharmacy, University of Mostar, Matice hrvatske bb, 88000 Mostar, Bosnia and Herzegovina; ivona.tomic@farf.sum.ba (I.T.); dubravka.simic@mef.sum.ba (D.Š.)

² R&D, PLIVA Croatia Ltd., TEVA Group Member, Prilaz baruna Filipovića 25, 10000 Zagreb, Croatia; Sandra.Miocic@pliva.com

³ Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia; ipepic@pharma.unizg.hr

⁴ Department of Dermatology and Venereology, University Clinical Hospital of Mostar, Kralja Tvrtka bb, 88000 Mostar, Bosnia and Herzegovina

* Correspondence: jfilipov@pharma.unizg.hr

† These authors contributed equally to the work.

Abstract: Acne vulgaris is a common, multifactorial, inflammatory skin disease affecting the pilosebaceous unit. Topical therapy is the first choice in the treatment of mild to moderate acne, and azelaic acid (AZA) is one of the most commonly used drugs. The aim of this study was to evaluate the safety and efficacy of a low-dose azelaic acid nanocrystal (AZA-NC) hydrogel in the treatment of mild to moderate facial acne. The study was designed as a double-blind, randomized controlled trial. Patients were randomized to treatment with AZA-NC hydrogel, 10%, or AZA cream, 20%, administered in quantities of approximately 1 g twice daily for 8 weeks. Efficacy of therapy was measured by the number of lesions and safety by the frequency and severity of adverse events. At week 8, the success rate of treatment with AZA-NC hydrogel, 10%, was 36.51% ($p < 0.001$) versus 30.37% ($p < 0.001$) with AZA cream. At week 8, treatment with AZA-NC hydrogel, 10%, resulted in a significant reduction in total inflammatory lesions from baseline of 39.15% ($p < 0.001$) versus 33.76% ($p < 0.001$) with AZA cream, and a reduction in non-inflammatory lesions from baseline of 34.58% ($p < 0.001$) versus 27.96% ($p < 0.001$) with AZA cream, respectively. The adverse event rate was low and mostly mild.

Keywords: azelaic acid; nanocrystals; hydrogels; acne; dermal application



Citation: 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**, *13*, 567. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040567>

Academic Editors:
Marta González-Álvarez and
Heather Benson

Received: 12 March 2021
Accepted: 14 April 2021
Published: 16 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Acne vulgaris (AV) is a common, chronic, inflammatory disease of the pilosebaceous unit that usually manifests during puberty, but it can occur at any age, especially in women. It is associated with various clinical presentations such as comedones, papules, pustules and nodules [1,2].

The pathophysiology includes four primary factors that interact in the development of acne lesions: (i) androgen-dependent hyperseborrhea, (ii) abnormal follicular keratinization leading to comedones, (iii) follicular colonization by *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*), and (iv) release of inflammatory mediators in the skin [3]. Acne lesions most commonly occur on the sites with the highest density of sebaceous glands, such as the face, neck, upper chest, shoulders, and back [4]. The inflammatory responses that stimulate and cause the different types of acne lesions include changes in the lipid profile of the sebaceous glands, dysseborrhea, stress, irritation, cosmetics, and possible dietary factors [5]. Due to the multifactorial pathophysiology, the treatment of AV should consider the full spectrum of pathogenic factors [6].

Acne can be treated topically, systemically, and by other treatments such as dermoabrasion, xenografting, autografting, and chemical peeling. Topical therapy is the first choice

in acne treatment, especially for mild and moderate acne. Topical products are applied directly to the affected area, which has several advantages, such as reducing systemic absorption and increasing exposure of pilosebaceous units for treatment [7].

Most conventional topical formulations usually have a high incidence of side effects such as skin irritation, erythema, and pruritus, which reduce patient compliance and thus the effectiveness of therapy [8]. The incidence and intensity of skin irritation depends not only on the type of drug but also on its concentration, the vehicle formulation used and mode of administration [6]. Therefore, the ultimate goal in the field of topical acne treatment is to provide highly effective and well-tolerated therapy [6,9]. In addition, newly developed vehicle formulations should increase efficacy, e.g., by progressive follicular penetration of the active ingredient, and improve patient tolerability and compliance. A wide range of colloidal delivery systems are under development, including polymeric and solid lipid nanoparticles, liposomes, nanostructured lipid carriers and nanoemulsions. These can increase drug stability and facilitate the formulation of lipophilic drugs [6].

Azelaic acid (AZA), the compound of interest in this study, is a saturated dicarboxylic acid naturally produced by *Malassezia furfur*. It possesses antibacterial (*C. acnes*), anti-inflammatory and keratolytic activity. In addition, AZA competitively inhibits tyrosinase, DNA synthesis and mitochondrial enzymes. Therefore, it is an effective agent for the topical treatment of mild to moderate AV and postinflammatory hyperpigmentation [10]. The half-life of topical AZA is approximately 12 h, so patients should apply it to the affected areas twice daily. A favorable treatment outcome for acne vulgaris is usually achieved within 4 weeks [11]. AZA has a good safety profile and a low potential for irritation [6].

Dermal nanocrystals have emerged as a novel and versatile approach to overcome the skin barrier and enhance topical drug delivery. Previous research has shown that nanocrystals improve dermal bioavailability by increasing penetration through the skin. Due to the increased surface area of the nanocrystals, the dissolution rate increases, making it possible to maintain a large concentration gradient between the formulation and the skin, and thus forcing diffusion of the drug into the skin [12–14].

The small particle size of nanosuspensions is critical for their *in vivo* activity; however, due to their inherent instability, their formulation and preparation is challenging. Nanoscale suspensions are known to be thermodynamically unstable and, therefore, prone to agglomeration or recrystallization, in some cases even during processing or, more commonly, during shelf life. To prevent Ostwald ripening, a phenomenon in which large crystals grow at the expense of dissolving small crystals, the formulated active ingredients should be poorly soluble and the formulation should be stabilized with suitable stabilizers in sufficient concentrations [15,16].

Wet milling and high-pressure homogenization are the two most commonly used technologies for the preparation of nanosuspensions. Previous studies have shown the superiority of the wet milling process over high pressure homogenization in preventing crystal growth during processing and shelf life [16,17].

The aim of this study was to prepare an *in-situ* hydrogel of Pluronic® F127 (P), hyaluronic acid (HA) and AZA in the form of nanocrystals (AZA-NC hydrogel). The particle size analysis of AZA nanocrystals suspension (AZA-NS) and the test of spreadability of AZA-NC hydrogel were also performed. In addition, the clinical efficacy of commercial AZA cream (Skinoren®) and AZA-NC hydrogel in reducing the number of inflammatory and non-inflammatory lesions in patients with mild to moderate AV was evaluated and compared.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Azelaic acid (AZA) and Pluronic® F127 (P) were purchased from Sigma Aldrich (Chemie GmbH, Steinheim, Germany). Sodium hyaluronate (HA) and polysorbate 60 (P60) were purchased from Kemig (Zagreb, Croatia), commercial AZA 20% cream (Skinoren®) was purchased from Bayer (Zagreb, Croatia). Redistilled water was used for all experiments.

2.2. Preparation of the AZA Nanosuspensions (AZA-NS)

AZA was dispersed in an aqueous solution containing 0.3% (*w/w*) P60 (stabilizer) for 10 min at 600 rpm using a magnetic stirrer (IKA, Staufen, Germany) to form a coarse macrosuspension containing 5% (*w/w*) azelaic acid. The prepared suspension was further homogenized at 2000 rpm for 3 min using Silverson LM5 homogenizer (Silverson Machines Inc., East Longmeadow, MA, USA) to destroy any drug agglomerates present. To further reduce the particle size, the macrosuspension was processed on a Dyno-Mill Re-searchlab bead mill (Willy A. Bachofen AG, Muttentz, Switzerland) at 4000 rpm for 180 min. Yttrium Stabilized Zirconium Oxide Beads (Silibeeds® type ZY-P Pharma, Sigmund Linder GmbH, Warmensteinach, Germany) with a size of 0.1–0.2 mm and a loading of 55 mL per milling chamber were selected for the milling process. Milling was carried out in recirculation mode. Considering the temperature-dependent solubility of the azelaic acid, the temperature of the suspension was maintained at 25 ± 2 °C during milling. The nanosuspensions (AZA-NS) were stored at 5 °C until freeze drying.

2.3. Freeze Drying of the AZA Nanosuspensions

Nanosuspensions were solidified by freeze drying using an AdVantage Pro benchtop freeze dryer (SP Scientific, United States). The 4 mL nanosuspensions in glass vials were frozen at -55 °C for 180 min (freezing rate 1.5 °C/min), followed by a cooling step (at -30 °C for 180 min) and further lowering of the temperature to -55 °C for another 180 min (freezing rate 2.5 °C/min). Ice removal by primary drying of the nanosuspensions was performed by gradually increasing the shelf temperature in 10 °C increment from -55 °C to 0 °C (600 min holding time at -45 °C, -35 °C and -25 °C, 300 min holding time -15 °C, -5 °C and 0 °C) for 35 h in a vacuum of 150 µbar. Secondary drying was carried out for 120 min at temperatures of 10 and 20 °C, respectively, and a vacuum of 100 µbar to remove adsorbed water. The obtained lyophilizates were resuspended with redistilled water to form the nanosuspension (AZA-NS-FD) and analyzed for particle size.

2.4. Particle Size Analyses

Samples of AZA-NS were taken after 2 (AZA-NS-1), 3 (AZA-NS-2) and 4 h (AZA-NS-3) of grinding and analyzed for particle size distribution. Particle size distribution was also determined for a sample of the reconstituted AZA-NS-lyophilizate (AZA-NS-FD).

The particle size distribution of the nanosuspensions was determined by dynamic light scattering (DLS) using the Zetasizer NaNO ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). The results are presented as the mean intensity-weighted particle population diameter (*z*-average) and the polydispersity index (PDI), which is a measure of the width of the particle size distribution. Samples were diluted 50 times with water prior to measurement. Measurements were performed at a temperature of 25 °C and a measurement angle of 173°. The mean values were calculated from 3 individual measurements. The samples analyzed and the results obtained are shown in Table 1.

Table 1. The *z*-average particle size and polydispersity index (PDI) of azelaic acid nanosuspensions (AZA-NS).

AZA-NS	Grinding Time (h)	<i>z</i> -Average (nm ± SD)	PDI
AZA-NS-1	2	188.7 ± 34.1	0.49
AZA-NS-2	3	148.1 ± 6.5	0.40
AZA-NS-3	4	144.8 ± 4.7	0.36
AZA-NS-FD *	3	269.9 ± 14.8	0.43

* sample of the reconstituted AZA-NS-lyophilizate.

2.5. AZA-NC Hydrogel Formulation

The AZA-NC hydrogel was prepared using the FagronLab™ PRO unguator (Scheßlitz, Germany) according to our previous study [18]. Half of the required amount of redistilled water was placed in the original FagronLab™ vessel, followed by the addition of the 15%

P, 1% HA and 10% lyophilizate of AZA nanocrystal suspension. Finally, the remaining amount of water was added. The mixing time was 26 min by 6 interchanging speed intervals (600 rpm vs. 1400 rpm) and times (485 s vs. 30 s vs. 510 s vs. 30 s vs. 485 s vs. 30 s).

2.6. Spreadability Test

The spreadability was investigated using a TTC spreadability device (HDP/SR*) at TA.XTplusC Texture Analyser (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, United Kingdom) at 20 ± 5 °C. In this test, a 90° cone-shaped probe is pressed at a defined speed and depth into precisely matched cone filled with hydrogel or cream. The cone probe was lowered into the sample from a fixed position of 25 mm at a defined velocity of 3 mm/s and a defined stroke depth of 23 mm, so that the sample flows outward at 45° between the cones. The measurements were performed in duplicate. The textural properties of the formulation were calculated using the instrument software Texture Exponent. The resulting plot of force versus time provides data on the strength of the sample, measured as the maximum force reached in the curve, and the spreadability, which corresponds to the shear work, i.e., the area under the curve.

2.7. Patients and Clinical Study Design

The study included patients aged 14 to 40 years of both sexes diagnosed with mild to moderate AV. Exclusion criteria included some of the other forms of acne (e.g., severe, nodular, cystic), the presence of other skin conditions such as psoriasis and various forms of dermatitis, use of systemic or laser acne therapy in the previous month, known hypersensitivity to any ingredient in the test formulations, and pregnant and lactating women.

The study, in which 68 patients participated, was completed by 60 patients. They were randomly assigned to two groups and received either a commercial AZA cream (Skinoren®) containing 20% AZA or an AZA nanocrystal hydrogel containing 10% AZA (AZA-NC hydrogel). Both patients and their dermatologists were blinded to the type of treatment. Patients were instructed to apply the treatments to the affected areas twice daily (morning and evening) for eight weeks. They were also instructed not to use cleansers or cosmetics on the treated areas during the study period, and they provided written informed consent before participating in the study. The number of lesions (inflammatory, non-inflammatory, and total) was collected before treatment began, and the dermatologist determined the status of the condition at 4 and 8 weeks. No other acne medications were allowed during the study.

In this study, a standard lesion count was used to classify acne into four groups according to Hayashi et al. [19], corresponding to mild (0–5), moderate (6–20), severe (21–50) and very severe (>50).

Approval for the study was obtained from the relevant ethics committees. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Voluntary informed consent forms were signed by all patients and/or their parents or guardians.

2.8. Statistical Analysis

Data were stored in the database MS Excel 2000 and the statistical program SPSS (SPSS for Windows 17.0, SPSS, Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. The Student *t*-test and Chi-Square test were used to analyze the sociodemographic characteristics. Student *t*-tests were used to calculate the mean number of lesions at baseline and to compare study results between groups. The efficacy of treatment within a given group was analyzed using the paired-samples *t*-test. The sampling distribution was tested using the Kolmogorov–Smirnov test. The statistical significance level was set at 0.05.

3. Results and Discussion

3.1. AZA-NS Particle Size and PDI

To produce a sufficient amount of AZA nanocrystals for clinical supply, it was necessary to scale up the milling process, from the small low energy milling process used in our previous study [18] to the high energy agitator milling process.

Low-energy bead milling processes produce very fine particles with narrow size distributions, but the milling time is very long because of the relatively low energy input. In grinding processes based on high energy methods, such as in the agitator bead mill, the power density is much higher, resulting in a significant reduction in production time. This makes grinding in the agitator bead mill the process of choice for large-scale pharmaceutical applications [20]. Wet milling was chosen for the preparation of azelaic acid nanocrystals because previous studies have shown the superiority of the low energy bead milling process over high pressure homogenization in preventing crystal growth during processing and shelf life [16,17].

Compared to the previous study [18], the concentration of azelaic acid in the milling suspension was increased from 2% to 5% (*w/w*) to reduce the amount of dissolved drug fraction and increase stability, while increasing the efficiency of the milling process. Concentrations higher than 5% (*w/w*) resulted in a sharp increase in the viscosity of the suspension at the beginning of the milling, which made it impossible to continue the process.

Small beads of 0.1–0.2 mm and a high agitator speed were chosen to further improve the milling effect and reduce the processing time.

Stabilizers used in the formulation of nanosuspensions adsorb on the surfaces of nanocrystals and support the stability of the suspension by steric or electrostatic repulsion. It is reported in the literature that the optimum steric stabilizer to drug ratio should be in the range of 0.05:1 to 0.5:1 [21]. In the present study, the nonionic surfactant polysorbate 60 was selected for steric stabilization of the formulation at the ratio of surfactant to active ingredient of 0.06:1.

To determine the optimum milling time, samples were taken after 2, 3 and 4 h of continuous milling in recirculation mode and analyzed for particle size and PDI. The results are presented in Table 1.

The particle size distributions obtained were in agreement with the particle sizes reported for most nanosuspensions prepared by the wet milling process (ranging from 100 nm to 300 nm in size) [20,22]. No crystal growth was observed during the milling process. The process was successfully scaled using agitated ball mill technology, resulting in a 40-fold increase in processed suspension batch size (from 7.5 g to 300 g of suspension) and an 8-fold decrease in processing time (from 24 h to 3 h) compared to the previous study [18].

Since the particle size reached a plateau after 3 h of milling, the AZA-NS-2 nanosuspension was selected for further processing by freeze drying to prevent the occurrence of Ostwald ripening and crystal growth.

The freeze-drying step is a crucial process to ensure the stability of the nanocrystals. As previously reported, the nanocrystals tend to form non-dispersive agglomerates, especially during the freeze step, which affects the nanonization achieved during wet milling. To prevent this effect, the addition of a cryoprotective agent to the formulation may be necessary [23].

To enable homogenous incorporation of azelaic acid nanocrystals into the hydrogel, the aim of the freeze-drying process was to generate lyophilizates that can be readily reconstituted into nanocrystals close to their original size.

The applied freeze-drying process resulted in a stable cake structure (Figure 1) that can be easily dispersed into nanocrystals without the need to add cryoprotectants to the formulation. The observed increase in crystal size from 144.8 nm to 269.9 nm after freeze drying could be attributed to the slight agglomeration of nanocrystals during the freeze-drying process. This change is acceptable because the resulting particle size was still in the target size range for which increased skin penetration was observed [12,24].



Figure 1. Azelaic acid nanocrystals lyophilizate.

The satisfactory redispersibility properties of the cake can be attributed to the fast freezing rate and low concentration of nanocrystals in the suspension. As previously reported, during fast freezing, as the crystal growth of water progresses, the nanocrystals will not have sufficient time to move around and aggregate. Furthermore, a decrease in concentration leads directly to an increase in the distance between the particles, resulting in a reduced number of collisions between the particles and, thus, reducing aggregation [25].

Compared to a commercial 20% AZA cream that released 5% AZA in 480 min, an approximately 10-fold higher percentage of AZA was released from the AZA nanocrystal-loaded hydrogels in the same time period, as we have previously reported [18]. Therefore, we should expect the similar trend to be maintained here, as the particle size of the AZA nanocrystals, as well as the hydrogel formulation, remains similar.

3.2. Spreadability of AZA-NC Hydrogel

Spreadability is one of the essential properties of the topical formulation with respect to patient compliance. Even application of the product to the skin is easier and more acceptable to the patient if it has adequate spreadability. In addition, formulations with better spreadability can cover a larger area of the skin during application, which can improve the therapeutic effect [26].

Slight spreading is associated with low product strength. Texture profile analysis (TPA) showed that the strength and shear behaviour of AZA-NC hydrogel were 510.8 ± 2.0 g and 467.9 ± 28 g s, respectively, indicating that the strength of the hydrogel is low and it can spread at low shear [27]. Moreover, the strength and shear behaviour of AZA-cream were 3050.6 ± 61 g and 1079.0 ± 20.8 g s, respectively.

3.3. Efficacy of AZA-NC Hydrogel

The efficacy of AZA-NC hydrogel, 10%, compared with AZA cream, 20%, in the treatment of mild to moderate acne lesions on the face was evaluated in a double-blind, randomized clinical trial. The reason for the lower dosage of AZA than in all commercially available products (cream, 20%; gel, 15%; foam, 15%) was to reduce potential side effects such as burning, stinging, itching, dry skin, erythema, and irritation observed with 15% AZA gel and 20% AZA cream [11]. Furthermore, considering the *in vitro* results of AZA penetration into the skin from our previously published study [18], which showed that the AZA amount and total stratum corneum penetration depth were similar between 10% AZA gel and 20% AZA cream, a similar effect on acne lesions *in vivo* can be expected.

Seventy-five patients were initially screened, of whom 68 patients fulfilled the inclusion criteria and were randomized in two treatment groups: (i) thirty-five patients (51.47%) were randomized to AV treatment with AZA cream and (ii) thirty-three patients (48.53%) were randomized to AV treatment with AZA-NC hydrogel. Eight patients were excluded from the study; specifically, an adverse event occurred in one patient treated with AZA cream, three patients (two treated with AZA cream and one treated with AZA-NC hydrogel) requested to be excluded, and four patients (two treated with AZA cream and

two treated with AZA-NC hydrogel) were lost to follow-up. The patient flow diagram is shown in Figure 2.

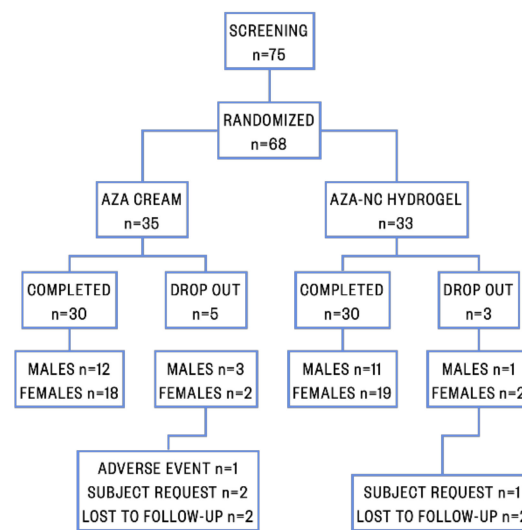


Figure 2. Patient flow diagram.

A total of 60 patients (23 males; 38.3% and 37 females; 61.7%) participated regularly in the study. The mean age of the patients was 18.83 ± 2.321 in the AZA cream treatment group and 18.57 ± 3.093 in the AZA NC hydrogel treatment group. The distribution by gender and all other sociodemographic characteristics, including work status and lifestyle habits such as smoking and alcohol consumption measured at baseline, were comparable and did not differ significantly between groups (Table 2).

Table 2. Sociodemographic patient characteristics.

Patient Characteristic	AZA Cream	AZA-NC Hydrogel	<i>p</i> -Value
Age (mean \pm SD)	18.83 ± 2.321	18.57 ± 3.093	0.707
Gender (n; %)			<1
M	12; 40.0%	11; 36.7%	
F	18; 60.0%	19; 63.3%	
Smoking (n; %)	12; 40.0%	11; 36.7%	<1
Alcohol consumption (n; %)	9; 30.0%	9; 30.0%	<1
Work status (n; %)			
Employed	2; 6.7%	4; 13.3%	
Student	20; 66.7%	13; 43.3%	
Pupil	8; 26.7%	13; 43.3%	

The number of inflammatory, non-inflammatory, and total lesions was initially comparable, and the difference between treatment groups was not statistically significant ($p > 0.05$) (Table 3).

Table 3. The mean number of lesions at baseline in all patients.

Lesions type_week	AZA Cream Mean \pm SD	AZA-NC Hydrogel Mean \pm SD	<i>p</i> -Value
Inflammatory lesions_0	5.43 ± 3.421	6.13 ± 3.501	0.437
Non-inflammatory lesions_0	7.63 ± 4.189	8.00 ± 3.877	0.726
Total lesions_0	13.07 ± 7.080	14.13 ± 6.872	0.556

A comparison of the efficacy of reducing the number of inflammatory and non-inflammatory lesions after four- and eight-week treatment with AZA cream or AZA-NC hydrogel is shown in Table 4. The results show that both treatments were associated with a reduction in both inflammatory and non-inflammatory lesions. In addition, both treatments showed efficacy after four weeks of twice-daily AZA administration and a further increase in efficacy after eight weeks.

Table 4. The mean number and percentage reduction in inflammatory and non-inflammatory lesions after 4 and 8 weeks of treatment.

Lesions type_week(s)	AZA Cream Mean \pm SD	AZA-NC Hydrogel Mean \pm SD	<i>p</i> -Value
Inflammatory lesions_0	5.43 \pm 3.421	6.13 \pm 3.501	0.437
Inflammatory lesions_4	4.80 \pm 3.253	5.30 \pm 3.153	0.548
Inflammatory lesions_8	3.60 \pm 2.430	3.73 \pm 2.612	0.839
Diff. inflammatory lesion 0–4	0.63 \pm 0.556	0.83 \pm 0.791	0.262
Reduction_4 (%)	11.66	13.59	
Diff. inflammatory lesion 0–8	1.83 \pm 1.206	2.40 \pm 1.248	0.079
Reduction_8 (%)	33.76	39.15	
Non-inflammatory lesions_0	7.63 \pm 4.189	8.00 \pm 3.877	0.726
Non-inflammatory lesions_4	6.73 \pm 3.823	6.90 \pm 3.614	0.863
Non-inflammatory lesions_8	5.50 \pm 3.330	5.23 \pm 3.137	0.751
Diff. non-inflammatory lesion 0–4	0.93 \pm 0.740	1.10 \pm 0.845	0.420
Reduction_4 (%)	12.23	13.75	
Diff. non-inflammatory lesion 0–8	2.13 \pm 1.279	2.77 \pm 1.194	0.052
Reduction_8 (%)	27.96	34.58	

After four weeks of treatment, a reduction in both inflammatory and non-inflammatory lesions was observed in both groups of patients: in the AZA cream-treated group (11.66% reduction in inflammatory and 12.23% reduction in non-inflammatory lesions) and in the hydrogel group treated with AZA-NC (13.59% reduction in inflammatory and 13.75% reduction in non-inflammatory lesions). The same trend was observed after eight weeks of treatment. The reduction in the number of inflammatory and non-inflammatory lesions in the AZA cream-treated group was 33.76% and 27.96%, respectively, while in the AZA-NC-treated hydrogel group it was 39.15% and 34.58%, respectively. Figure 3 illustrates the reduction in lesion numbers during the treatment period with AZA-NC hydrogel.

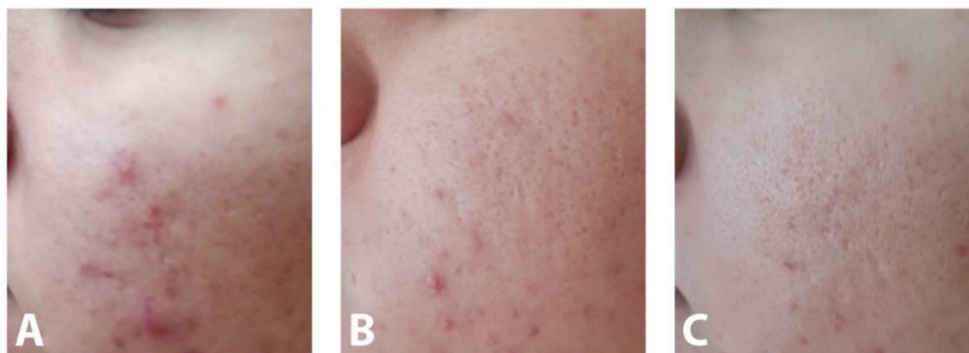


Figure 3. Patient with mild to moderate acne vulgaris at baseline (A), after four weeks (B) and after eight weeks (C) of treatment with AZA-NC hydrogel.

The results are in agreement with those of Schaller et al. [28], who studied the effect of 20% azelaic acid cream (Skinoren[®] cream) on mild to moderate AV and showed that application twice daily for 8 weeks resulted in a 39.8% reduction in the total number of lesions, while application for 12 weeks resulted in a 53.9% reduction.

The results of the drug on the reduction in the number of inflammatory, non-inflammatory, and total lesions within each study group after eight weeks of treatment are shown in Table 5. After eight weeks of AZA administration twice daily, a statistically significant ($p < 0.001$) reduction in inflammatory, non-inflammatory and, thus, total lesions, was achieved in both study groups. Moreover, high values of partial η^2 showed a significant effect of both treatments on the reduction in the number of lesions. In the group of patients applying AZA cream, the values of partial η^2 for inflammatory, non-inflammatory and total lesions were 0.710, 0.745 and 0.797, respectively, while in the group of patients applying AZA-NC hydrogel, the partial η^2 values were higher and were 0.794, 0.848 and 0.846 for inflammatory, non-inflammatory and total lesions, respectively.

Table 5. Efficacy of treatment on reducing the number of inflammatory, non-inflammatory, and total lesions within a given group after eight weeks.

Lesions type_week(s)	AZA Cream Mean \pm SD	<i>p</i> -Value	η^2	AZA-NC Hydrogel Mean \pm SD	<i>p</i> -Value	η^2
Inflammatory lesions_0	5.43 \pm 3.421	<0.001	0.710	6.13 \pm 3.501	<0.001	0.794
Inflammatory lesions_8	3.60 \pm 2.430			3.73 \pm 2.612		
Reduction in lesion count 0–8 (%)	33.76			39.15		
Non-inflammatory lesions_0	7.63 \pm 4.189	<0.001	0.745	8.00 \pm 3.877	<0.001	0.848
Non-inflammatory lesions_8	5.50 \pm 3.330			5.23 \pm 3.137		
Reduction in lesion count 0–8 (%)	27.96			34.58		
Total lesions_0	13.07 \pm 7.080	<0.001	0.797	14.13 \pm 6.872	<0.001	0.846
Total lesions_8	9.10 \pm 5.422			8.97 \pm 5.189		
Reduction in lesion count 0–8 (%)	30.37			36.51		

In conclusion, both AZA cream and AZA-NC hydrogel treatments showed progressive and continuous improvement in mild to moderate facial skin AV throughout the study period. Moreover, both treatments had a better effect on inflammatory compared to non-inflammatory lesions, which is consistent with the results reported by Schaller et al. [28] and the anti-inflammatory effect of AZA [29]. Compared to AZA cream, AZA-NC hydrogel treatment showed the same effect, although the AZA concentration in the cream was twice as high.

It has been shown that the efficacy of topically applied AZA in the treatment of acne lesions can be maintained in its reduced concentrations when it has been nanonized. It may also be possible to further reduce AZA concentrations and its side effects by partially replacing it with some substances of natural origin. Considering the antimicrobial and anti-inflammatory properties of essential oils, a recent study indicates their use and efficacy in topical acne treatment [30] in combination with tretinoin in a cream formulation. In addition, compared to synthetic agents, essential oils are safer and less toxic penetration enhancers for both hydrophilic and lipophilic agents [31], which can potentially reduce the possibility of side effects.

4. Conclusions

The AZA nanocrystal suspensions were successfully obtained by the agitated ball mill technology, from which the easily redispersible AZA nanocrystals were obtained by freeze drying without the need of adding cryoprotectants, which allowed their homogeneous incorporation into the hybrid poloxamer/hyaluronic acid in situ hydrogel. The 10% AZA-NC hydrogel exhibited good spreadability properties, allowing uniform application to the skin and good patient compliance.

The results of a randomized, double-blind clinical trial showed that the 10% AZA-NC hydrogel was as effective as the 20% AZA cream in treating mild to moderate facial skin AV. It effectively reduced the number of inflammatory and non-inflammatory lesions and showed an initial clinical effect after only four weeks of continuous use, although the benefits become more apparent after longer continuous treatment. Hydrogel AZA-NC,

10%, appears to show a favorable safety profile and improved efficacy in the treatment of mild to moderate AV.

Author Contributions: Conceptualization, J.F.-G., I.P. and D.Š.; methodology, J.F.-G. and D.Š.; validation, I.T. and S.M.; formal analysis, I.T. and S.M.; investigation, I.T. and S.M.; resources, J.F.-G., S.M. and D.Š.; data curation, I.T. and S.M.; writing—original draft preparation, I.T. and S.M.; writing—review and editing, J.F.-G., D.Š., I.P., I.T. and S.M.; supervision, J.F.-G. and D.Š.; project administration, J.F.-G. and D.Š.; funding acquisition, J.F.-G. and I.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded and supported by Federal Ministry of Education and Science of Bosnia and Herzegovina and the University of Mostar, Bosnia and Herzegovina (NIR grant: Development of an innovative dermal formulation with azelaic acid nanocrystals to improve the outcome of acne therapy), the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Croatia, and R&D, PLIVA Croatia Ltd., TEVA Group Member, Croatia (Modelling of the Pharmaceutical Spray-Drying Process of the Emulsions in Laboratory and Pilot Scale grant).

Institutional Review Board Statement: The study was approved and conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the University Clinical Hospital of Mostar, Bosnia and Herzegovina (protocol code: 6723/20 and date of approval 2 October 2020) and Ethics Committee for Experimental Research, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Croatia (protocol code: 251-62-03-20-45 and date of approval 21 December 2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects who participated in the study.

Data Availability Statement: Data are included in the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Mohiuddin, A. A Comprehensive Review of Acne Vulgaris. *J. Clin. Res. Dermatol.* **2019**, *6*, 1–34. [[CrossRef](#)]
- Dréno, B. Recent data on epidemiology of acne. *Ann. Dermatol. Vénérologie* **2010**, *137*, 3–5. [[CrossRef](#)]
- Taylor, M.; Gonzalez, M.; Porter, R. Pathways to inflammation: Acne pathophysiology. *Eur. J. Dermatol.* **2011**, *21*, 323–333. [[CrossRef](#)]
- Williams, H.C.; Dellavalle, R.P.; Garner, S. Acne vulgaris. *Lancet* **2012**, *379*, 361–372. [[CrossRef](#)]
- Dréno, B. What is new in the pathophysiology of acne, an overview. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2017**, *31*, 8–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Otlewska, A.; Baran, W.; Batycka-Baran, A. Adverse events related to topical drug treatments for acne vulgaris. *Expert Opin. Drug Saf.* **2020**, *19*, 513–521. [[CrossRef](#)]
- Fox, L.; Csongradi, C.; Aucamp, M.; Du Plessis, J.; Gerber, M. Treatment Modalities for Acne. *Molecules* **2016**, *21*, 1063. [[CrossRef](#)]
- Dikicier, B.S. Topical treatment of acne vulgaris: Efficiency, side effects, and adherence rate. *J. Int. Med. Res.* **2019**, *47*, 2987–2992. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Katsambas, A.; Dessinioti, C. New and emerging treatments in dermatology: Acne. *Dermatol. Ther.* **2008**, *21*, 86–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sieber, M.; Hegel, J. Azelaic Acid: Properties and Mode of Action. *Ski. Pharmacol. Physiol.* **2014**, *27*, 9–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Young, M.C.; Zito, P.M. Azelaic Acid in Acne Vulgaris. *J. Dermatol. Nurses Assoc.* **2018**, *10*, 152–153. [[CrossRef](#)]
- Patel, V.; Sharma, O.P.; Mehta, T. Nanocrystal: A novel approach to overcome skin barriers for improved topical drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2018**, *15*, 351–368. [[CrossRef](#)]
- Lohan, S.B.; Saeidpour, S.; Colombo, M.; Staufenbiel, S.; Unbehauen, M.; Wolde-Kidan, A.; Netz, R.R.; Bodmeier, R.; Haag, R.; Teutloff, C.; et al. Nanocrystals for Improved Drug Delivery of Dexamethasone in Skin Investigated by EPR Spectroscopy. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 400. [[CrossRef](#)]
- Colombo, M.; Staufenbiel, S.; Rühl, E.; Bodmeier, R. In situ determination of the saturation solubility of nanocrystals of poorly soluble drugs for dermal application. *Int. J. Pharm.* **2017**, *521*, 156–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Verma, S.; Kumar, S.; Gokhale, R.; Burgess, D.J. Physical stability of nanosuspensions: Investigation of the role of stabilizers on Ostwald ripening. *Int. J. Pharm.* **2011**, *406*, 145–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wang, Y.; Zheng, Y.; Zhang, L.; Wang, Q.; Zhang, D. Stability of nanosuspensions in drug delivery. *J. Control. Release* **2013**, *172*, 1126–1141. [[CrossRef](#)]
- Zhai, X.; Lademann, J.; Keck, C.M.; Müller, R.H. Dermal nanocrystals from medium soluble actives—Physical stability and stability affecting parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2014**, *88*, 85–91. [[CrossRef](#)]

18. Tomić, I.; Juretić, M.; Jug, M.; Pepić, I.; Čižmek, B.C.; Filipović-Grčić, J. Preparation of in situ hydrogels loaded with azelaic acid nanocrystals and their dermal application performance study. *Int. J. Pharm.* **2019**, *563*, 249–258. [[CrossRef](#)]
19. Hayashi, N.; Akamatsu, H.; Kawashima, M. Acne Study Group Establishment of grading criteria for acne severity. *J. Dermatol.* **2008**, *35*, 255–260. [[CrossRef](#)]
20. Möschwitzer, J.P. Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process. *Int. J. Pharm.* **2013**, *453*, 142–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Merisko-Liversidge, E.; Liversidge, G.G.; Cooper, E.R. Nanosizing: A formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, *18*, 113–120. [[CrossRef](#)]
22. Peltonen, L.; Hirvonen, J. Pharmaceutical nanocrystals by nanomilling: Critical process parameters, particle fracturing and stabilization methods. *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, *62*, 1569–1579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Mohammady, M.; Mohammadi, Y.; Yousefi, G. Freeze-Drying of Pharmaceutical and Nutraceutical Nanoparticles: The Effects of Formulation and Technique Parameters on Nanoparticles Characteristics. *J. Pharm. Sci.* **2020**, *109*, 3235–3247. [[CrossRef](#)]
24. Lademann, J.; Richter, H.; Teichmann, A.; Otberg, N.; Blume-Peytavi, U.; Luengo, J.; Weiss, B.; Schaefer, U.F.; Lehr, C.-M.; Wepf, R. Nanoparticles—An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *66*, 159–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Lee, J.; Cheng, Y. Critical freezing rate in freeze drying nanocrystal dispersions. *J. Control. Release* **2006**, *111*, 185–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Kulawik-Pióro, A.; Ptaszek, A.; Kruk, J. Effective tool for assessment of the quality of barrier creams—Relationships between rheological, textural and sensory properties. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2019**, *103*, 113–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Hurler, J.; Engesland, A.; Kermany, B.P.; Škalko-Basnet, N. Improved texture analysis for hydrogel characterization: Gel cohesiveness, adhesiveness, and hardness. *J. Appl. Polym. Sci.* **2011**, *125*, 180–188. [[CrossRef](#)]
28. Schaller, M.; Sebastian, M.; Röss, C.; Seidel, D.; Hennig, M. A multicentre, randomized, single-blind, parallel-group study comparing the efficacy and tolerability of benzoyl peroxide 3%/clindamycin 1% with azelaic acid 20% in the topical treatment of mild-to-moderate acne vulgaris. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2016**, *30*, 966–973. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Mastrofrancesco, A.; Ottaviani, M.; Aspite, N.; Cardinali, G.; Izzo, E.; Graupe, K.; Zouboulis, C.C.; Camera, E.; Picardo, M. Azelaic acid modulates the inflammatory response in normal human keratinocytes through PPAR γ activation. *Exp. Dermatol.* **2010**, *19*, 813–820. [[CrossRef](#)]
30. Mazzarello, V.; Gavini, E.; Rassa, G.; Donadu, M.G.; Usai, D.; Piu, G.; Pomponi, V.; Sucato, F.; Zanetti, S.; Montesu, M.A. Clinical Assessment of New Topical Cream Containing Two Essential Oils Combined with Tretinoin in the Treatment of Acne. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **2020**, *13*, 233–239. [[CrossRef](#)]
31. Herman, A.; Herman, A.P. Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: A review. *J. Pharm. Pharmacol.* **2015**, *67*, 473–485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]