

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET

Tanja M. Ilić

**MIKRO- I NANOSTRUKTURIRANI  
EMULZIONICI SISTEMI NA BAZI  
POLIHIDROKSILNIH SURFAKTANATA  
ZA ISPORUKU ACEKLOFENAKA  
U/KROZ KOŽU PRIMENOM HEMIJSKIH  
POJAČIVAČA PENETRACIJE I  
MIKROIGALA**

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET



Tanja M. Ilić

**MIKRO- I NANOSTRUKTURIRANI  
EMULZIONI SISTEMI NA BAZI  
POLIHIDROKSILNIH SURFAKTANATA  
ZA ISPORUKU ACEKLOFENAKA  
U/KROZ KOŽU PRIMENOM HEMIJSKIH  
POJAČIVAČA PENETRACIJE I  
MIKROIGALA**

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY

Tanja M. Ilić

**MICRO- AND NANOSTRUCTURED  
EMULSION SYSTEMS BASED ON  
POLYHYDROXY SURFACTANTS FOR  
ACECLOFENAC DELIVERY  
INTO/THROUGH THE SKIN USING  
CHEMICAL PENETRATION  
ENHANCERS AND MICRONEEDLES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta; deo eksperimentalnog rada urađen je na Katedri za farmakologiju i Katedri za farmaceutsku hemiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu, i na Institutu za farmaceutsku tehnologiju Eberhard-Karls Univerziteta u Tbingenu, Nemačka.

MENTOR

---

Dr Snežana Savić, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

1. \_\_\_\_\_  
Dr Ivana Pantelić, docent,  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

2. \_\_\_\_\_  
Dr Miroslav Savić, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

3. \_\_\_\_\_  
Dr Dušan Škiljević, docent,  
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Datum odbrane \_\_\_\_\_

Neizmernu zahvalnost dugujem svom mentoru, *prof. dr Snežani Savić*, za ukazano poverenje, profesionalnu podršku, bezrezervnu stručnu pomoć i razumevanje koje mi je pružila tokom rada na disertaciji. Njeno znanje, istraživački duh i nepresušna energija podstakli su me, i dali mi snage, da istrajem u ostvarenju svog cilja.

Beskrajno sam zahvalna *doc. dr Ivani Pantelić* na nesebičnom deljenju svog znanja, na bezgraničnom ličnom angažovanju, na svesrdnoj pomoći i velikoj podršci u svakoj fazi izrade ove doktorske disertacije.

Izuzetnu zahvalnost dugujem *prof. dr Miroslavu Saviću* za pomoć i dragocene savete tokom eksperimentalnog rada i važnije, za ogroman entuzijazam prema nauci i istraživanju koji mi je preneo.

Zahvaljujem se *doc. dr Dušanu Škiljeviću* na iskrenoj saradnji tokom izrade ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem *naučnom savetniku dr Danijeli Randelović* sa Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerziteta u Beogradu i posebno, *prof. dr Bojanu Markoviću* sa Katedre za farmaceutsku hemiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta za pomoć u realizaciji važnih delova eksperimentalnog rada.

Zahvaljujem se kolegama sa Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju i Katedre za farmakologiju koji su se često nalazili u ulozi mojih ispitanika i koji su aktivno učestvovali u određenim segmentima eksperimentalnog rada. Posebno moram izdvojiti *dr Sanelu Savić*, koja mi je, kao pravi prijatelj, pružila nesebičnu pomoć i pomogla da uspešno prevaziđem sve prepreke na koje sam nailazila.

***Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, sinu, suprugu, sestri i roditeljima na ljubavi, ogromnom razumevanju i bezuslovnoj podršci tokom izrade ove doktorske disertacije.***

## **Mikro- i nanostrukturirani emulzioni sistemi na bazi polihidroksilnih surfaktanata za isporuku aceklofenaka u/kroz kožu primenom hemijskih pojačivača penetracije i mikroigala**

### **SAŽETAK**

Imajući na umu ograničenu biološku raspoloživost i posledično terapijski efekat nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL) primenjenih na koži, cilj doktorske disertacije bio je razvoj, optimizacija i sveobuhvatna fizičko-hemijska i biofarmaceutska karakterizacija ulje-u-vodi nanoemulzija, kao i konvencionalnih (mikrostrukturiranih) emulzionih sistema (podloga) na bazi prirodnih polihidroksilnih surfaktanata (saharozni estri, alkil poliglukozidni (APG) emulgator) kao nosača za poboljšanu (trans)dermalnu isporuku aceklofenaka (model lekovita supstanca iz grupe NSAIL). Preciznije, cilj je bio da se primenom različitih in vitro i in vivo metoda dobije uvid u uticaj varijacija u sastavu formulacije svakog od tipova odabranih nosača (tradicionalni vs. surfaktanti novije generacije, prisustvo vs. odsustvo hemijskih pojačivača penetracije) na dermalnu raspoloživost aceklofenaka, kao i da se proceni potencijalni značaj primene naprednih sistema, kao što su nanoemulzije, u odnosu na emulzione sisteme koji se jednostavno mogu izraditi u uslovima apoteke. Dodatno, posebno značajno je bilo proceniti da li se kombinovanom primenom nanoemulzija i predtretmana kože čvrstim mikroiglama, kao fizičkim pojačivačima penetracije, može obezbediti poboljšana isporuka aceklofenaka u kožu, odnosno, kroz kožu u sistemsku cirkulaciju.

Rezultati sprovedenih istraživanja nedvosmisleno su ukazali da se primenom kombinovanog smeša-proces eksperimentalnog dizajna mogu uspešno izraditi nanoemulzije aceklofenaka zadovoljavajućih fizičko-hemijskih karakteristika, dugoročne stabilnosti i iritacionog profila korišćenjem biokompatibilnih emulgatora, kao što su lecitin iz jajeta i saharozni estri (prevashodno saharoza palmitat). Dalje, rezultati dobijeni in vitro ispitivanjem oslobađanja/permeacije kroz sintetsku membranu/kožu uha svinje, kao i primenom in vitro/in vivo *tape stripping* metode (sve metode najpre su podvrgnute optimizaciji) ukazali su na superiornost razvijenih nanoemulzija u pogledu isporuke aceklofenaka u/kroz kožu u odnosu na ispitivane mikrostrukturirane emulzione sisteme, istovremeno ukazujući na značajnu ulogu sastava

smeše surfaktanata upotrebljenih za stabilizaciju nanoemulzija u isporuci aceklofenaka u/kroz kožu (saharozni estri su značajno efikasniji kao hemijski penetracioni inhenseri u odnosu na tradicionalno korišćen polisorbat 80). Sa druge strane, iako „*ready-to-use*“ podloge zaslužuju posebno „drvo odluke“ za procenu kvaliteta i biološke raspoloživosti/ekvivalentnosti, primenom koncepta baziranog na proceni kritičnih atributa kvaliteta i in vitro/in vivo performansi, uspešno su detektovane razlike između novih podloga na bazi APG emulgatora, izrađenih variranjem korastvarača/hemijskih pojačivača penetracije (izopropanol, glicerol) i podloge definisanog farmakopejskog kvaliteta (nejonski hidrofilni krem). Štaviše, zahvaljujući poboljšanoj isporuci aceklofenaka u/kroz kožu, poželjnom reološkom ponašanju i unapređenim aplikativnim karakteristikama, podloge na bazi APG emulgatora (sa/bez korastvarača) predstavljaju bolji izbor u izradi magistralnih lekova u odnosu na konvencionalno korišćene podloge izrađene primenom tradicionalnih nejonskih emulgatora. Na kraju treba istaći da, iako je predtretman kože čvrstim mikroiglama od čelika doveo do povećanja količine aceklofenaka u koži i sistemske cirkulaciji in vivo (pacovi Wistar soja) iz svih ispitivanih formulacija nanoemulzija, dobijeni nalazi ukazuju da se kombinacijom mikroigala i nanoemulzije sa saharoza palmitatom postižu veće koncentracije aceklofenaka u koži, dok kombinacija mikroigala i nanoemulzije sa polisorbatom 80 kao koemulgatorom omogućava poboljšanu isporuku aceklofenaka u sistemske cirkulaciju. Drugim rečima, sastav stabilisućeg sloja nanoemulzija, odnosno tip upotrebljenog koemulgatora, predstavlja glavni faktor koji određuje interakciju nanokapi sa okolnim tkivom u mikroporama formiranim u koži, i posledično in vivo farmakokinetičke profile aceklofenaka.

Otuda, može se zaključiti da efikasnost isporuke NSAIL u/kroz kožu primenom nanoemulzija, sa i bez predtretmana kože mikroiglama, zavisi delom od karakteristika lekovite supstance, ali značajnije, od karakteristika samog nosača (sastav/fizičko-hemijski parametri), mikroigala, i odabiranih eksperimentalnih uslova. Iako dobijeni rezultati nedvosmisleno ukazuju na poboljšanje isporuke aceklofenaka u/kroz kožu primenom kombinovanog pristupa baziranog na primeni mikroigala i nanoemulzija, dodatne studije su neophodne kako bi se procenilo da li dobijeni nalazi imaju klinički značaj u lokalnoj/sistemske terapiji bolesti/povreda skeletno-mišićnog sistema.

**Ključne reči:** biokompatibilna nanoemulzija; podloga za izradu magistralnih lekova; (trans)dermalna isporuka leka; šćerni emulgatori; eksperimentalni dizajn; kritični atributi kvaliteta; in vitro oslobađanje/permeacija; koža uha svinje; (dermo)farmakokinetika; in vitro-in vivo korelacija

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmaceutska tehnologija

**UDK broj:** 57.085:[615.014.2:004.9](043.3)



**Micro- and nanostructured emulsion systems based on polyhydroxy surfactants  
for aceclofenac delivery into/through the skin using chemical penetration  
enhancers and microneedles**

**ABSTRACT**

Considering the limited bioavailability and consequently, therapeutic effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) applied on the skin, the aim of present doctoral dissertation was to develop oil-in-water nanoemulsions and conventional (microstructured) emulsions (bases) based on natural polyhydroxy surfactants (sucrose esters, alkyl polyglucoside (APG) emulsifier) as carriers for improved (trans)dermal delivery of aceclofenac (model NSAID) and to comprehensively evaluate their physicochemical and biopharmaceutical properties. Precisely, the present work aimed to evaluate the effect of variations in formulation composition of each selected emulsion system (traditional vs. novel surfactants, presence vs. absence of chemical penetration enhancers) on dermal availability of aceclofenac using different *in vitro* and *in vivo* pharmacokinetic-based methods, and thus, to estimate the usefulness of applying the advanced carriers, such as nanoemulsions, compared to the emulsions that can be easily prepared in a pharmacy. Additionally, it was interesting to evaluate whether the combined use of developed nanoemulsions and skin pretreatment with solid stainless steel microneedles (as a physical penetration enhancer) may facilitate aceclofenac delivery into the skin, and/or through the skin into the systemic circulation.

Obtained results unequivocally indicated that it was possible to prepare, with the aid of combined mixture-process experimental design, aceclofenac-loaded nanoemulsions with satisfying physicochemical properties, long-term stability and skin irritation profile, using biocompatible emulsifiers, such as egg lecithin and sucrose esters (primarily sucrose palmitate). Furthermore, results obtained using *in vitro* release/skin permeation tests through the synthetic membrane/pig ear skin as well as *in vitro/in vivo* tape stripping (all submitted through careful optimization) proved the superiority of developed nanoemulsions regarding aceclofenac delivery into/through the skin compared to tested microstructured emulsion systems, simultaneously singling out the surfactant mixture employed for nanoemulsion stabilization as a key factor for efficient

aceclofenac delivery into/through the skin (sucrose esters are more efficient as the chemical penetration enhancers than traditionally used polysorbate 80). On the other hand, although the “ready-to-use” bases deserve a precise decision tree while assessing quality issues and drug bioavailability/bioequivalence, the concept based on critical quality attributes evaluation and complementary in vitro/in vivo performance testing was capable of providing an adequate proof on non-equivalence of novel bases based on APG emulsifier (differing in the co-solvent/chemical penetration enhancer (isopropanol, glycerol) addition) compared to the pharmacopoeial base (non-ionic hydrophilic cream). Furthermore, owing to enhanced aceclofenac delivery into/through the skin, desirable rheological behavior and improved applicative characteristics, bases stabilized by the APG emulsifier are a better option in compounding practice than conventional vehicles prepared using traditional non-ionic emulsifiers. Finally, although the skin pretreatment with stainless steel microneedles improved aceclofenac delivery into and across the rat skin into the systemic circulation from the tested nanoemulsion, obtained results suggested that combination of microneedles and sucrose palmitate-costabilized nanoemulsion may allow to achieve higher drug skin concentrations, while combination of microneedles with nanoemulsion costabilized by polysorbate 80 could be preferable for enhancing aceclofenac delivery into the systemic circulation. In other words, composition of the stabilizer film, i.e., type of coemulsifier employed, was a key factor determining the interaction of nanodroplets with the tissue exposed and consequently, in vivo pharmacokinetic profiles of aceclofenac.

Therefore, based on the obtained findings, it can be concluded that efficacy of NSAID delivery into/through the skin using nanoemulsions, with and without skin pretreatment with microneedles depends on drug physicochemical properties, but importantly, on the carrier features (composition/physicochemical parameters), microneedle design and employed experimental conditions. Although obtained results undoubtedly indicate an improvement in aceclofenac delivery into/through the skin using a combined approach based on the microneedles and nanoemulsions, further studies are necessary to confirm whether obtained findings exhibit the clinical relevance in the local/systemic therapy of musculoskeletal disease/disorders.

**Keywords:** biocompatible nanoemulsion; „ready-to-use” topical vehicle for extemporaneous compounding; (trans)dermal drug delivery; sugar surfactants; experimental design; critical quality attributes; in vitro release/permeation; porcine ear skin; (dermato)pharmacokinetics; in vitro-in vivo correlation

**Scientific field:** Pharmacy

**Specific scientific field:** Pharmaceutical Technology

**UDK No:** 57.085:[615.014.2:004.9](043.3)

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1 Primena nesteroidnih antiinflamatornih lekova putem kože.....	1
1.2 Nanoemulzije – definicija i osnovne karakteristike .....	5
1.3 Nanoemulzije – nosači lekovitih supstanci za dermalnu/transdermalnu primenu ..	6
1.4 Mehanizmi odgovorni za poboljšanu isporuku lekovitih supstanci u/kroz kožu primenom nanoemulzija .....	12
1.4.1 Uloga veličine kapi nanoemulzija u isporuci lekovitih supstanci u/kroz kožu	15
1.4.2 Uloga površinskog naelektrisanja kapi nanoemulzija u isporuci lekovitih supstanci u/kroz kožu .....	18
1.4.3 Uloga sastava formulacije nanoemulzija u isporuci lekovitih supstanci u/kroz kožu .....	20
1.5 Formulacija nanoemulzija sa NSAIL .....	23
1.5.1 Surfaktanti u nanoemulzijama za primenu na koži – lecitin i saharozni estri..	23
1.5.2 Odabir komponenti uljane i vodene faze nanoemulzija.....	29
1.6 Izrada/proizvodnja nanoemulzija primenom homogenizacije pod visokim pritiskom.....	32
1.7 Razvoj generičkih preparata za primenu na koži – savremeni trendovi u proceni bioekvivalencije .....	36
1.7.1 Drvo odluke <i>Strawman</i> .....	37
1.7.2 TCS sistem klasifikacije za preparate za primenu na koži.....	40
1.8 Trenutni stavovi vodećih svetskih regulatornih agencija o proceni bioekvivalencije preparata za primenu na koži.....	42
1.8.1 Američka agencija za hranu i lekove (FDA).....	42
1.8.2 Evropska agencija za lekove (EMA) .....	45
1.9 Metode za procenu kinetike permeacije – nova saznanja i preporuke .....	50
1.9.1 In vitro ispitivanje permeacije kroz kožu.....	50
1.9.2 Dermofarmakokinetički metod.....	53
1.9.3 Mikrodijaliza .....	57
1.10 Mikroigle – definicija, prednosti i nedostaci.....	59
1.10.1 Tipovi mikroigala i mehanizmi isporuke leka u/kroz kožu.....	63
1.11 Čvrste mikroigle – karakteristike i faktori koji određuju efikasnost .....	66

1.11.1	Primena čvrstih mikroigla kao fizičkih inhensera .....	69
1.11.2	Bezbednost primene čvrstih mikroigala .....	73
2.	CILJ RADA .....	75
3.	EKSPERIMENTALNI DEO .....	81
3.1	Materijali .....	81
3.2	Metode i oprema .....	81
3.2.1	Ispitivanje rastvorljivosti aceklofenaka .....	81
3.2.2	Izrada nanostrukturiranih emulzionih sistema .....	82
3.2.3	Metodologija eksperimentalnog dizajna – kombinovani smeša-proces eksperimentalni dizajn .....	84
3.2.4	Određivanje dinamičkog međupovršinskog napona .....	86
3.2.5	Određivanje veličine kapi ispitivanih nanoemulzija .....	86
3.2.6	Mikroskopska analiza ispitivanih nanoemulzija .....	87
3.2.7	Određivanje zeta potencijala .....	88
3.2.8	Reološka analiza .....	88
3.2.9	Merenje pH vrednosti i električne provodljivosti .....	89
3.2.10	Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) .....	89
3.2.11	Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR spektroskopija) .....	90
3.2.12	Ispitivanje stabilnosti razvijenih nanoemulzija .....	90
3.2.13	Preliminarna procena in vivo iritacionog potencijala nanoemulzija .....	91
3.2.14	Izrada mikrostrukturiranih emulzionih sistema .....	92
3.2.15	Skrining mikrostrukture .....	93
3.2.16	Ispitivanje uniformnosti sadržaja aceklofenaka .....	94
3.2.17	Određivanje saturacione koncentracije aceklofenaka u podlogama .....	95
3.2.18	Reološka merenja .....	95
3.2.19	Termogravimetrijska analiza .....	95
3.2.20	Merenje pH vrednosti i električne provodljivosti .....	96
3.2.21	Studija stabilnosti .....	96
3.2.22	In vitro ispitivanje oslobađanja aceklofenaka kroz veštačku membranu .....	96
3.2.23	In vitro ispitivanje permeacije aceklofenaka kroz kožu uha svinje .....	98
3.2.23.1	Priprema kože uha svinje .....	98

3.2.23.2	Protokol za in vitro ispitivanje permeacije aceklofenaka.....	99
3.2.23.3	Prikaz izračunavanja in vitro profila permeacije .....	100
3.2.24	Procena dermalne raspoloživosti aceklofenaka in vitro.....	102
3.2.24.1	Protokol za pripremu kože uha svinje .....	102
3.2.24.2	In vitro <i>tape stripping</i> .....	103
3.2.24.3	In vitro cijanoakrilatna biopsija površine kože.....	105
3.2.25	Procena dermalne raspoloživosti aceklofenaka in vivo .....	107
3.2.25.1	In vivo <i>tape stripping</i> .....	107
3.2.25.2	Matematička analiza profila koncentracije aceklofenaka u SC .....	108
3.2.26	Procena efikasnosti penetracije mikroigala u kožu .....	109
3.2.27	In vivo ispitivanje farmakokinetike aceklofenaka iz odabranih formulacija nanoemulzija, sa i bez predtretmana kože mikroiglama.....	111
3.2.28	UHPLC-MS/MS .....	113
3.2.29	Statistička analiza .....	114
4.	REZULTATI I DISKUSIJA.....	116
4.1	Rezultati i diskusija prve faze eksperimentalnog rada .....	116
4.1.1	Razvoj formulacije nanoemulzija aceklofenaka – preformulaciona i formulaciona ispitivanja .....	116
4.1.2	Kombinovani smeša-proces eksperimentalni dizajn.....	122
4.1.3	Fizičko-hemijska karakterizacija odabranih optimalnih nanoemulzija .....	129
4.1.4	Lek–nosač interakcije .....	135
4.1.5	Preliminarna studija stabilnosti .....	138
4.1.5.1	Preliminarna studija stabilnosti nanoemulzija izrađenih variranjem tipa vodene faze .....	141
4.1.6	Dugoročna studija stabilnosti .....	144
4.1.7	In vivo procena iritacionog potencijala razvijenih nanoemulzija.....	146
4.2	Rezultati i diskusija druge faze eksperimentalnog rada .....	150
4.2.1	Procena mikrostrukture primenom polarizacione mikroskopije i konfokalne Raman spektroskopije.....	152
4.2.2	Procena CQA ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema.....	156
4.2.3	Ispitivanje fizičko-hemijske stabilnosti ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema .....	163

4.3 Rezultati i diskusija treće faze eksperimentalnog rada.....	167
4.3.1 In vitro ispitivanje oslobađanja aceklofenaka .....	167
4.3.1.1 In vitro ispitivanje oslobađanja aceklofenaka iz nanoemulzija .....	168
4.3.1.2 In vitro ispitivanje oslobađanja aceklofenaka iz mikrostrukturiranih emulzionih sistema .....	171
4.3.2 Procena dermalne raspoloživosti <i>tape stripping</i> metodom .....	174
4.3.2.1 Razvoj protokola <i>tape stripping</i> metode na koži uha svinje .....	174
4.3.2.2 In vitro vs. in vivo <i>tape stripping</i> u proceni dermalne raspoloživosti aceklofenaka iz nanoemulzija – <i>infinite dose</i> uslovi .....	183
4.3.2.3 In vitro diferencijalni <i>stripping</i> u proceni dermalne raspoloživosti aceklofenaka iz nanoemulzija – <i>finite dose</i> uslovi .....	190
4.3.2.4 In vivo <i>tape stripping</i> u proceni dermalne raspoloživosti aceklofenaka iz mikrostrukturiranih emulzionih sistema – <i>infinite dose</i> uslovi.....	193
4.3.2.5 In vitro <i>tape stripping</i> u proceni dermalne raspoloživosti aceklofenaka iz mikrostrukturiranih emulzionih sistema – <i>finite dose</i> uslovi.....	199
4.3.6 In vitro ispitivanje permeacije aceklofenaka primenom Franz-ovih difuzionih ćelija.....	200
4.4 Četvrta faza eksperimentalnog rada .....	208
4.4.1 Procena integriteta kožne barijere prilikom aplikacije čvrstih mikroigala ....	208
4.4.2 In vivo farmakokinetička studija .....	211
5. ZAKLJUČAK.....	219
6. REFERENCE .....	230

## 1. UVOD

### 1.1 Primena nesteroidnih antiinflamatornih lekova putem kože

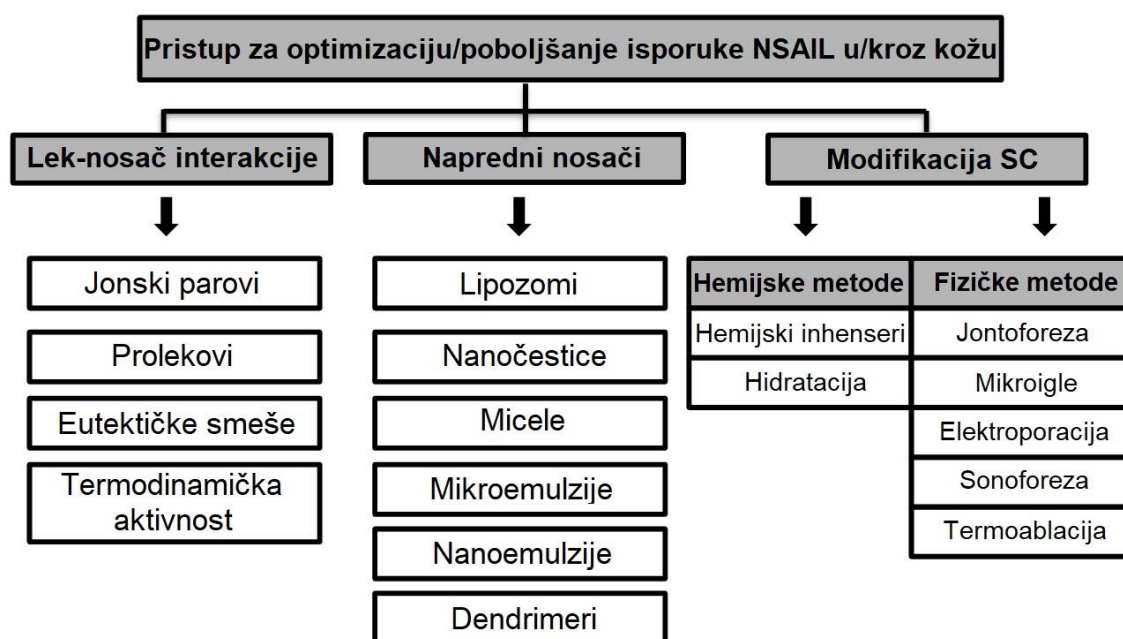
Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL) predstavljaju grupu najčešće prepisivanih/korišćenih lekova u svetu. Usled analgetskog, antipiretičkog i antiinflamatornog delovanja, NSAIL se koriste u terapiji akutnog i hroničnog bola, u stanjima povišene telesne temperature, kao i u lečenju bolesti/povreda skeletno-mišićnog sistema (Komatsu i Sakurada, 2012; McPherson i Cimino, 2013). Mehanizam delovanja NSAIL prevashodno se zasniva na inhibiciji enzima ciklooksigenaza (COX) i posledično, na inhibiciji sinteze prostaglandina (PG). Identifikovano je nekoliko izoformi ovog enzima – COX-1 (prisutan u većini ćelija i tkiva, uglavnom učestvuje u sintezi PG koji učestvuju u fiziološkim procesima), COX-2 (prisutan dominantno u patofiziološkim procesima, uključen u sintezu inflamatornih PG, ali i normalno prisutan u bubrezima, kardiovaskularnom sistemu, mozgu, uterusu i drugim organima), i COX-3 izoenzim (relativno nedavno potvrđeno postojanje ove izoforme, nije u potpunosti razjašnjena uloga). Smatra se da terapijski efekat NSAIL najvećim delom potiče od inhibicije COX-2 na mestu inflamacije, dok je najveći broj neželjenih efekata posledica inhibicije izoforme COX-1 i sinteze protektivnih PG. Dugotrajna oralna primena NSAIL je praćena nizom različitih neželjenih efekata na nivou gastrointestinalnog trakta (GIT), jetre, bubrega i kardiovaskularnog sistema. Najčešći neželjeni efekti javljaju se u GIT-u kao posledica inhibicije COX-1 izoenzima, i mogu biti blagi (dispepsija, nauzeja, abdominalni bol), ozbiljni (ulkus) i potencijalno životno ugrožavajući (krvarenje, perforacije) (Brune i Patrignani, 2015; Haroutiunian i sar., 2010; Todosijević, 2017). Stoga, ne čudi sve veće interesovanje za lokalnom primenom NSAIL u terapiji akutnih i/ili hroničnih bolesti/povreda skeletno-mišićnog sistema (Haroutiunian i sar., 2010; Komatsu i Sakurada, 2012; Todosijević, 2017). Pored eliminacije GIT neželjenih efekata, primena NSAIL putem kože omogućava isporuku NSAIL na samom mestu delovanja, rešava problem varijabilne apsorpcije u GIT-u, sprečava pojavu lek-lek interakcija, kao i metabolizam prvog prolaza u jetri. Takođe, preparati za primenu na koži su uglavnom prihvatljiviji za pacijente što se pozitivno odražava na adherencu (Haroutiunian i sar., 2010; Komatsu i Sakurada, 2012; McPherson i Cimino, 2013).



Međutim, kao glavni nedostaci trenutno dostupnih topikalnih preparata NSAID navode se: 1) pojava različitih neželjenih efekata na koži na mestu primene, 2) problemi u razvoju formulacije usled slabo kiselog karaktera NSAID i često problematične hemijske stabilnosti, i 3) ograničena terapijska efikasnost. Nakon primene preparata NSAID na koži, kao najčešći neželjeni efekti javljaju se suva koža, crvenilo, iritacija, parestezije ili svrab. Vrlo retko se javljaju sistemski neželjeni efekti, kao što su problemi u GIT-u, glavobolja, anemija, poremećaji u funkciji i radu jetre i bubrega (McPherson i Cimino, 2013). Interesantno, pokazano je da sličan procenat pacijenata sa osteoartritisom lečenih topikalnim preparatima NSAID (0-21%) prestaje sa primenom leka usled neželjenih efekata, kao i kod pacijenata koji NSAID uzimaju oralnim putem (0-25%) (Makris i sar., 2010).

Sa druge strane, terapijski efekat NSAID primenjenih na koži zavisi, pre svega, od sposobnosti da penetriraju kroz stratum corneum (SC) u dovoljnoj količini (Brune i Patrignani, 2015; Raza i sar., 2014; Todosijević, 2017). Međutim, dobro je poznato da brojni faktori mogu da utiču na penetraciju lekovite supstance kroz SC i ostale delove kože do ciljnog mesta dejstva, odnosno do sistemske cirkulacije, te se grubo mogu podeliti u tri celine: i) fizičko-hemijske osobine lekovite supstance, ii) osobine nosača lekovite supstance, iii) stanje kože na mestu primene (Surber i Smith, 2005; Todosijević, 2017). Usled izuzetnih barijernih svojstva SC, zahtevi u pogledu fizičko-hemijskih osobina koje lekovita supstanca treba da poseduje kako bi efikasno penetrirala u kožu su stroži u odnosu na zahteve predložene Lipinski pravilom „*Rule of five*“ za supstance koje se uzimaju oralnim putem (molekulska masa  $< 500$ , broj H-donora (engl., *number of H-bond donors* (NHD))  $< 5$ , broj H-akceptora (engl., *number of H-bond acceptors* (NHA))  $< 10$ , oktanol-voda particioni koeficijent ( $\log P \leq 5$ ) (Lipinski i sar., 2001). Naime, nasuprot oralnom putu primene gde se ne navodi donja granična vrednost za  $\log P$ , za efikasnu pasivnu isporuku lekovite supstance u/kroz kožu,  $\log P$  treba da bude veći od 0, tačnije u opsegu  $0 \leq \log P \leq 5$  (Choy i Prausnitz, 2011), odnosno  $1 \leq \log P \leq 3$  (Beetge i sar., 2000; Russell i Guy, 2009; Subedi i sar., 2010), čime se isključuje mogućnost penetracije u kožu visoko polarnih jedinjenja. Takođe, dodatno treba razmotriti rastvorljivost u vodi (poželjno da bude  $> 1$  mg/ml) i tačku topljenja (poželjno  $< 200$  °C (Russell i Guy, 2009; Subedi i sar., 2010). Međutim, treba napomenuti da iako su vrednosti navedenih parametara za većinu NSAID u

preporučenim opsezima za efikasnu isporuku u/kroz kožu (smatraju se dobrim kandidatima za dermalnu/transdermalnu primenu), male razlike u fizičko-hemijskim karakteristikama između različitih lekovitih supstanci iz ove grupe, značajno utiču na penetraciju u kožu i posledično terapijsku efikasnost (Beetge i sar., 2000; Cordero i sar., 1997). Kako su NSAIL slabe kiseline (pKa u opsegu od 3,5 do 5,5), pH vrednost formulacije može da utiče na stepen jonizacije, i time na isporuku u/kroz kožu. Takođe, stanje kožne barijere (zdrava/bolesna koža), karakteristike kože na mestu primene (debljina, gustina folikula dlake, lojnih i znojnih žlezda, protok krvi), kao i interindividualne razlike u strukturi i građi između pacijenata značajno određuju efikasnost preparata primenjenih na koži. Ne treba zaboraviti da enzimi kože mogu da metabolišu određene lekovite supstance pre dermalne apsorpcije, tako direktno određujući njihovu terapijsku efikasnost (McPherson i Cimino, 2013; Todosijević, 2017).



**Slika 1.1.** Šematski prikaz najčešće korišćenih pristupa za optimizaciju/poboljšanje isporuke NSAIL u/kroz kožu (prilagođeno iz Cevc i Vierl, 2010; Morrow i sar., 2007; Subedi i sar., 2010)

Međutim, uprkos intenzivnim istraživanjima i relativno velikom broju različitih preparata NSAIL za primenu na koži na svetskom tržištu, još uvek nije moguće postići dugotrajan i efikasan tretman perifernog bola i upale (Cevc i Vierl, 2010). Lokalno primenjeni NSAIL ublažavaju bol najčešće samo tokom 1-2 nedelje primene, ili pak terapijski efekat u potpunosti izostaje. Otuda, konvencionalni preparati NSAIL zahtevaju primenu više puta u toku dana i u većoj količini, kako bi se postigao određeni terapijski efekat. Kao potencijalna objašnjenja za ovu pojavu navode se 1) ograničena penetracija NSAIL kroz intaktnu kožu i/ili 2) klirens lekovite supstance kroz periferne krvne sudove, čime se molekuli slobodne lekovite supstance uklanjaju sa mesta primene i distribuiraju u sistemsku cirkulaciju (Cevc i Vierl, 2010; Kretsos i Kasting, 2005). Kao rezultat, tokom poslednjih nekoliko godina postoji sve veće interesovanje za razvojem različitih strategija koje bi omogućile poboljšanu penetraciju NSAIL kroz SC i/ili kontrolisano oslobađanje na mestu primene. Inovativni pristupi su bazirani na: 1) modifikaciji lek-nosač interakcija, 2) primeni naprednih nosača lekovite supstance ili 3) modifikaciji barijerne funkcije SC primenom različitih fizičkih ili hemijskih metoda (slika 1.1). Tehnologije navedene na slici 1.1 mogu se dodatno podeliti na aktivne i pasivne, u zavisnosti da li je uključen spoljašnji izvor energije u poboljšanju permeacije lekovite supstance kroz kožu ili ne. Iako se primenom pasivnih metoda (npr. hemijska modifikacija SC ili primena naprednih sistema) može poboljšati isporuka lekovite supstance u/kroz kožu u značajnom stepenu, kao problem navodi se nemogućnost kontrole početka i dužine trajanja dejstva. Sa druge strane, fizičke metode bazirane su na primeni dodatne pokretačke sile, odnosno na fizičkom narušavanju barijerne funkcije SC. Za razliku od pasivnih, primena aktivnih metoda pruža mogućnost određene kontrole nad profilom penetracije/permeacije lekovite supstance u/kroz kožu, i skraćivanje vremena između aplikacije i pojave terapijskih koncentracija na mestu delovanja (Arora i sar., 2008).

Stoga, u sklopu ove doktorske disertacije razmatrani su različiti pristupi za poboljšanje isporuke aceklofenaka, kao model NSAIL u/kroz kožu i to i) primena nanoemulzija, kao naprednih nosača, i ii) konvencionalnih (mikrostrukturiranih) emulzionih sistema u kombinaciji sa različitim hemijskim penetracionim inhenserima/pojačivačima penetracije, uz dodatno iii) narušavanje barijerne funkcije SC primenom čvrstih mikroigala, kao fizičkih inhensera.

## 1.2 Nanoemulzije – definicija i osnovne karakteristike

Tokom poslednje decenije, usled brojnih prednosti, kao što su ujednačena i mala veličina kapi, visok solubilizacioni kapacitet za lipofilne lekove, dobra fizička stabilnost, niska koncentracija surfaktanata i posledično, nizak iritacioni potencijal, kao i relativno jednostavna proizvodnja i *scale up* (Sainsbury i sar., 2014; Savić, 2017; Singh i sar., 2017; Zhou i sar., 2010), nanoemulzije su prepoznate kao nosači za poboljšanu isporuku NSAIL kroz kožu. Nanoemulzije su termodinamički nestabilni koloidni sistemi koji se sastoje od dve tečnosti koje se ne mešaju (ulje i voda), pri čemu je jedna tečnost, u vidu kapi, dispergovana u drugoj tečnosti. Otuda, razlikuju se ulje-u-vodi (U/V) ili voda-u-ulju (V/U) nanoemulzije, u zavisnosti da li su kapi ulja dispergovane u vodi, ili obrnuto (McClements, 2012; Savić, 2017). Iako je generalno preporuka da se prefiks *nano* koristi za sisteme sa veličinom kapi od 1 do 100 nm (Mason i sar., 2006; Singh i sar., 2017), termin nanoemulzije se uobičajeno koristi za U/V emulzije sa veličinom kapi u submikronskom opsegu, tačnije ispod 1  $\mu\text{m}$ , najčešće između 100 i 500 nm (Klang i sar., 2012a).

Međutim, važno je istaći da iako je evidentan porast broja publikacija koje se bave nanoemulzijama kao nosačima za dermalnu/transdermalnu primenu NSAIL, treba imati na umu da neke od ispitivanih nanoemulzija, opisane kao termodinamički stabilni izotropni sistemi koji se formiraju spontano u prisustvu ulja, vode i visoke koncentracije surfaktanata i rastvarača, zapravo predstavljaju mikroemulzije (Klang i Valenta, 2011; Klang i sar., 2015). Stoga, kako bi se napravila jasna razlika u odnosu na mikroemulzije, u ovoj doktorskoj disertaciji, termin nanoemulzije se koristi za neravnotežne emulzione sisteme sa veličinom kapi u submikronskom opsegu i sa spontanom tendencijom ka razdvajanju faza tokom vremena (Gutiérrez i sar., 2008; Klang i Valenta, 2011). Međutim, dobra dugoročna fizička stabilnost (tj., kinetička stabilnost) tokom nekoliko godina čuvanja, proizilazi iz činjenice da zahvaljujući maloj veličini/masi i Braunovom kretanju kapi, sila gravitacije ne dolazi do izražaja, te su konvencionalni destabilizacioni fenomeni (npr. *creaming*, sedimentacija ili koalescencija) velikim delom sprečeni ili odloženi (Klang i Valenta, 2011; Mason i sar., 2006; Tadros i sar., 2004). Naime, usled smanjenja veličine kapi, opšte karakteristike nanoemulzija (izgled, fizičko-hemijske osobine i destabilizacioni fenomeni), značajno se razlikuju od konvencionalnih emulzija sa veličinom kapi u mikrometarskom opsegu.

U zavisnosti od veličine kapi uljane faze, nanoemulzije mogu biti transparentne ili translucetne (veličina kapi ispod 100 nm) ili mlečno bele boje (veličina kapi iznad 100 nm) sa pojavom plavičastog odsjaja usled Rejljevog rasipanja svetlosti (Klang i Valenta, 2011; Klang i sar., 2015; Savić, 2017). Za razliku od nanoemulzija, konvencionalne (mikrostrukturirane) emulzije su mlečno-bele boje usled višestrukog rasipanja svetlosti. Takođe, nanoemulzije su tečne konzistencije sa Njutnovskim ili približno Njutnovskim tipom tečenja, dok klasične emulzije karakteriše veći viskozitet kao i, uglavnom, pseudoplastični tip tečenja (Klang i sar., 2015). Sa druge strane, glavni mehanizam destabilizacije karakterističan za nanoemulzije je Ostwald-ovo sazrevanje (engl., *Ostwald ripening*). Pokretačka snaga za ovu pojavu je razlika u rastvorljivosti i Laplasovom pritisku između malih i velikih kapi nanoemulzije (manje kapi imaju veći Laplasov pritisak i veću rastvorljivost u odnosu na veće kapi). Posledično, molekuli sa manjih kapi difunduju na veće kapi, što rezultuje dodatnim povećanjem veličine većih kapi na račun smanjenja veličine malih kapi (Welin-Berger i Bergenståhl, 2000). Ostwald-ovo sazrevanje je karakteristično za nanoemulzije sa veličinom kapi od 100 do 500 nm ili manjom, i posebno, izrađenih sa uljanom fazom koju karakteriše značajna rastvorljivost u vodenoj fazi. Za razliku od nanoemulzija, Ostwald-ovo sazrevanje nije od velikog značaja u klasičnim emulzijama sa veličinom kapi u mikrometarskom opsegu (Klang i Valenta, 2011). Dodatno, interesantno je napomenuti da su brojna ispitivanja potvrdila da je uloga Ostwald-ovog sazrevanja u klasičnim nanoemulzijama izrađenim primenom lecitina kao emulgatora i visoko apolarnih ulja, zanemarljiva, pre svega zahvaljujući niskoj rastvorljivosti lecitina u vodi (Fox, 2009; Klang i Valenta, 2011).

### **1.3 Nanoemulzije – nosači lekovitih supstanci za dermalnu/transdermalnu primenu**

Prve nanoemulzije uvedene su u kliničku praksu pre više od pola veka i od tada se uspešno koriste u parenteralnoj ishrani pacijenata za isporuku esencijalnih masnih kiselina i kao izvor relativno velike količine energije (9 kcal/g) (Savić, 2017). Prva odobrena intravenska nanoemulzija, razvijena za potrebe parentralne ishrane pacijenata, bila je Intralipid® (Kabi-Pharmacia, Stokholm, Švedska) i predstavlja emulziju tipa U/V sa 10–20% sojinog ulja, u vidu kapi veličine od 70 do 400 nm, stabilizovanih

monoslojem mešavine fosfolipida iz žumanceta jajeta (1,2%) (Savić i sar., 2005a; Savić, 2017). Ispitivanja su, međutim, kasnije pokazala da primena nanoemulzija sa sojinim uljem kao jedinom unutrašnjom fazom u totalnoj parenteralnoj ishrani, kod određenih pacijenata dovodi do smanjenja migracije i fagocitoze granulocita, čime se povećava rizik za pojavu infekcija, uključujući i sepsu. Delimičnom ili potpunom zamenom sojinog ulja trigliceridima srednje dužine lanca, maslinovim ili ribljim uljem, ili pak njihovim kombinacijama, postignuto je smanjenje oksidativnog stresa i oštećenja ćelija imunog sistema (Calder i sar., 2010). Kao rezultat, danas na tržištu postoji relativno veliki broj različitih formulacija namenjenih parenteralnoj ishrani pacijenata. Međutim, treba imati na umu da je i dalje prisutan mali broj studija kojima je ispitivan biološki efekat novih formulacija nanoemulzija, a dobijeni podaci su vrlo heterogeni usled različitog dizajna studija i populacije pacijenata (Calder i sar., 2010).

Međutim, zahvaljujući navedenim jedinstvenim karakteristikama nanoemulzija, poslednjih godina uočava se povećano interesovanje za razvojem nanoemulzija, kao nosača slabo rastvorljivih lekova, za različite puteve primene, posebno dermalnu/transdermalnu primenu. Brojni dokazi u literaturi ukazuju da nanoemulzije omogućavaju poboljšanu isporuku inkorporirane lekovite supstance u/kroz kožu, te se smatraju modernom alternativom za hemijske penetracione inženjere koji često dovode do iritacije kože, ili za fizičke metode koje narušavaju barijernu funkciju kože (Klang i Valenta, 2011; Shakeel i sar., 2012). Takođe, nanoemulzije omogućavaju rešavanje niza problema koji karakterišu druge koloidne nosače kao što su: relativno loša dugoročna stabilnost i nizak solubilizacioni kapacitet za lipofilne lekovite supstance kao glavni nedostatak liposomskih formulacija, iritacija kože koja potiče od visoke koncentracije surfaktanata u sastavu mikroemulzija, ili pak diskutabilan bezbednosni profil nanočestica (Klang i Valenta, 2011; Klang i sar., 2015). Dodatno, određene studije ukazuju na brže oslobađanje i bolju penetraciju/permeaciju inkorporirane lekovite supstance u/kroz kožu iz nanoemulzija u odnosu na druge koloidne nosače, pre svega usled deformabilne prirode nanokapi i njihovih interakcija sa kožom (Calderilla-Fajardo i sar., 2006; Clares i sar., 2014; Mitri i sar., 2011). Modifikacijom sastava i karakteristika nanoemulzija, moguće je postići kontrolisano oslobađanje i poboljšanu isporuku lekovite supstance u određenim (ciljnim) slojevima kože, bez značajnog prelaska u sistemsku cirkulaciju, što je značajno sa aspekta smanjenja rizika od

sistemskih neželjenih efekata. Na primer, Eskandar i sar. (2009) su uočili da se primenom nanoemulzija obloženih nanočesticama silicijum-dioksida značajno poboljšava isporuka transretinola u kožu (prevashodno u početnim slojevima kože, ali i dublje u vijabilnom epidermisu i gornjim delovima dermisa) sa zanemarljivo malim prolaskom kroz kožu. Dalje, zahvaljujući hidratišućim svojstvima, nanoemulzije mogu imati značajnu ulogu u lečenju hroničnih oboljenja kože, kao što je atopijski dermatitis kada primenjeni nosač nikako ne sme da iritira ili da dodatno slabi barijernu funkciju kože (Baspinar i sar., 2010; Yilmaz i Borchert, 2006). Interesantno je napomenuti da, iako se nanoemulzije prevashodno koriste kao nosači slabo rastvornih lekovitih supstanci, u literaturi se mogu naći primeri uspešno formulisanih nanoemulzija za dermalnu primenu hidrofilnih lekovitih supstanci, kao što je hidrohlorid 5-aminolevulinske kiseline (5-ALA). Iako se 5-ALA rastvora u vodi, formulacijom nanoemulzija baziranih na lecitinu postignuta je bolja hemijska stabilnost 5-ALA (sprečena je njena dimerizacija), verovatno usled interakcije sa spoljašnjim, hidrofilnim delovima fosfolipidnog sloja. Takođe, uočena je značajno bolja penetracija 5-ALA u epidermis iz formulacije nanoemulzija u odnosu na konvencionalni krem, verovatno usled fuzije nanokapi sa lipidnim komponentama SC. S obzirom da se 5-ALA koristi u fotodinamskoj terapiji (lokalno), posebno značajno je i da nije detektovano prisustvo 5-ALA ispod bazalne membrane. Opisani efekti potvrđeni su u odgovarajućim kliničkim studijama, što je rezultovalo i pojavom odgovarajućeg preparata na tržištu (Ameluz<sup>®</sup>, Biofrontera Pharma GmbH) (Maisch i sar., 2010; Klang i sar., 2015).

Konačno, pored brojnih studija koje ističu benefite primene nanoemulzija kao nosača lekovitih supstanci za primenu na koži, treba napomenuti i određene nedostatke. Kao glavni problem izdvaja se nizak viskozitet koji delimično ograničava primenu nanoemulzija na koži, ali ujedno pruža i mogućnost za razvoj preparata u obliku spreja. Određene studije ukazuju i na smanjenje isporuke lekovitih supstanci u kožu primenom nanoemulzija. Na primer, Silva i sar. (2009) su uočili da se formulacijom nanoemulzija povećava *lag-time* i smanjuje fluks genisteina kroz kožu, usled interakcije genisteina sa fosfolipidima lecitina iz jajeta (povećan afinitet za sam nosač i smanjeno oslobađanje). Dodatno, važno je naglasiti da su nanoemulzije veoma osetljive na modifikacije u sastavu, tj., inkorporiranje velikog broja lekovitih supstanci ima za posledicu narušavanje dugoročne fizičke stabilnosti nanoemulzija. Drugim rečima, interakcije

lekovitih supstanci sa komponentama nanoemulzija su prilično kompleksne i gotovo je nemoguće u potpunosti predvideti promene u fizičkoj stabilnosti sistema (Sznitowska i sar., 2001). Stoga, jasno je da razvoj nanoemulzija nije jednostavan zadatak, što svakako za posledicu ima ograničen broj formulacija nanoemulzija za dermalnu/transdermalnu primenu na tržištu. U tabeli 1.1 predstavljeni su primeri nanoemulzija za primenu na koži koje su klinički odobrene ili se nalaze u različitim fazama kliničkih ispitivanja.



**Tabela 1.1.** Primeri nanoemulzija za primenu na koži koje se nalaze u različitim fazama kliničkih ispitivanja ili su komercijalno dostupne (Chen i sar., 2011; Singh i sar., 2017; <https://clinicaltrials.gov/>)

Lekovita supstanca	Indikacija/ Upotreba	Karakteristike nosača	Faza kliničkog istraživanja	NCT broj/ Status	Sponzor/ Proizvođač
Diklofenak dietanolamin	Osteoartritis kolena	Diklofenak dietanolamin (3%) je rastvoren u uljanoj fazi nanoemulzije (kapi od 100 do 200 nm), koja je ugušćena sredstvima za povećanje viskoziteta	II	NCT00484120 Završeno	Pharmos Corporation (Iselin, SAD)
5-ALA	Blaga do umerena aktinična keratoza	Ameluz® nanoemulzioni gel (BF-200 ALA gel) sadrži: aminolevulinska kiselina (78 mg/g), ksantan guma, fosfatidilholin iz soje, polisorbit 80, trigliceridi srednje dužine lanca, izopropil alkohol, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , propilenglikol, Na-benzoat i prečišćena voda.	/	Odobreno	Biofrontera Bioscience GmbH, (Leverkusen, Nemačka)
5-ALA	Melanom (Lentigo maligna)/ Karcinom bazalnih ćelija	Ameluz® nanoemulzioni gel (Biofrontera Bioscience GmbH, Nemačka	IV/II	NCT02685592 Završeno/ NCT02367547 U toku	Päijät-Häme Social and Health Care (Lahti, Finska)

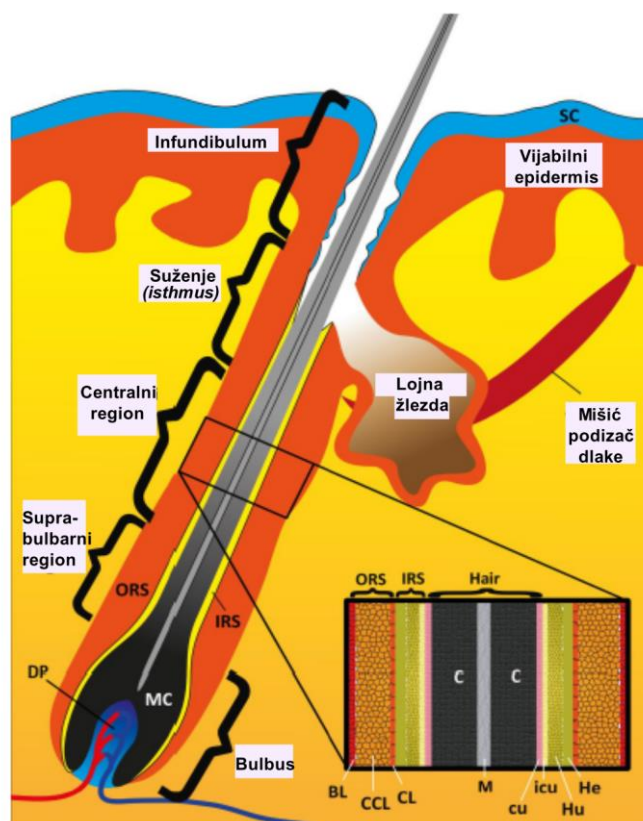
NB-001	Rekurentni herpes labialis	NB-001 (0,3%) je ulje-u-vodi nanoemulzija pozitivno naelektrisanih kapi (180 nm): visoko prečišćeno sojino ulje, prečišćena voda, etanol, dinatrijum-edetat, polisorbata 20 i cetilpiridinijum-hlorid	III	NCT01695187 Nepoznato	NanoBio Corporation – deo BlueWillow Biologics (Mičigen, SAD)
Testosteron	Gubitak libida kod žena u menopauzi	Testosteron (5%) u Biolipid B2 <sup>®</sup> nanoemulziji (Evidence Pharmaceuticals, Sao Paulo, Brazil) koja sadrži oleinsku kiselinu, fosfolipide i druge supstance koje mogu da poboljšaju isporuku kroz kožu	II	NCT02445716 U toku	University Potiguar (Natal, Brazil)
Estradiol	Vazomotorni simptomi udruženi sa menopauzom	Estrasorb <sup>®</sup> sadrži estradiol (2,5 mg/g) u nanoemulziji koja se sastoji od sojinog ulja, prečišćene vode, polisorbata 80 i etanola	/	Odobreno	Novavax, Inc. (Kolumbija)
Kamfor, mentol, metil salicilat	Bolesti/ povrede koštano-mišićnog sistema	Flexogan <sup>™</sup> sadrži: kamfor (6%), mentol (6%), metil salicilat (16%), trigliceridi srednje dužine lanca	/	Odobreno	AlphaRx Inc. (Hongkong, Kina)

#### **1.4 Mehanizmi odgovorni za poboljšanu isporuku lekovitih supstanci u/kroz kožu primenom nanoemulzija**

Uprkos intenzivnim istraživanjima i relativno velikom broju publikacija koje su ukazale na poboljšanje penetracije leka nakon primene nanoemulzija na kožu, mehanizmi koji se nalaze u osnovi tog procesa još uvek su nedovoljno poznati. Danas, kao i pre dvadeset godina, još uvek nema pouzdanih dokaza da su kapi nanoemulzija sposobne da prođu intaktne kroz efikasnu, višeslojnu kožnu barijeru (Klang i sar., 2015; Patzelt i sar. 2017). Kao što je dobro poznato, SC, nevijabilni, površinski deo epidermisa debljine 10–20  $\mu\text{m}$ , predstavlja prvu barijeru za difuziju nanokapi u/kroz kožu. SC je organizovan po principu „cigle i maltera“ (engl., *brick and mortar model*), gde cigle predstavljaju orožale, terminalno diferencirane keratinocite, a malter intercelularni lipidni matriks koji se sastoji od ceramida, slobodnih masnih kiselina, holesterola, a u malom procentu su zastupljeni trigliceridi i holesterol-sulfat. Dodatno, kohezivnost SC je obezbeđena korneodezmozomima, proteinskim spojnica između susednih korneocita. Između dva korneocita se nalazi prostor približne veličine 75 nm, koji je ispunjen lipidima i koji zajedno sa korneodezmozomima ograničava ulazak nanokapi u kožu (Roberts, 2007; Todosijević, 2017). Tesne veze (engl., *the tight junctions*) prisutne u *stratum granulosum*-u, predstavljaju drugu liniju odbrane za transport stranih čestica u/kroz kožu, posebno u slučajevima kada je barijerna funkcija SC-a narušena (Mathes i sar., 2016a). Takođe, mreža antigen-prezentujućih ćelija u epidermisu i dermisu dodatno vrši detekciju i uklanjanje stranih čestica i mikroorganizama, i tako doprinosi barijernim svojstvima kože (Patzelt i sar., 2017).

Tokom poslednjih godina, folikuli dlake su prepoznati kao važan put u penetraciji lekovitih supstanci primenjenih na koži u obliku nanoemulzija. Do nedavno se smatralo da folikuli dlake zauzimaju svega 0,1% ukupne površine kože, te je njihova uloga u isporuci lekova u/kroz kožu dugo zanemarivana. Međutim, treba imati na umu da gustina i dimenzije folikula dlake značajno variraju u zavisnosti od dela tela, te da se vrednost od 0,1% odnosi isključivo na podlakticu. Na primer, na čelu, broj dlaka po  $\text{cm}^2$  iznosi 292, što odgovara ukupnoj površini otvora folikula od  $13,7 \text{ mm}^2$ , odnosno 13,7% ukupne površine kože (Lauterbach i Müller-Goymann, 2015). Stoga, smatra se da folikuli dlake mogu značajno da doprinesu apsorpciji malih molekula sa relativno niskim do umerenim vrednostima particionog koeficijenta, i posebno nanočestica

(Raber i sar., 2014). Brojne studije su potvrdile da nanočestice, u zavisnosti od svojih fizičko-hemijskih karakteristika, mogu efikasno da penetriraju u folikule dlake. Usled male brzine protoka sebuma kao i rasta dlake, nanočestice mogu da formiraju depo unutar folikula, gde su zaštićene od kontakta sa odećom i sredstvima za pranje kože. Međutim, usled specifične građe folikula dlake, nije uočena transfolikularna penetracija nanočestica u vijabilni epidermis/dermis. Naime, za razliku od lekova male molekulske mase, koji u zavisnosti od svojih fizičko-hemijskih osobina mogu da penetriraju kroz folikularni epitel u vijabilno potkožno tkivo, nanočestice ostaju zarobljene u folikulima dlake, odakle mogu biti jedino uklonjene sporim procesima kao što su rast dlake i protok sebuma (Patzelt i sar., 2011; Raber i sar., 2014).



**Slika 1.2.** Šematski prikaz građe folikula dlake: SC – stratum corneum, ORS – spoljašnji omotač korena dlake (engl., *the outer root sheath*), IRS – unutrašnji omotač korena dlake (engl., *the inner root sheath*), DP – dermalna papila, MC – matriksne ćelije, BL – bazalni ćelijski sloj ORS-a, CCL – centralni ćelijski sloj ORS-a, CL – prateći ćelijski sloj ORS-a, C – korteks dlake, M – medula, cu – kutikula dlake, icu – kutikula IRS-a, He – *Henle*-ov sloj IRS-a, Hu – *Huxley*-jev sloj IRS-a (prilagođeno iz Mathes, 2015)

Anatomski, razlikuje se 5 delova u strukturi folikula dlake: bulbus, suprabulbarni region, centralni region, suženje (engl., *isthmus*) i infundibulum (slika 1.2). Bulbus je najdublji, najudaljeniji deo folikula dlake i predstavlja mesto gde se odvija biološka sinteza dlake. Sastoji se iz germinativne zone (matriksne ćelije) i dermalne papile (mezenhimske ćelije), za koju se veruje da reguliše rast dlake. Suprabulbarni region je lociran neposredno iznad bulbusa. *Isthmus* se prostire između lojne žlezde i mišića podizača dlake (slika 1.2), i uključuje i tzv. ispupčenje (engl., *bulge*) folikula dlake. Ovaj deo je posebno interesantan brojnim istraživačima, jer sadrži folikularne epitelne i melanocitske matične ćelije koje su uključene, na primer, u regeneraciju epitela tokom zarastanja rana (Mathes, 2015). Dodatno, krvni sudovi prisutni u blizini *bulge*-a, potencijalno omogućavaju isporuku leka u sistemsku cirkulaciju (Fang i sar., 2014). Deo između mišića podizača dlake i suprabulbarnog regiona naziva se centralni region. Infundibulum je najviši deo folikula dlake, koji pored proste uloge usmeravanja izlaska dlake iz folikula, ima i bogatu mrežu ćelija (pre svega interesantne antigen-prezentujuće ćelije) (Mathes, 2015). SC je prisutan nepromenjen/intaktan samo u gornjem delu infundibuluma, njegova barijerna funkcija značajno je oslabljena već u donjem delu infundibuluma, dok ostali delovi folikula dlake ne poseduju SC (Mathes i sar., 2016a). Iako je prisustvo proteina odgovornih za formiranje tesnih veza u različitim delovima folikula dlake (uključujući i delove bez SC) dokazano pre više od 10 godina, nedavno je detaljno ispitana njihova uloga u formiranju barijere za transport nanočestica kroz folikule dlake, odnosno njihova sposobnost da kompenzuju nedostatak SC u dubljim slojevima folikula dlake. Mathes i sar. (2016a) su utvrdili da su tesne veze, prisutne u spoljašnjem delu spoljašnjeg omotača korena dlake (ORS, slika 1.2) i da formiraju kontinualnu barijeru koja se prostire od infundibuluma do suprabulbarnog regiona. Takođe, prisustvo tesnih veza potvrđeno je i u Huxley-jevom sloju unutrašnjeg omotača korena dlake (IRS) u suprabulbarnom delu, a nisu detektovane u bulbusu folikula dlake. U cilju procene barijernih osobina uočenih tesnih veza, Mathes i sar. (2016a) pratili su distribuciju polimernih (PLGA) nanočestica (154 nm) obeleženih magnetitom u folikulima dlake kože uha svinje primenom transmisiona elektronske mikroskopije. Najveći deo nanočestica lokalizovan je u infundibulumu koji karakteriše prisustvo dve barijere (SC i tesne veze). Daleko manje nanočestica detektovano je u dubljim delovima folikula dlake (do 500 µm od površine kože), u *isthmus*-u i gornjem delu centralnog

regiona. Interesantno, pojedinačne nanočestice uočene su u kutikuli i *Huxley*-jevom sloju IRS-a, ali prisustvo nanočestica nije detektovano u ORS-u kao ni dermisu. Stoga, jasno je da je tokom razvoja formulacija za transfolikularnu isporuku leka, veoma važno razmotriti dubinu penetracije nanočestica i njihov uticaj na tesne veze u cilju postizanja željenog terapijskog efekta.

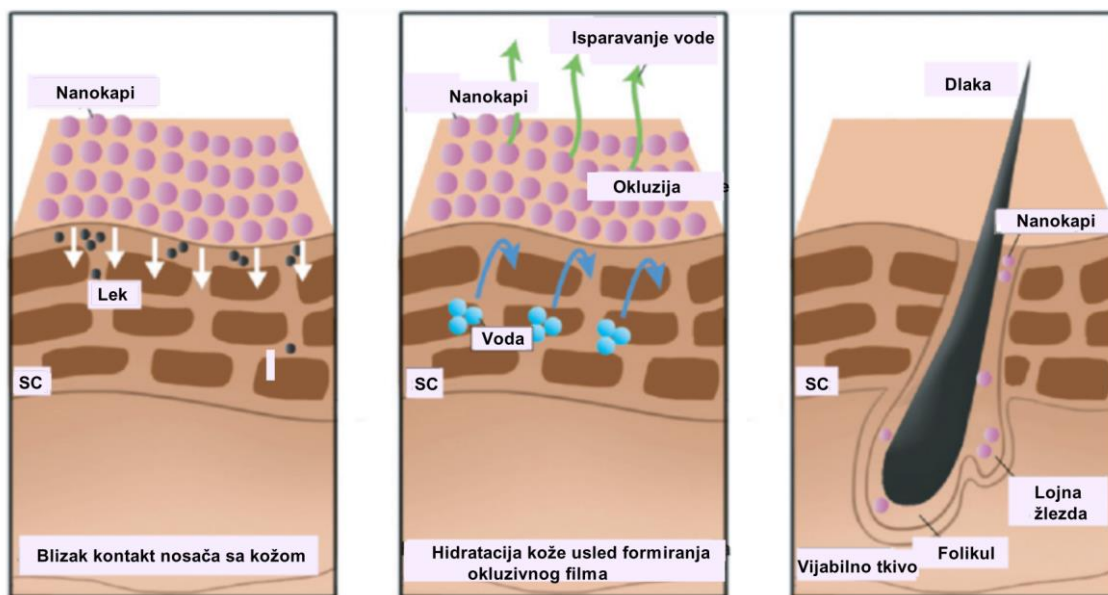
Imajući na umu opisana izuzetna barijerna svojstva kože, poboljšana isporuka leka u/kroz kožu primenom nanoemulzija generalno se pripisuje penetraciji nanokapi u folikule dlake, njihovoj akumulaciji u brazdama između korneocita i posledično interakcijama sa lipidnim matriksom, odnosno spajanju nanokapi sa lipidnim strukturama kože. Takođe, formiranje okluzivnog filma i poboljšana hidratacija kože, promena termodinamičke aktivnosti leka ili interakcije komponenti formulacije sa strukturama kože, mogu doprineti poboljšanju penetracije leka u/kroz kožu (Klang i Valenta, 2011; Klang i sar., 2015). Međutim, treba imati na umu da različiti faktori mogu da utiču na efikasnost isporuke lekovite supstance primenom nanoemulzija, i to pre svega, veličina kapi, površinsko naelektrisanje, sastav formulacije i slično (Klang i sar., 2015). Stoga, u narednom delu, ukratko je opisana uloga/značaj svakog od navedenih faktora za efikasnost isporuke lekovite supstance u/kroz kožu primenom nanoemulzija.

#### **1.4.1 Uloga veličine kapi nanoemulzija u isporuci lekovitih supstanci u/kroz kožu**

Veličina kapi je jedna od najvažnijih fizičkih karakteristika nanoemulzija sa aspekta kvaliteta i stabilnosti sistema, i posebno, efikasnosti isporuke lekovite supstance u/kroz kožu. Generalno, nanoemulzije sa malom veličinom kapi poseduju bolju fizičku stabilnost – brzine *creaming*-a i koalescencije povećavaju se sa porastom veličine kapi (Choi i sar., 2011). Međutim, za postizanje odgovarajućeg kvaliteta i stabilnosti, pored veličine kapi, značajna je vrednost i polidisperznog indeksa (PI), kao mere za raspodelu veličina kapi. Obično, vrednost  $PI \leq 0,1$  ukazuje na odličnu monodisperznost i visok kvalitet nanoemulzionog sistema; vrednost  $PI \leq 0,25$  ukazuje na relativno homogenu raspodelu veličina i zadovoljavajući kvalitet, dok vrednosti  $PI > 0,25$  ukazuju na veću heterogenost sistema i redukovani kvalitet nanoemulzija (Martins i sar., 2012).

Sa druge strane, smanjenjem veličine kapi, povećava se odnos površine i zapremine nanokapi, čime se ostvaruje blizak kontakt sa kožom i istovremeno visok

koncentracioni gradijent za transport leka u kožu. Takođe, nizak površinski napon omogućava bolje prijanjanje kapi nanoemulzija za površinu kože i posledično poboljšanu penetraciju inkorporirane lekovite supstance u/kroz kožu (Klang i sar., 2015; Kong i sar., 2011; Nam i sar., 2012). Takođe, nanokapi, u zavisnosti od veličine, mogu da penetriraju u folikule dlake, tako doprinoseći poboljšanoj isporuci lekovite supstance u/kroz kožu (Klang i sar., 2015).



**Slika 1.3.** Šematski prikaz glavnih mehanizama odgovornih za poboljšanu isporuku lekovite supstance u/kroz kožu primenom nanoemulzija (prilagođeno iz Fang i sar., 2014)

Među prvima, Friedman i sar. (1995) ispitali su efekte kapi nanovelicina na stepen isporuke lekovitih supstanci u/kroz kožu. Steroidni i nesteroidni antiinflamatorni lekovi (betametozan-valerat, betametazon-dipropionat, naproksen, diklofenak, indometacin i piroksikam) su inkorporirani u nanoemulzije prosečne veličine kapi ~150 nm i u klasične emulzije mikroskopske veličine kapi identičnog sastava, a zatim je poređena njihova antiinflamatorna aktivnost primenom modela edema šape izazvanog karageninom. Nakon primene nanoemulzija uočeno je značajno poboljšanje lokalne antiinflamatorne aktivnosti svih ispitivanih supstanci, kao i određena sistemska antiinflamatorna aktivnost. Autori su prepostavili između ostalog da fosfolipidi,

korišćeni za izradu nanoemulzija, mogu da penetriraju u lipidne dvoslojeve SC-a i povećaju njihovu fluidnost, omogućavajući poboljšanu penetraciju lekovitih supstanci u/kroz kožu. Takođe, Zhou i sar. (2010) uočili su da se nakon primene nanoemulzija izrađenih korišćenjem ulja zmije, lecitina iz soje, glicerola i prečišćene vode značajno povećava hidratacija kože i penetracija inkorporirane boje (*Nile red*) u dermis u poređenju sa kontrolom (U/V krem). Autori su pretpostavili da nanokapi bolje prijanjaju za površinu kože, i nakon isparavanja vode iz formulacije, obrazuju okluzivan film koji sprečava evaporaciju vode iz kože. Naime, kapilarne sile nanometarskih pora između nanokapi podstiču fuziju i formiranje okluzivnog filma, koji dovodi do bolje hidratacije kože. Stoga, poboljšana penetracija model boje u kožu mogla bi se pripisati fizičkim efektima izazvanim prisustvom nanokapi (Klang i sar., 2015). Svakako, ne treba zaboraviti da molekuli lecitina mogu da penetriraju u SC i menjaju barijerne osobine kože, tako doprinoseći poboljšanoj isporuci leka u/kroz kožu (Zhou i sar., 2010).

Kako usled niskog viskoziteta, nanoemulzije često mogu da budu neprikladne za primenu na kožu, Mou i sar. (2008) ispitivali su permeaciju kamfora, mentola i metilsalicilata kroz abdominalnu kožu pacova iz nanoemulzija ugušćenih dodatkom karbomera u odnosu na kontrolni gel. Uočeno povećanje permeacije ispitivanih supstanci kroz kožu pripisano je povećanom koncentracionom gradijentu, formiranju rezervoara leka ili ugradnji/spajanju uljanih nanokapi u/sa SC-om, čime je omogućena direktna penetracija u SC (bez difuzije kroz vodenu fazu nanoemulzija).

Sa druge strane, u cilju sprečavanja infekcija na mestu hirurških intervencija kao i za postizanja bezbedne primene injekcija, Ulmer i sar. (2012) ispitivali su mogućnost ciljne isporuke nanoemulzija sa poliheksanidom u folikule dlake (oko 25% bakterijske flore kože lokalizovano u folikulima dlake) kroz poređenje sa placebo nanoemulzijama analizom biopsija kože uha svinje primenom laserske skenirajuće mikroskopije. Dobijeni rezultati su jasno ukazali na tendenciju nanokapi da se akumuliraju u folikulima dlake, pri čemu je, interesantno, uočena značajno dublja penetracija nanokapi sa poliheksanidom u odnosu na odgovarajuće placebo uzorke. Kao potencijalno objašnjenje za uočen fenomen, autori su naveli razliku u veličini kapi placebo i nanoemulzija sa lekom. Veličina kapi nanoemulzija sa poliheksanidom je iznosila približno 500 nm, što je značajno povoljnije za isporuku u folikule dlake u odnosu na placebo nanoemulzije sa veličinom od oko 300 nm. Naime, Patzelt i sar. (2011)



pokazali su da nanočestice velične približno 600 nm mogu da penetriraju u dublje delove (npr. bulbus) folikula dlake. Daljim povećanjem veličine čestica značajno se smanjuje dubina penetracije nanočestica, dok su čestice manje veličine prevashodno pogodne za isporuku leka u infundibularni region folikula dlake ili u lojnu žlezdu.

Važno je napomenuti da, nasuprot velikom broju studija koje su ukazale na pozitivne efekte primene nanoemulzija, Klang i sar. (2011b) nisu uočili značajne razlike u isporuci lekova u/kroz kožu iz nanoemulzija u odnosu na mikrostruktuirane emulzione sisteme identičnog sastava. Primenom saharoza stearata S-970 (surfaktant sa umerenom lipofilnošću i specifičnim reološkim ponašanjem), variranjem postupka izrade, izrađene su tečne nanoemulzije sa veličinom kapi od 120 do 150 nm, kao i emulzije polučvrste konzistencije sa mikrometarskom veličinom kapi, primenom identičnog hemijskog sastava. Ispitivanjem in vitro penetracije/permeacije tri model supstance (kurkumin, flufenaminska kiselina, diklofenak) u/kroz kožu svinje, kao i in vivo penetracije u kožu dobrovoljaca, nisu uočene značajne razlike u dobijenim penetracionim/permeacionim profilima ispitivanih formulacija sa različitom distribucijom veličina kapi (Klang i sar., 2011b; Klang i sar., 2012b). Stoga, jasno je da primena nanoemulzija sa malom veličinom kapi ne dovodi obavezno do poboljšanja isporuke lekovite supstance u/kroz kožu. Štaviše, rezultati ove studije ukazuju da je penetracija lekovitih supstanci u kožu iz nanoemulzija prevashodno određena upotrebljenim ekscipijensima.

#### **1.4.2 Uloga površinskog naelektrisanja kapi nanoemulzija u isporuci lekovitih supstanci u/kroz kožu**

Površinsko naelektrisanje uljanih kapi nanoemulzije, izraženo preko vrednosti zeta potencijala, direktno određuje interakciju nanokapi sa kožom i posledično, stepen isporuke leka u/kroz kožu (Klang i sar., 2015). Sa druge strane, površinsko naelektrisanje nanokapi je ujedno jedan od ključnih faktora za postizanje odgovarajuće stabilnosti samih nanoemulzija tokom čuvanja. Visoke vrednosti zeta potencijala (iznad 30 mV i ispod -30 mV) ukazuju na visoko površinsko naelektrisanje koje za posledicu ima odbijanje susednih, slično naelektrisanih kapi i sprečavanje njihove agregacije i koalescencije (Klang i Valenta, 2011; Savić, 2017). Međutim, treba imati na umu da brojni faktori mogu da utiču na vrednost zeta potencijala, kao što su tip i koncentracija upotrebljenih surfaktanata, prisustvo različitih aditiva, koncentracija elektrolita (jonska

jačina), morfologija i veličina kapi, kao i pH vrednost sistema (Silva i sar., 2012). Stoga, vrednost zeta potencijala se ne može isključivo posmatrati kao garancija za stabilnost, odnosno nestabilnost nanoemulzionog sistema (Klang i Valenta, 2011; Savić, 2017). Na primer, moguće je postići zadovoljavajuću fizičku stabilnost sistema, uprkos relativno niskim vrednostima zeta potencijala, uvođenjem polimera sa površinskom aktivnošću (npr. hidroksipropilmetilceluloza) ili emulgatora sa voluminoznim grupama (npr. polisorbati). Pored sternog zaštitnog efekta, polimeri ili druga gelirajuća sredstva povećavaju viskozitet nanoemulzija i tako sprečavaju agregaciju ili *creaming*, obezbeđujući zadovoljavajuću dugoročnu fizičku stabilnost sistema (Klang i Valenta, 2011; Mou i sar., 2008).

Sa druge strane, u formulacije nanoemulzija često se uključuju i različiti aditivi u cilju postizanja visokog pozitivnog (npr. stearylamin, hitozan, oleilamin, cetiltrimetilamonijum bromid, fitosfingozin) ili negativnog (npr. deoksiholna kiselina) naelektrisanja nanokapi (Klang i Valenta, 2011), odnosno bolje elektrohemijske stabilizacije. Štaviše, smatra se da pozitivno naelektrisanje na površini nanokapi može da poboljša isporuku lekovitih supstanci kroz SC u dublje slojeve kože ili u sistemsku cirkulaciju (Klang i sar., 2015). Zahvaljujući prisustvu negativno naelektrisanih proteina, ostataka masnih kiselina i aktivnih jonskih pumpi, površina kože je negativno naelektrisana na fiziološkim pH vrednostima, što omogućava bolje vezivanje pozitivno naelektrisanih nanokapi (Fang i sar., 2004; Klang i sar., 2015; Mou i sar., 2008; Piemi i sar., 1999). Među prvima, Piemi i sar. (1999) su uočili da je obim isporuke ekonazola i mikonazol-nitrata kroz kožu ženki pacova in vitro značajno veći iz pozitivno naelektrisanih nanoemulzija izrađenih dodatkom stearylamina, u odnosu na negativno naelektrisane nanoemulzije izrađene uz dodatak deoksiholne kiseline. Svakako, treba imati na umu da stepen interakcije submikronskih kapi sa kožom, pored površinskog naelektrisanja, zavisi i od sastava formulacije nanoemulzija, fiziološkog stanja kože, kao i karakteristika lekovite supstance (Piemi i sar., 1999). Sa druge strane, prilično neočekivano, Fang i sar. (2004) su uočili da je dodatak stearylamina značajno smanjio permeaciju flurbiprofena kroz kožu pacova in vitro, verovatno usled porasta viskoziteta nanoemulzije koji je dalje uslovio smanjenje brzine oslobađanja flurbiprofena i posledično, permeacije kroz kožu. Interesantno, dodatak deoksiholne kiseline uslovio je povećanje permeacije flurbiprofena kroz kožu pacova. S obzirom da je upravo ova

formulacija posedovala i najnižu veličinu kapi, uočeno poboljšanje permeacije se ne može isključivo pripisati porastu negativnog naelektrisanja na površini kapi. Interesantno, Baspinar i Borchert (2012) su uočili da, iako je značajno veća količina prednikarbata oslobođena kroz sintetsku membranu iz negativno naelektrisane nanoemulzije, značajno veća količina leka je penetrirala u izolovanu humanu kožu iz pozitivno naelektrisane nanoemulzije, izrađene dodatkom fitosfingozina. Kako odgovarajućim termoanalitičkim studijama nije detektovan značajan uticaj nanoemulzija sa fitosfingozinom na fluidnost lipida kože u poređenju sa kontrolnom nanoemulzijom, može se pretpostaviti da poboljšana isporuka prednikarbata u kožu potiče prevashodno od interakcija pozitivno naelektrisanih kapi sa kožom (Hoeller i sar., 2009). Na osnovu navedenog, jasno je da efekat pozitivnog naelektrisanja nanoemulzija nije konzistentan u literaturi (varira od studije do studije), te ga je neophodno ispitivati, nezavisno, za svaku novu formulaciju.

#### **1.4.3 Uloga sastava formulacije nanoemulzija u isporuci lekovitih supstanci u/kroz kožu**

Pravilan izbor komponenti formulacije nanoemulzija, posebno vrste i udela uljane faze i surfaktanata, je od izuzetnog značaja kako sa aspekta kvaliteta i stabilnosti nanoemulzija, tako i sa aspekta efikasnosti isporuke leka u/kroz kožu (Clares i sar., 2014; Khandavilli i Panchagnula, 2007; Klang i Valenta, 2011; Milić i sar., 2017; Nam i sar., 2012). Na primer, polarnost uljane faze direktno utiče na stabilnost nanoemulzija prema Ostwald-ovom sazrevanju, ali i na brzinu oslobađanja inkorporirane lekovite supstance. Zahvaljujući hidrofobnoj prirodi, dodatak skvalena sprečava pojavu Ostwald-ovog sazrevanja, ali i istovremeno, omogućava proizvodnju nanoemulzija sa najmanjom veličinom kapi (u poređenju sa drugim uljima), te tako direktno utiče na interakciju nanokapi sa kožom i efikasnost isporuke lekovitih supstanci u/kroz kožu (Fox, 2009; Klang i sar., 2015). Dalje, visok udeo ulja (obično više od 20%) u sastavu formulacije može dovesti do povećanja veličine kapi (uključujući i povećanje udela kapi u mikrometarskom opsegu veličina), što negativno utiče na dugoročnu stabilnost nanoemulzija. Sa druge strane, povećanje udela uljane faze često dovodi do smanjenja brzine oslobađanja inkorporirane lekovite supstance, usled njenog dužeg zadržavanja u većoj količini emulzionih kapi (Savić, 2017).

U cilju dobijanje nanoemulzija zadovoljavajuće fizičke stabilnosti, pored odabira glavnog emulgatora (najčešće lecitin), često je neophodno uvođenje dodatnih stabilizatora, radi postizanja odgovarajuće elektrohemijske i/ili sterne stabilizacije nanokapi (Klang i Valenta, 2011; Milić i sar., 2017). Važan parametar koji karakteriše film surfaktanta na ulje-voda međupovršini je srednja spontana zakrivljenost  $H_0$  (engl., *spontaneous mean curvature*) i predstavlja prirodnu tendenciju monosloja da se savije, odnosno, zauzme oblik kapi.  $H_0$  je pozitivan za hidrofilne surfaktante sa velikom polarnom glavom i malim nepolarnim repom. Vrednost  $H_0$  smanjuje se sa porastom broja i dužine alkil lanaca nepolarne grupe. Surfaktanti sa visokim vrednostima  $H_0$  dovode do formiranja elastičnog ili fleksibilnog filma, dok sa niskim  $H_0$  favorizuju formiranje rigidnog filma surfaktanata (Wang i sar., 2006). Otuda, jasno je da sastav stabilišućeg filma na ulje-voda međupovršini može značajno da utiče na brzinu oslobađanja inkorporiranog leka. Primenom lecitina kao jedinog emulgatora, film koji se formira na međupovršini generalno ne predstavlja značajnu barijeru za difuziju, te dolazi do relativno brzog oslobađanja inkorporirane lekovite supstance (Klang i sar., 2015). Takođe, dodatak hidrofilnih kosurfaktanata sa visokim vrednostima  $H_0$  rezultuje formiranjem fleksibilnog mešanog filma na međupovršini koji najčešće ne utiče značajno na brzinu oslobađanja lekovite supstance iz uljane u vodenu fazu nanoemulzija (Wang i sar., 2006). Formiranje gusto pakovanog ili rigidnog filma surfaktanata na međupovršini dovodi do smanjenja brzine oslobađanja lekovite supstance iz uljane faze nanoemulzija, što za posledicu može da ima usporenu ili odloženu isporuku lekovite supstance u/kroz kožu (Montenegro i sar., 2012). Međutim, treba imati na umu da je određena gustina pakovanja surfaktanata na međupovršini neophodna za postizanje fizičke stabilnosti nanoemulzija. Stoga, važno je pravilno odabrati sastav smeše surfaktanata kako bi se postigla zadovoljavajuća stabilnost, i postiglo željeno (kontrolisano) oslobađanje lekovite supstance iz nanoemulzija (Klang i Valenta, 2011; Klang i sar., 2015).

Surfaktanti upotrebljeni za stabilizaciju nanoemulzija mogu da interaguju sa strukturama kože (prevažodno sa lipidnim matriksom, ali moguće su i interakcije sa proteinskim delovima SC) i naruše njenu barijernu funkciju, što za posledicu ima poboljšanu penetraciju leka u/kroz kožu. Međutim, treba imati na umu da, pored pozitivnog uticaja na isporuku leka u kožu, opisani efekti surfaktanata mogu biti praćeni

iritacijom kože, te je važan aspekt u formulaciji nanoemulzija bezbednosni profil odabranih surfaktanata. Među brojnim emulgatorima koji su predloženi za stabilizaciju nanoemulzija, prirodni lecitini su prvi izbor zbog odlične biokompatibilnosti i sposobnosti da poboljšaju penetraciju inkorporiranog leka u/kroz kožu (Hoeller i sar., 2009; Klang i Valenta, 2011; Milić i sar., 2017). Naime, fosfolipidi iz lecitina mogu da difunduju u SC, menjaju fluidnost lipida kože, te tako omogućavaju da lekovita supstanca inkorporirana u nanoemulzije značajno efikasnije penetrira u kožu (Hoeller i sar., 2009; Klang i Valenta, 2011; Paolino i sar., 2002). Međutim, treba imati na umu da ne mogu svi fosfolipidi da deluju kao penetracioni inhenseri, tj., različite lecitinske smeše ispoljavaju različit efekat na isporuku lekovitih supstanci u/kroz kožu. Određeni fosfolipidi, kao što je fosfatidilholin (PC), imaju nisku vrednost temperature prelaza iz gel u tečno-kristalno stanje, te su u tečnom stanju na prosečnoj temperaturi kože (32°C). Interakcija fosfolipida u tečnom agregatnom stanju sa SC navodno dovodi do fuzije i posledično, poboljšane penetracije inkorporiranog leka u kožu. Suprotno, smatra se da fosfolipidi u gel kristalnom stanju ne mogu da utiču na strukturu lipidnih dvoslojeva kože (Paolino i sar., 2002). Nezavisno od mehanizama odgovornih za poboljšanu isporuku leka u kožu, nanoemulzije bazirane na lecitinu kao emulgatoru se smatraju bezbednim i blagim (neškodljivim) za kožu, što je i potvrđeno u većem broju studija (Bae i sar., 2009; Fiume, 2001; Paolino i sar., 2002; Schöler i sar., 2001).

Dodatno, kako bi se poboljšala isporuka inkorporiranih lekovitih supstanci u/kroz kožu, pored navedenih ekscipijenasa, u formulaciju nanoemulzija mogu biti uključeni i hemijski penetracioni inhenseri. Na primer, Fang i sar. (2004) su uočili da po dodatku oleinske kiseline kao penetracionog inhensera, dolazi do smanjenja in vitro brzine oslobađanja flurbiprofena kroz sintetsku membranu (usled porasta veličine kapi nanoemulzija), ali značajnije, do povećanja in vitro fluksa i ukupne količine flurbiprofena deponovane u koži pacova in vivo, pre svega zbog povećanja fluiditeta lipidnog matriksa SC. Naime, smatra se da prisustvo oleinske kiseline dovodi do povećanja stepena neuređenosti intercelularnih lipidnih ugljovodoničnih lanaca ili do formiranja fluidnih domena u okviru tečnokristalnih lipidnih struktura, te reverzibilno smanjuje barijerna svojstva SC i olakšava difuziju u/kroz kožu. Međutim, treba imati na umu da pored pozitivnog uticaja oleinske kiseline na penetraciju lekovitih supstanci,

usled promena u integritetu kožne barijere, može doći do iritacije kože (Fang i sar. 2004; Klang i Valenta, 2011; Klang i sar., 2015).

## **1.5 Formulacija nanoemulzija sa NSAIL**

Efikasnost isporuke u/kroz kožu lipofilnih, slabo kiselih lekova (kakvi su NSAIL) inkorporiranih u nanoemulzije, zavisi ne samo od karakteristika lekovite supstance *per se* (molekulska masa, naelektrisanje, lipofilnost, sposobnost građenja vodoničnih veza), već, u značajnom stepenu, od karakteristika nanoemulzionog sistema (Roberts i Cross, 1999). Imajući na umu predložene mehanizme odgovorne za poboljšanu isporuku lekovitih supstanci u/kroz kožu, jasno je da je uspeh nanoemulzija kao nosača NSAIL kritično povezan sa njihovim sastavom (uljana faza, vodena faza, emulgator, i često koemulgator). Pravi izbor funkcionalnih, biokompatibilnih ekscipijenasa, naročito surfaktanata/emulgatora, u odgovarajućoj koncentraciji, je preduslov za formiranje, stabilnost, odgovarajuća fizičko-hemijska svojstva izrađenih nanoemulzionih sistema, i posledično, za adekvatnu terapijsku efikasnost inkorporirane lekovite supstance (Klang i Valenta, 2011; McClements, 2012; Savić, 2017). Međutim, važno je napomenuti da fizičko-hemijske karakteristike lekovite supstance (posebno izraženo u slučaju slabo kiselih lekova kakvi su NSAIL) nameću, u značajnom procentu, odabir komponenti formulacije nanoemulzija, o čemu će biti reči u narednom delu.

### **1.5.1. Surfaktanti u nanoemulzijama za primenu na koži – lecitin i saharozni estri**

Kao što je već naglašeno, prirodni lecitini se najčešće koriste kao emulgatori u formulacijama nanoemulzija za primenu na koži, i to pre svega zbog biokompatibilnosti, odličnog toksikološkog profila i podnošljivosti, ali i činjenice da se dobijaju iz obnovljivih izvora (iz soje ili žumanceta jajeta), primenom ekološki prihvatljivih procesa, te se lako proizvode industrijski, uz relativno niske troškove (Klang i Valenta, 2011; Milić i sar., 2017; van Hoogevest i Wendel, 2014). Prirodni lecitini su dobro poznati, generalno prepoznati kao bezbedni (GRAS status) farmaceutski ekscipijensi, opisani u farmakopejama (američka, kineska i japanska), i prihvaćeni od strane regulatornih agencija. Termin lecitin se koristi za kompleksnu smešu koju čine fosfolipidi, kombinovani sa različitim količinama drugih supstanci kao

što su trigliceridi i masne kiseline. Pored PC, kao glavne komponente, u prirodnim lecitinima prisutni su najčešće fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilinozitol (PI), fosfatidilserin (PS), fosfatidna kiselina (PA), sfingomijelin, lizofosfolipidi i drugi (Klang i Valenta, 2011; Savić, 2017; van Hoogevest i Wendel, 2014). Fosfolipidi poseduju površinsku aktivnost zahvaljujući amfifilnom karakteru; molekul fosfolipida se sastoji od glicerola esterifikovanog u pozicijama C-1 i C-2 sa masnim kiselinama (lipofilni deo molekula), a u poziciji C-3 sa fosfornom kiselinom koja je dalje esterifikovana sa dodatnim alkoholom (hidrofilni deo molekula). U zavisnosti od strukture polarne grupe i pH vrednosti sistema, PC i PE su zwitter joni i nisu naelektrisani pri neutralnim pH vrednostima, dok su PA, PS i PI, uključujući i malu količinu slobodnih masnih kiselina, negativno naelektrisani i odgovorni za negativno naelektrisanje na površini kapi (Hippalgaonkar i sar., 2010; Milić i sar., 2017; Savić, 2017; van Hoogevest i Wendel, 2014). Stoga, stabilnost nanoemulzija izrađenih primenom lecitina kao emulgatora potiče od 1) formiranja multilamelarnog omotača oko svake kapi koji deluje kao efikasna mehanička barijera za koalescenciju kapi, kao i od 2) prisustva elektrostatičkih odbojnih sila između susednih, negativno naelektrisanih kapi koje dodatno sprečavaju koalescenciju kapi prilikom slučajnih sudaranja (Klang i Valenta, 2011; Savić, 2017). Posledično, inkorporiranje lekovitih supstanci koje mogu da interaguju sa slojem emulgatora i/ili naelektrisanjem na površini kapi može da redukuje stabilnost nanoemulzija baziranih na lecitinu kao jedinom emulgatoru (Trotta i sar., 2002). Slabo kiseli lekovi, kakvi su NSAIL, obično su negativno naelektrisani na pH vrednostima formulacija za primenu na koži. Prisustvo naelektrisanja rezultuje pojavom površinske aktivnosti, te su ovi lekovi, makar delom, locirani na ulje-voda međupovršini. Stoga, razumno je očekivati da mogu da interaguju sa slojem emulgatora i/ili da utiču na površinsko naelektrisanje nanokapi, što posledično, može negativno da utiče na stabilnost nanoemulzionog sistema (Washington, 1996).

Kako bi se postigla zadovoljavajuća dugoročna stabilnost nanoemulzija baziranih na lecitinu u prisustvu NSAIL, uključivanje dodatnog koemulgatora u formulaciju nanoemulzija smatra se obećavajućim pristupom. Generalno, koemulgatori mogu da poboljšaju stabilnost nanoemulzija 1) povećanjem mehaničke snage filma emulgatora na površini kapi, 2) sternim zaštitnim efektom i/ili 3) obezbeđivanjem efikasne elektrostatičke barijere za koalescenciju kapi (Buszello i sar., 2000). Na primer, u jednoj

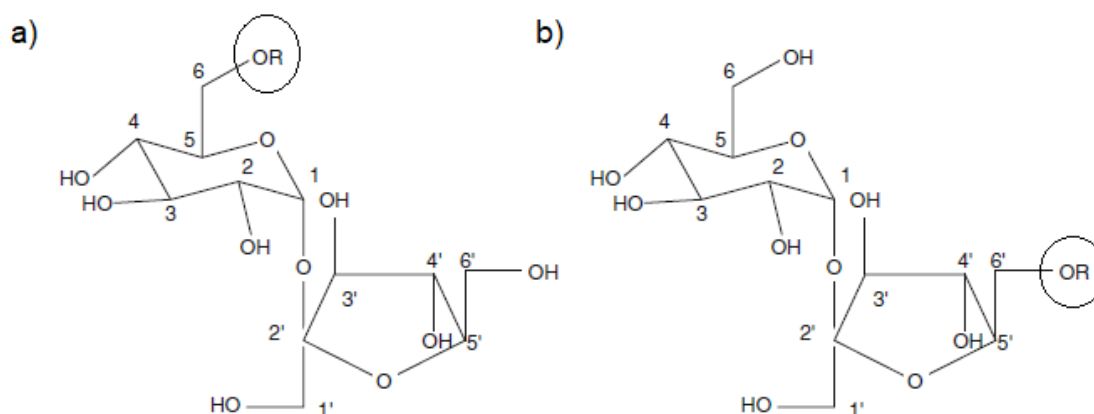
od prvih studija koja se bavila nanoemulzijama za topikalnu primenu NSAIL, polietoksilovani nejonski surfaktanti (Tween 80/Tyloxapol/Cremophor EL) su inkorporirani kao dodatni stabilizatori nanoemulzija baziranih na lecitinu (Friedman i sar., 1995). Smatra se da dodatak polietoksilovanih surfaktanata omogućava formiranje kompleksnog, gusto pakovanog filma na međupovršini kao i dodatnu sternu stabilizaciju nanokapi, omogućavajući dobru dugoročnu stabilnost nanoemulzija (Baspinar i sar., 2010; Klang i Valenta, 2011; Trotta i sar., 2002). Takođe, dodatak navedenih hidrofилnih surfaktanata dovodi do redukcije bezdimenzionog parametara pakovanja  $Sp$  ( $Sp$  vrednost za lecitin je približno 1, i nije idealna za formiranje zaobljenih površina), te obezbeđuje međupovršinskom filmu dovoljnu fleksibilnost za zauzimanje oblika nanokapi (Savić, 2017; Wang i sar., 2006).

Međutim, iako polietoksilovani surfaktanti pokazuju zadovoljavajuću funkcionalnost u stabilizaciji nanoemulzija, njihova primena na koži pod određenim uslovima može dovesti do ozbiljnih neželjenih efekata što ograničava njihovu širu kliničku primenu (Williams i Barry, 2004). Naime, određeni literaturni podaci ukazuju da su polietoksilovani surfaktanti osetljivi na oksidaciju atmosferskim kiseonikom tokom rukovanja i čuvanja na sobnoj temperaturi. Formirani oksidacioni proizvodi (kao što su peroksidi, formaldehidi i različiti etoksilovani aldehidi) mogu da dovedu do iritacije kože i kontaktnog dermatitisa, posebno kod osetljivih osoba (Bergh i sar., 1997; 1998). Takođe, treba imati na umu i slabu biorazgradivost ovih surfaktanata koji su prevashodno sintetskog porekla. Kao rezultat, tokom poslednjih nekoliko godina, uočava se sve veće interesovanje za primenom bezbednijih alternativa iz grupe nejonskih surfaktanata, koji se popularno nazivaju polihidroksilni surfaktanti (dobijaju se kondenzacionom reakcijom jedinjenja polihidroksilne strukture (glukoza, saharoza, glicerol) sa masnim kiselinama/masnim alkoholima) (Kovačević, 2014). Polihidroksilni surfaktanti su biodegradabilni, dobijaju se iz prirodnih i obnovljivih izvora postupkom koji ne uključuje etoksilaciju, te poseduju unapređene dermatološke i ekološke osobine, zbog čega se još nazivaju i „prijateljima kože i životne sredine“ (engl., *skin- and environmental-friendly surfactants*). Dodatno, ovi surfaktanti pokazuju i niz poželjnih fizičko-hemijskih osobina, kao što su neosetljivost na promenu temperature, relativno dobra stabilnost u prisustvu elektrolita i pri različim pH vrednostima, kao i pogodno fazno ponašanje (Holmberg, 2001; Kovačević, 2014; Savić i sar., 2010; Söderman i



Johansson, 2000; Todosijević, 2017). U okviru polihidroksilnih surfaktanata razlikuje se nekoliko grupa: glikolni estri, glicerol (i poliglicerolski) estri, glukozidi (i poliglukozidi), i saharozni estri (Söderman i Johansson, 2000; Todosijević, 2017). S obzirom da je primena saharoznih estara u formulacijama nanoemulzija generalno nedovoljno ispitana, jedan deo ove doktorske disertacije posvećen je ispitivanju funkcionalnosti saharoznih estara u kostabilizaciji nanoemulzija, kao i proceni njihovog efekta na isporuku model NSAIL u/kroz kožu.

Iako se saharozni estri prvi put pojavljuju u publikacijama iz pedesetih godina prošlog veka, tek tokom poslednje dve decenije uočava se povećano interesovanje za njihovom primenom, prevashodno zbog niza poželjnih osobina, kao što su biodegradabilnost, biokompatibilnost, niska toksičnost, kao i dobijanje iz obnovljivih izvora (Milić i sar., 2017; Nava-Arzaluz i sar., 2015; Szűts i Szabó-Révész, 2012; Todosijević, 2017). Prvi put, 1959. godine u Japanu, saharoza monoestri su odobreni kao aditivi u hrani, od kada počinju intenzivno da se koriste u industriji hrane, kozmetičkoj i, sve više, u farmaceutskoj industriji, kao nejonski surfaktanti i emulgatori. Posledično, danas, saharoza stearat i saharoza palmitat imaju monografije u Evropskoj i Američkoj farmakopeji. Prema podacima Američke agencije za hranu i lekove (FDA) („*Inactive Ingredients Database*“), u oralnim preparatima se preporučuje primena saharoza stearata i saharoza palmitata, dok se za primenu na kožu, preporučuje i primena saharoza distearata i saharoza polisterata (Kovačević, 2014; Nava-Arzaluz i sar., 2015; Szűts i Szabó-Révész, 2012). Saharozni estri se dobijaju iz sirovina prirodnog porekla, esterifikacijom saharoze (polarni deo molekula) masnim kiselinama (lipofilni deo molekula). Kao masne kiseline u saharoznim estrima za farmaceutsku primenu koriste se laurinska, miristinska, palmitinska, stearinska, oleinska, behenska i eruka kiselina. S obzirom da molekul saharoze sadrži osam slobodnih hidroksilnih grupa, moguće je dobiti mono- do oktaestre saharoze. Komercijalno dostupni estri saharoze su uglavnom kompleksne smeše koje sadrže mono-, di-, tri- i poliestre različitih masnih kiselina. Naime, vrlo teško je izolovati delimično supstituisane estre saharoze, usled velikog broja hidroksilnih grupa i malih razlika u reaktivnosti između primarnih (6, 6', 1') i sekundarnih (2, 3, 4, 3' i 4') hidroksilnih grupa (slika 1.4) (Nava-Arzaluz i sar., 2015; Szűts i Szabó-Révész, 2012; Todosijević, 2017).



**Slika 1.4.** Opšta strukturna formula saharoza monoestara: a) supstitucija u položaju 6 i b) supstitucija u položaju 6' (prilagođeno iz Nava-Arzaluz i sar., 2015)

Karakteristike saharoznih estara (rastvorljivost, tačka topljenja, površinska aktivnost, gelirajuće karakteristike, HLB broj) zavise u velikoj meri od tipa masne kiseline (odnosno dužine ugljovodoničnog lanca) kao i stepena esterifikacije molekula saharoze. Na primer, saharozni estri sa većim sadržajem monoestara su hidrofilniji, sa višim HLB vrednostima i dobrom rastvorljivošću u vodi, dok su saharozni estri sa većim stepenom esterifikacije lipofilniji i sa nižim HLB vrednostima. Sumarno, HLB broj saharoznih estara zavisi od (1) dužine alkil lanca acil grupe, (2) broja estarskih grupa po molekulu saharoze i (3) broja nezasićenih veza po alkil lancu (Das i sar., 2014; Milić i sar., 2017; Nava-Arzaluz i sar., 2015; Szűts i Szabó-Révész, 2012; Todosijević, 2017). Saharozni estri sa umerenim do visokim HLB vrednostima, posebno sa dužim acil lancem u strukturi (12 C atoma i više) efikasno pokrivaju površinu kapi usled gušćeg pakovanja na ulje-voda međupovršini, te se prevashodno koriste kao emulgatori u formulacijama emulzija (Cruces i sar., 2001; Das i sar., 2014). U tom smislu, interesantno je napomenuti da su Klang i sar. (2010) uočili da je, među tri saharozna estra koja su ispitivali (saharozna laurat L-595 (HLB ~ 5), saharozna laurat L-1695 (HLB ~ 16) i saharozna stearat S-970 (HLB ~ 9)), moguće dobiti fizički stabilne nanoemulzije u prisustvu progesterona kao model lekovite supstance, samo primenom saharozna stearata kao koemulgatora. Sa druge strane, Hoeller i sar. (2009) su uspešno razvili pozitivno i negativno naelektrisane lecitinske nanoemulzije primenom saharozna laurata kao koemulgatora.

Sa druge strane, određeni dokazi u literaturi ukazuju da saharozni estri mogu da poboljšaju penetraciju lekovitih supstanci u/kroz kožu, te postaje sve značajnija njihova primena kao penetracionih inhensera/pojačivača penetracije u formulacijama koloidnih sistema. Među prvima, Calderilla-Fajardo i sar. (2006) ispitivali su uticaj saharoznih estara (saharoza laurat i saharoza oleat), na stepen isporuke metoksicinamata inkorporiranog u različite nanonosae (uključujući i nanoemulzije) u kožu. Dobijeni rezultati ukazuju da se najveća penetracija metoksicinamata u kožu postiže primenom nanoemulzija stabilizovanih saharoza lauratom. Drugim rečima, penetracija metoksicinamata u kožu zavisila je od strukture i dužine hidrofobnog alkil lanca ispitivanih saharoznih estara kao i od karakteristika koloidnog nosača. Iako mehanizam odgovoran za poboljšanu isporuku leka u/kroz kožu nije u potpunosti poznat, pretpostavlja se da se dugačak ugljovodonični lanac saharoznih estara insertuje između lipofilnih lanaca lipida SC, omogućavajući interakciju saharoznog prstena sa polarnim glavama lipida SC. Kao rezultat ove interakcije, dolazi do modifikacije vodoničnih veza i jonskih sila, što dalje utiče na hidrataciju polarnih grupa, uzrokujući fluidizaciju lipida SC (Ayala-Bravo i sar., 2003; Calderilla-Fajardo i sar., 2006; Nava-Arzaluz i sar., 2015). Međutim, važno je napomenuti da brojna ispitivanja sprovedena u in vitro uslovima ukazuju da efekat saharoznih estara na oslobađanje i stepen isporuke leka u/kroz kožu zavisi od njihove HLB vrednosti i broja C atoma lanca masne kiseline. Generalno, smatra se da su saharozni estri sa kraćim ugljovodoničnim lancem i višim HLB vrednostima efikasniji kao penetracioni inhenseri u odnosu na saharozne estre sa dužim lancem i nižim HLB vrednostima (Csóka i sar., 2007; Nava-Arzaluz i sar., 2015; Szűts i Szabó-Révész, 2012)

Na kraju, važno je naglasiti da, iako je lecitin najčešće korišćeni emulgator u formulacijama nanoemulzija, on poseduje određene nedostatke koji značajno otežavaju razvoj nanoemulzija. Naime, fosfolipidi su osetljivi na hidrolitičku i oksidativnu degradaciju (Baspinar i sar., 2010), što dovodi do promena u izgledu i mirisu nanoemulzija tokom određenog perioda čuvanja (Klang i sar., 2011a). Takođe, molekuli lecitina imaju visok potencijal za samoagregaciju što rezultuje formiranjem vezikularnih i multilamelarnih struktura tokom proizvodnje nanoemulzija (Klang i sar., 2011a; Shchipunov, 1997). Uprkos intenzivnim istraživanjima, još uvek nije u potpunosti poznato da li te strukture imaju negativan efekat na dugoročnu stabilnost nanoemulzija.

Transport ulja preko micela kao i pojava liposoma smatraju se odgovornim za narušavanje stabilnosti nanoemulzija povećanjem stope Ostwald-ovog sazreivanja (Henry i sar., 2009; Tadros i sar., 2004). Stoga, kako bi se prevazišla ograničenja prirodnih lecitina, Klang i sar. (2011a) su ispitivali mogućnost izrade nanoemulzija primenom saharoza stearata S-970 kao jedinog emulgatora (HLB vrednost približna lecitinu) uz korišćenje različitih model lekovitih supstanci. Poređenjem novih nanoemulzija baziranih na saharoza stearatu i odgovarajućih lecitinskih nanoemulzija uočeno je da je saharoza stearat superiorniji u pogledu efikasnosti emulgovanja, formiranja kapi, i fizičko-hemijske stabilnosti nanoemulzija. Dodatno, nisu uočene razlike u permeaciji lipofilnih lekovitih supstanci kroz kožu između nanoemulzija baziranih na saharoza stearatu i lecitinskih nanoemulzija. Stoga, zaključak sprovedenih ispitivanja je da je saharoza stearat S-970 pogodan emulgator (čak i pogodniji od lecitina) za formulaciju nanoemulzija za primenu na koži.

### **1.5.2 Odabir komponenti uljane i vodene faze nanoemulzija**

Generalno, u formulacijama nanoemulzija za dermalnu/transdermalnu primenu uobičajeno se koriste ulja sa povoljnim dermatološkim profilom, kao što su sojino ulje, trigliceridi srednje dužine lanca, ricinusovo ulje, jojobino ulje, PCL, skvalen i slično (Klang i sar., 2015). Međutim, u slučaju slabo rastvornih lekovitih supstanci, kakvi su NSAIL, rastvorljivost lekovite supstance je glavni faktor koji određuje odabir uljane faze nanoemulzija, s obzirom da koncentracija leka u formulaciji direktno zavisi od rastvorljivosti u unutrašnjoj/uljanoj fazi nanoemulzija (Benita i Levy, 1993; Savić, 2017). Iako većina NSAIL pokazuje bolju rastvorljivost u uljanoj u odnosu na vodenu fazu nanoemulzija, količina leka koja se može rastvoriti u određenoj količini uljane faze (uobičajeno 20%, m/m), tokom konvencionalne *de novo* procedure pripreme nanoemulzija je obično nedovoljna za postizanje željene koncentracije aktivne supstance. Stoga, u literaturi su predložene različite strategije za povećanje količine lekovite supstance koja se može inkorporirati u formulaciju nanoemulzija pri određenoj koncentraciji uljane faze, kao što su metoda povišene temperature (engl., *temperature elevated method*), dodatak solubilizatora, sinteza prolekova sa izmenjenim fizičko-hemijskim osobinama, prevashodno povećanom lipofilnošću (Benita i Levy, 1993). Iako je metod povišene temperature najjednostavniji način za povećanje rastvorljivosti

lekovite supstance u uljanoj fazi nanoemulzija, često jednostavnim zagrevanjem nije moguće značajno povećati količinu supstance koja se može rastvoriti. Štaviše, nakon emulgovanja može doći do precipitacije lekovite supstance u nanoemulziji kako bi se redukovalo prezasićenje uljane faze (Wang i Cory, 1999; Jumaa i Müller, 2001). Nasuprot tome, dodatak lecitina, kao solubilizatora, se generalno smatra obećavajućim pristupom za povećanje rastvorljivosti lekovite supstance u formulaciji (Sznitowska i sar., 2001). Dodatno, pored opisanih načina za prevazilaženje problema ograničene rastvorljivosti, u literaturi se mogu naći slučajevi hemijske modifikacije lekovite supstance u cilju poboljšanja rastvorljivosti u uljanoj fazi nanoemulzija. Na primer, Gao i sar. (2013) su povećali lipofilnost deksketoprofena, esterifikacijom karboksilne grupe izopropanolom, te je dobijeni prolek mnogo pogodniji za formulaciju nanoemulzija u odnosu na deksketoprofen.

Tokom razvoja formulacije nanoemulzija, dodatno treba razmotriti i hemijsku stabilnost uljane faze, jer hemijska degradacija komponenti uljane faze može dovesti do promena u međupovršinskom filmu, i posledično do fizičke nestabilnosti i separacije faza nanoemulzija. U nanoemulzijama baziranim na lecitinu, komponente sklone oksidaciji su nezasićene masne kiseline triglicerida uljane faze i molekula lecitina. Interesantno, rezultati sprovedenih studija ukazuju da lecitin iz soje poseduje bolju stabilnost prema oksidaciji u odnosu na lecitin iz jajeta (Klang i Valenta, 2011; Savić, 2017; Wang i Wang, 2008). Dodatno, pored oksidativnih reakcija, može doći i do hidrolitičke degradacije triglicerida i fosfolipida, što za posledicu ima formiranje slobodnih masnih kiselina, lizofosfolipida i glicerofosforil derivata. Slobodne masne kiseline odgovorne su za naizgled kontradiktorno povećanje vrednosti zeta potencijala tokom čuvanja. Porast zeta potencijala je samo delimično koristan, jer je formiranje slobodnih masnih kiselina uvek praćeno i padom pH vrednosti. Smanjenje pH vrednosti podstiče dalje hidrolizu triglicerida, što dovodi do nestabilnosti nanoemulzija (Klang i Valenta, 2011; Baspinar i sar., 2010, Savić, 2017). Stoga, kako bi se postigla zadovoljavajuća stabilnost, poželjno je uključiti i antioksidanse (npr.  $\alpha$ -tokoferol, butilhidroksitoluen, butilhidroksianizol) u formulaciju nanoemulzija. Takođe, posebnu pažnju treba posvetiti odabiru uslova čuvanja. U literaturi se mogu pronaći primeri čuvanja nanoemulzija na sobnoj temperaturi, ali i u frižideru, u cilju postizanja zadovoljavajuće fizičko-hemijske stabilnosti.

Prilikom formulacije nanoemulzija kao nosača za NSAIL, odabir komponenti vodene faze je takođe izazovan zadatak. Generalno, preporučljivo je da pH vrednost nanoemulzija baziranih na lecitinu bude u približno neutralnom opsegu (6 – 7) da bi se postiglo optimalno naelektrisanje na površini kapi i smanjila na minimum brzina hidrolize triglicerida ulja i fosfolipida (Hippalgaonkar i sar., 2010). Međutim, pKa vrednost većine NSAIL je u opsegu 3,5 do 5,5, tako da neutralne pH vrednosti neminovno dovode do jonizacije i porasta rastvorljivosti u vodi ovih lekova, što za posledicu može da ima precipitaciju tokom čuvanja. Otuda, kako bi sprečili jonizaciju indometacina i podstakli njegovu lokalizaciju u uljanoj fazi nanoemulzija, Muchtar i sar. (1997) su podesili pH vrednost nanoemulzija na 3,8 dodatkom hlorovodonične kiseline (0,1N). Međutim, niske pH vrednosti nisu pogodne za dugoročnu stabilnost nanoemulzija baziranih na lecitinu, jer dovode do smanjenja površinskog naelektrisanja i posledično, do redukcije elektrostatickog odbijanja nanokapi, što dalje vodi ka destabilizaciji sistema. Takođe, iako postoje primeri studija u kojima su puferi uspešno korišćeni za izradu nanoemulzija (Savić, 2017), generalno se smatra da pufere treba izbegavati za stabilizaciju pH vrednosti, jer mogu da katalizuju hidrolizu lipida (Hippalgaonkar i sar., 2010). Na osnovu navedenog, jasno je da su, prilikom odabira vodene faze nanoemulzija na bazi surfaktanata prirodnog porekla, potrebna sveobuhvatna ispitivanja kako bi se NSAIL zadržali u uljanoj fazi i postigla dugoročna fizičko-hemijska stabilnost.

Na kraju treba napomenuti da je prilikom izrade nanoemulzija koje će biti pakovane u višedozne kontejnere, u cilju sprečavanja mikrobiološke kontaminacije tokom čuvanja i upotrebe, neophodno uključivanje konzervanasa u sastav formulacije. Međutim, najčešće korišćeni konzervansi (benzalkonijum-hlorid, benzilalkohol, hlorbutanol, metilparaben, propilparaben, tiomerosal) se delimično rastvaraju u uljanoj fazi i/ili interaguju sa slojem emulgatora na međupovršini, te je teško postići efikasnu koncentraciju konzervansa u vodenoj fazi nanoemulzija (Savić, 2017). Watrobska-Swietlikowska i Sznitowska (2006) uočile su da dodatak parabena dovodi do manjeg pada pH vrednosti nanoemulzije u odnosu na kontrolnu formulaciju bez parabena. Pretpostavlja se da je odgovor u interakciji parabena sa fosfolipidima i lipidima na međupovršini – povećanje kiselosti mikrosredine u međupovršinskom sloju u prisustvu parabena inhibira hidrolizu fosfolipida i posledično smanjuje pad pH vrednosti

(Pongcharoenkiat i sar., 2002; Watrobska-Swietlikowska i Sznitowska, 2006). Stoga, kako bi se sprečila mikrobiološka kontaminacija nanoemulzija tokom čuvanja i upotrebe, često je neophodno povećati koncentraciju konzervansa i/ili uključiti više različitih konzervanasa u sastav formulacije (Savić, 2017).

## **1.6 Izrada/proizvodnja nanoemulzija primenom homogenizacije pod visokim pritiskom**

Kako su nanoemulzije termodinamički nestabilni sistemi, njihova priprema nije spontani proces, odnosno neophodno je dovesti spoljašnju energiju sistemu. U zavisnosti od mehanizma odgovornog za formiranje nanokapi, metode za izradu nanoemulzija se dele u dve grupe: visokoenergetske (homogenizacija pod visokim pritiskom (HPH), mikrofluidizacija i primena ultrazvuka) i niskoenergetske metode (metod evaporacije rastvarača, spontani emulgujući metod i fazno-inverzni temperaturni (PIT) metod) (Klang i Valenta, 2011; McClements, 2012; Savić, 2017; Singh i sar., 2017; Tadros i sar., 2004). Visokoenergetske metode, kako im i samo ime kaže, zasnivaju se na primeni uređaja, koji obezbeđuju intenzivne sile koje omogućavaju emulgovanje i formiranje kapi nanovelicina unutrašnje faze. Sa druge strane, niskoenergetske metode zasnivaju se na fizičko-hemijskim svojstvima voda-ulje-surfaktant sistema, odnosno energiji samih komponenata formulacije nanoemulzija koje se mešaju na određen način, pod specifičnim uslovima (sastav, temperatura) (Klang i Valenta, 2011; McClements, 2012; Singh i sar., 2017; Savić, 2017).

Među navedenim metodama koje su predložene za izradu nanoemulzija, do sada, klasične nanoemulzije stabilizovane lecitinom kao emulgatorom, uglavnom su izrađivane primenom HPH metode, koja se ujedno jedina uspešno koristi za proizvodnju nanoemulzija na industrijskom nivou. Glavne prednosti ove metode su relativna jednostavnost, fleksibilna kontrola raspodele velicina kapi, kao i mogućnost proizvodnje nanoemulzija primenom različitih polaznih materijala (Jafari i sar., 2008; Puglia i sar., 2010). Standardno, gruba emulzija (pre-emulzija) sa veličinom kapi od nekoliko mikrona, obično pripremljena mešanjem uljane i vodene faze primenom rotor-stator homogenizera (npr. Ultra-Turrax) propušta se kroz homogenizator pod visokim pritiskom (najčešće korišćeni *piston-gap* homogenizatori) pri unapred definisanim vrednostima temperature, pritiska i broja ciklusa homogenizacije (Klang i Valenta,

2011; Savić, 2017). Međutim, treba imati na umu da će konačni ishod postupka homogenizacije zavisiti od nekoliko procesa koji se odvijaju unutar samog homogenizatora: 1) lomljenje kapi koje povećava specifičnu površinu kapi, 2) stabilizacija novoformiranih površina pomoću emulgatora, i 3) rekoalescencija novoformiranih kapi (Jafari i sar, 2008; Sainsbury i sar., 2014).

Intenzitet smicanja primenjen tokom izrade nanoemulzija direktno utiče na veličinu kapi. Ukoliko je viskozitet dispergovane faze ( $\eta_d$ ) zanemarljiv u poređenju sa viskozitetom kontinualne faze ( $\eta_c$ ), zavisnost veličine kapi od primenjene brzine smicanja i međupovršinskog napona može se predstaviti Taylor-ovom jednačinom:

$$r \sim \frac{\gamma}{\sigma \eta_c} \quad (1.1)$$

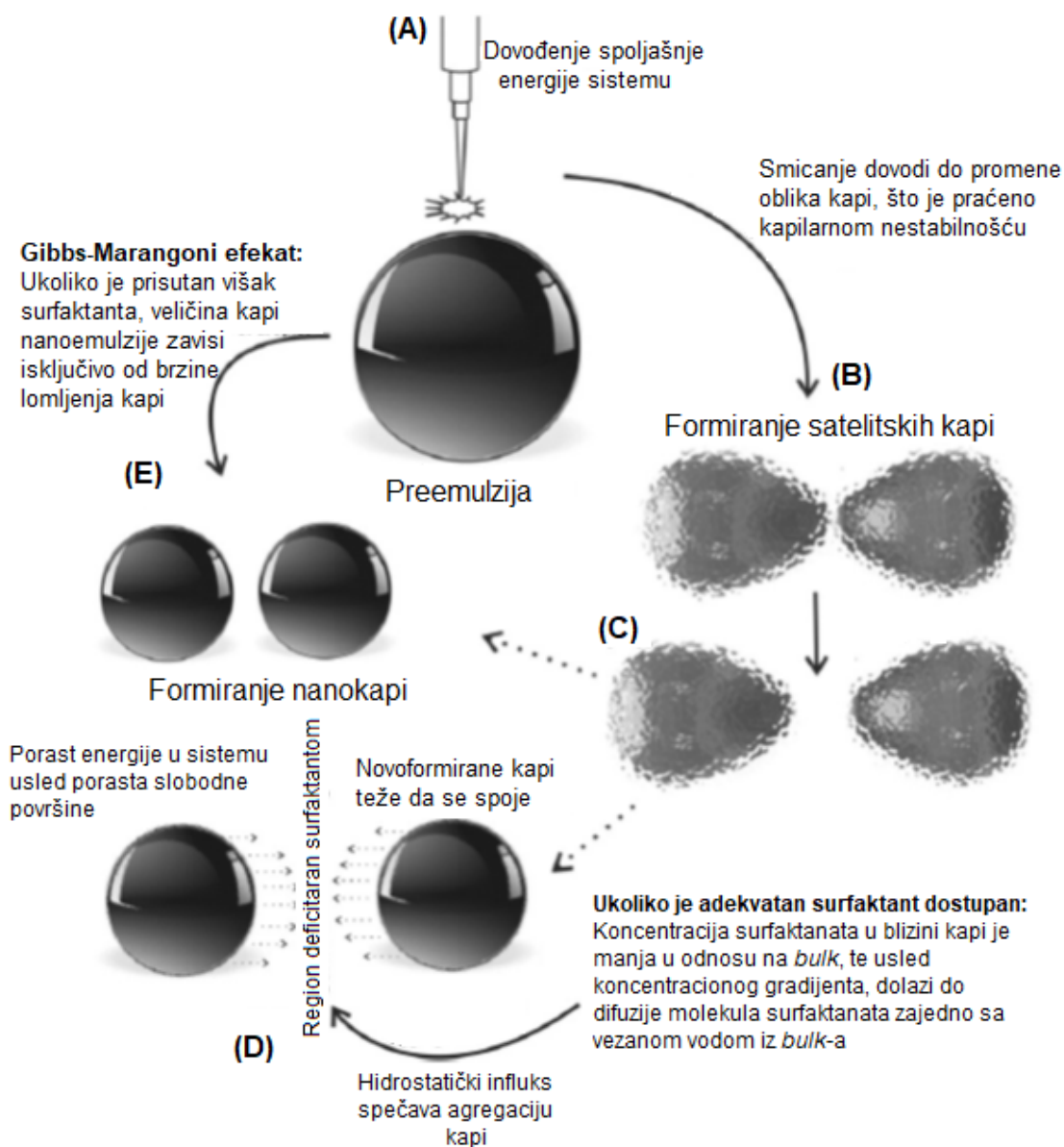
gde je  $\sigma$  – primenjena brzina smicanja,  $r$  – dijametar kapi,  $\gamma$  – međupovršinski napon.

Primena veće brzine smicanja kontinualne faze na dispergovanu fazu dovodi do promene oblika kapi (preko sfernog, elipsoidnog pa do tegovima sličnog oblika). Usled dejstva međupovršinskog napona, promena oblika je praćena kapilarnom nestabilnošću što za posledicu ima lomljenje kapi (originalna kap se deli na manje kapi, što je praćeno smanjenjem veličine kapi). Međutim, treba imati na umu da konačnu veličinu kapi određuje lomljenje kapi, ali i njihova koalescencija. Brzina fragmentacije kapi treba da bude veća od brzine rekoalescencije da bi se postigla efikasna redukcija veličine kapi. Surfaktanti, pored inherentne sposobnosti da smanjuju međupovršinski napon, treba da efikasno stabilizuju novoformirane površine kapi. Ova pojava se objašnjava Gibbs-Marangoni efektom. Ukratko, nakon formiranja novih kapi, formira se nova slobodna površina koja narušava termodinamičku ravnotežu sistema usled porasta slobodne energije. Kako bi se redukovao višak energije u sistemu, kapi teže da se ponovo spoje. Na tom putu, na površinu kapi se adsorbuju surfaktanti, smanjujući međupovršinski napon. S obzirom da je sada koncentracija surfaktanata u blizini kapi manja u odnosu na *bulk*, usled koncentracionog gradijenta, više molekula surfaktanta se usmerava u ovaj region. Viskozna prepreka formirana od molekula surfaktanta povlači vezanu vodu, što za posledicu ima formiranje hidrostatičkog influksa, koji sprečava spajanje kapi. Jačina Gibbs-Marangoni efekta zavisi od koncentracije surfaktanata i Gibbs-ove elastičnosti međupovršine (slika 1.5) (Singh i sar., 2017).

Na osnovu navedenog, pored odabira odgovarajućeg tipa i koncentracije surfaktanata, od ključnog značaja je i poznavanje kinetike adsorbovanja na međupovršinu.



Surfaktanti male molekulske mase (npr. lecitin i saharozni estri) generalno pokazuju brzu adsorpciju na međupovršinu. Međutim, u slučaju nedovoljne koncentracije, novoformirane površine neće biti u potpunosti pokrivena, što za posledicu ima porast veličine kapi, uprkos povećanju energije koja se dovodi sistemu (Jafari i sar., 2008; Sainsbury i sar., 2014).



**Slika 1.5.** Šematski prikaz mehanizma obrazovanja kapi nanoemulzija pod dejstvom spoljašnje energije (prilagođeno iz Singh i sar., 2017)

Takođe, relativni viskoziteti dispergovane ( $\eta_d$ ) i kontinualne faze ( $\eta_c$ ) imaju snažan uticaj na ishod procesa homogenizacije. Ukoliko je viskozitet veoma visok, kapi su otporne na sile koje teže da ih slome, i počinju da rotiraju oko sopstvene ose, kada su podvrgnute smicanju. Tip, udeo i viskozitet uljane faze imaju značajan uticaj na efikasnost procesa homogenizacije i posledično na veličinu kapi. U slučaju ulja sa većim viskozitetom (npr. ricinusovo ulje), neophodno je primeniti veći pritisak homogenizacije, kako bi se dobile nanoemulzije sa malom veličinom kapi i uskom distribucijom kapi po veličini (Jumaa i Müller, 1998a). Istraživanja su pokazala da je odnos  $0,5 \leq \eta_d/\eta_c \leq 5$  optimalan za dobijanje nanoemulzija sa izrazito malom veličinom kapi. Drugim rečima, ukoliko se koriste veoma viskozina ulja, smanjenje veličine kapi se može postići i povećanjem viskoziteta spoljašnje faze (Singh i sar., 2017). Sa druge strane, zagrevanje tokom procesa homogenizacije redukuje viskozitet uljane i vodene faze, kao i međupovršinski napon između njih, olakšavajući formiranje nanoemulzija sa manjom veličinom kapi (Floury i sar., 2000; Jafari i sar., 2008).

Konačno, na osnovu navedenog jasno je da parametri formulacije (vrsta i koncentracija komponenti u sastavu), procesni parametri (način mešanja uljane i vodene faze nanoemulzija, uslovi dobijanja preemulzije i samog procesa homogenizacije pod visokim pritiskom) kao i inkorporiranje lekovite supstance u uljanu fazu nanoemulzije značajno utiču na fizičko-hemijske karakteristike i stabilnost nanoemulzija, i posledično na terapijsku efikasnost inkorporiranog leka. Stoga, kako bi se dobile nanoemulzije sa željenim karakteristikama, tokom razvoja i optimizacije nanoemulzija kao perspektivnih nosača slabo rastvorljivih lekovitih supstanci, metodologija eksperimentalnog dizajna je prepoznata kao obećavajući alat. Za razliku od konvencionalnog „*one-factor-at-a-time*“ pristupa koji se bazira na promeni samo jednog faktora, a ostali drže konstantnim, metodologija eksperimentalnog dizajna omogućava da se istovremeno analizira uticaj nekoliko parametara (formulacionih i/ili procesnih) i njihovih interakcija na kritične attribute kvaliteta nanoemulzija, uz minimalni broj eksperimenata (Gutiérrez i sar., 2008; Hafner i sar., 2014; Hippalgaonkar i sar., 2010; Savić, 2017). Drugim rečima, primenom metodologije eksperimentalnog dizajna se može značajno olakšati razvoj nanoemulzija, u pogledu odabira sastava formulacije i uslova izrade koji rezultuju nanoemulzijama željenih/optimalnih karakteristika.

## 1.7 Razvoj generičkih preparata za primenu na koži – savremeni trendovi u proceni bioekvivalencije

Uprkos brojnim prednostima savremenih nosača lekova kao što su nanoemulzije, na tržištu i dalje dominiraju konvencionalni oblici lekova za primenu na koži (masti, kremovi, gelovi) poznatog kvaliteta, efikasnosti i bezbednosti. Tokom poslednjih godina, ograničenja u pogledu razvoja novih hemijskih entiteta, kao i potrebe pacijenata za pristupačnijim lekovima, rezultovale su porastom interesovanja ka razvoju generičkih lekova. Međutim, uprkos intenzivnim naporima, broj generičkih preparata za primenu na koži na svetskom i domaćem tržištu je ograničen, usled brojnih problema u dokazivanju biološke ekvivalencije sa odgovarajućim referentnim lekom (Miranda i sar., 2018a, b). Formulacije polučvrstih preparata za primenu na koži, kao i odgovarajući procesni parametri su izuzetno kompleksni (sadrže značajno veći broj ekscipijenasa u odnosu na lekove za druge puteve primene), što povećava mogućnost za varijabilnost i razlike u isporuci lekova u/kroz kožu. Drugim rečima, uprkos identičnom kvalitativnom i kvantitativnom sastavu može doći do izostanka željenog terapijskog efekta, usled razlika u mikrostrukturi (Shah i sar., 2015).

Prema *Code of Federal Regulations Title 21* (21 CFR 320.24, 2013), dva preparata su bioekvivalentni, ako su farmaceutski ekvivalentni i ako nema značajnih razlika u brzini i stepenu isporuke leka na mestu delovanja, kada se primene pod identičnim uslovima u odgovarajuće dizajniranoj studiji. Pojam farmaceutska ekvivalentnost podrazumeva da generički lek sadrži istu aktivnu supstancu u istoj količini i istom farmaceutskom obliku kao odgovarajući referentni lek. Nakon odobrenja, generički lek je terapijski ekvivalentan i zamenljiv odgovarajućim referentnim („originatorskim“) lekom (Shah i sar., 2015). Generalno, procena bioekvivalencije preparata za primenu na kožu se vrši primenom 4 tipa testova, prema opadajućem prioritetu: 1) farmakokinetičke studije, 2) farmakodinamske studije, 3) komparativne kliničke studije i 4) in vitro testovi (21 CFR 320.24, 2013). S obzirom da je ciljno mesto delovanja većine lekova namenjenih za dermalnu primenu sama koža (njeni slojevi) ili potkožno tkivo, koncentracije lekovite supstance u krvi/plazmi su najčešće nemerljive ili su veoma niske. Stoga, dokazivanje biološke ekvivalencije u najvećem broju slučajeva zahteva sprovođenje randomizovanih, dvostruko-slepih, placebo-kontrolisanih, kliničkih studija, izuzev u slučaju lekovitih supstanci iz grupe kortikosteroida, kada se preporučuje korišćenje

farmakodinamskog (vazokonstriktornog) testa (Yacobi i sar., 2014). Primena kliničkih studija omogućava dokazivanje ekvivalentne efikasnosti i bezbednosti ispitivanog generičkog u poređenju sa odgovarajućim referentnim lekom. Međutim, važno je istaći da brojni faktori mogu uticati na tako dobijene rezultate (npr. heterogenost stanja kože, nerazlikovanje suštinskih/stvarnih od navodnih/placebo efekata, primenjena količina preparata značajno varira među pacijentima, problemi vezani za adherencu, i slično). Dodatno, kako bi se postigla potrebna statistička značajnost, kliničke studije obično podrazumevaju uključivanje velikog broja pacijenata ( $n > 500$ ), te su vremenski zametne, izuzetno skupe, a često i udružene sa visokom varijabilnošću i niskom osetljivošću u detekciji potencijalnih razlika između formulacija. Stoga, kliničke studije se smatraju najmanje preciznim, najmanje osetljivim i reproduktivnim među predloženim pristupima u proceni bioekvivalencije (Braddy i sar. 2015; Raney i sar., 2015; Shah i sar., 2015; Yacobi i sar., 2014).

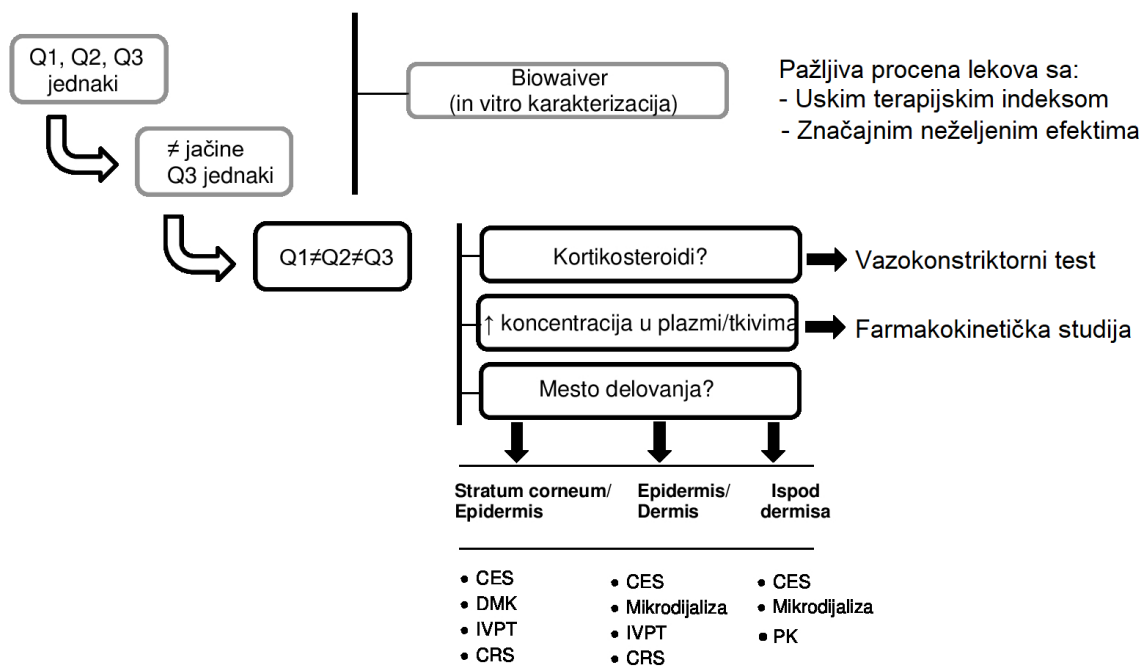
Kako bi se pojednostavio razvoj visoko kvalitetnih i pristupačnijih generičkih preparata za primenu na koži, tokom poslednjih nekoliko godina intenzivno se radi na razvoju alternativnih modela/pristupa za dokazivanje terapijske ekvivalentnosti i obezbeđivanje bezbednih i efikasnih lekova na tržištu. Naime, očekuje se da alternativni modeli omoguće brzu, jeftiniju, reproducibilniju procenu potencijalnih razlika u ispitivanim formulacijama. Drvo odluke „Strašilo“ (engl., *the Strawman decision tree*) i TCS sistem klasifikacije za lekove namenjene za primenu na koži (engl., *topical drug classification system*) su primeri kombinovanih napora regulatornih agencija, farmaceutske industrije i akademije u definisanju predloga alternativnih modela/pristupa za dokazivanje terapijske ekvivalentnosti.

### **1.7.1 Drvo odluke *Strawman***

Na osnovu zaključaka radionice „*Evaluation of Topical Drug Products—Current Challenges in Bioequivalence, Quality, and Novel Assessment Technologies*” (mart 2013. godine, Rokvil, Marilend, USA), sponzorisane od strane Američke asocijacije farmaceutske nauke (AAPS), Evropske federacije farmaceutske nauke (EUFEPS), Internacionalne farmaceutske federacije (FIP) i Američke farmakopeje (USA), predložen je pristup, baziran na aktuelnim naučnim saznanjima, za pojednostavljivanje razvoja, registracije i konačnog odobrenja generičkog leka za primenu na koži. Umesto

tradicionalno korišćenog “one-size fits all” modela u proceni bioekvivalencije koji se smatra zastarelim, predlaže se primena višestranog pristupa prilagođenog leku, bolesti i karakteristikama preparata (Yacobi i sar., 2014; Raney i sar., 2015). Prema predloženom *Strawman* drvetu odluke, procenu bioekvivalencije treba započeti razmatranjem kvalitativnog (Q1) i kvantitativnog (Q2) sastava i mikrostrukture (Q3) ispitivanog generičkog leka u odnosu na odgovarajući referentni lek, uključujući i mesto delovanja (slika 1.6) (Miranda i sar., 2018b; Yacobi i sar., 2014).

Ukoliko su Q1 i Q2 identični, procenu istovetnosti mikrostrukture (Q3) moguće je sprovesti in vitro testovima (in vitro ispitivanjem brzine oslobađanja). Ukoliko nema značajnih razlika u mikrostrukтури (potvrđena Q3 jednakost), nije neophodno sprovođenje in vivo studija. Međutim, posebnu pažnju treba posvetiti lekovima sa malim terapijskim indeksom i/ili značajnim neželjenim efektima, kao i lekovima kod kojih postoje specifični zahtevi u pogledu bezbednosti (Miranda i sar., 2018b; Yacobi i sar., 2014).



**Slika 1.6.** Šematski prikaz predloženog *Strawman* drveta odluke u proceni bioekvivalencije preparata za primenu na koži (prilagođeno iz Yacobi i sar., 2014 i Miranda i sar., 2018b) (CES – kliničke studije; DMK – dermofarmakokinetičke studije; IVPT – in vitro ispitivanje permeacije; CRS – konfokalna Raman spektroskopija)

Ukoliko nisu ispunjeni zahtevi za Q1 i Q2 jednakost, neophodno je sprovođenje dodatnih testova za procenu terapijske ekvivalentosti ispitivanog generičkog leka sa odgovarajućim referentnim lekom. U tom smislu, u skladu sa predloženim *Strawman* drvetom odluke, razlikuju se 3 slučaja:

A) Ukoliko lekovita supstanca potiče iz grupe kortikosteroida, može se koristiti in vivo vazokonstriktorni test.

B) Ukoliko se nakon primene na kožu postižu značajne koncentracije leka u plazmi, mogu se sprovoditi klasične in vivo farmakokinetičke studije. Međutim, treba imati na umu da ovaj tip ispitivanja nije primenljiv u najvećem broju slučajeva, jer većina lekovitih supstanci primenjenih na koži ostvaruje lokalni efekat (Yacobi i sar., 2014). Retki su primeri uspešno sprovedenih farmakokinetičkih studija: lidokain/prilokain krem, diklofenak emulgel, formulacije adapalena (Miranda i sar., 2018b).

C) Ukoliko nije moguće sprovesti odgovarajuća farmakokinetička ili farmakodinamska ispitivanja, treba razmotriti druge metode za procenu bioekvivalencije. Komparativne kliničke studije mogu se uvek sprovoditi, bez obzira na mesto delovanja lekovite supstance. Ukoliko je mesto delovanja lekovite supstance SC, kao alternativne metode za procenu biološke ekvivalencije su mogu koristiti in vitro ispitivanje permeacije, dermofarmakokinetički metod ili konfokalna Raman spektroskopija. Za lekovite supstance čije mesto delovanja je epidermis, in vitro ispitivanje permeacije se može sprovoditi kao dopuna kliničkim studijama, ili se kao alternativne metode mogu koristiti mikrodijaliza ili konfokalna Raman spektroskopija. Za lekovite supstance sa mestom delovanja u dermisu, mogu se koristiti kliničke studije ili mikrodijaliza, dok u slučaju lekovitih supstanci sa mestom delovanja ispod dermisa, mogu se sprovoditi kliničke studije, mikrodijaliza odnosno, odgovarajuća farmakokinetička ispitivanja (Yacobi i sar., 2014).

Na kraju, važno je napomenuti da su preparati različite jačine, iako ne ispunjavaju u potpunosti kriterijume za Q2 jednakost, pogodni za *biowaiver* (nije potrebno sprovođenje odgovarajućih in vivo ispitivanja). Kako se preparati različite jačine razlikuju samo u količini lekovite supstance (sastav formulacije i proizvodni proces su potpuno identični), ukoliko postoje odgovarajući dokazi o proporcionalnom ili pseudoproporcionalnom oslobađanju/permeaciji (dobijeni in vitro ispitivanjem brzine

oslobađanja/permeacije), nisu potrebne studije biološke ekvivalencije (Miranda i sar., 2018b; Shah i sar., 2015) .

### **1.7.2 TCS sistem klasifikacije za preparate za primenu na koži**

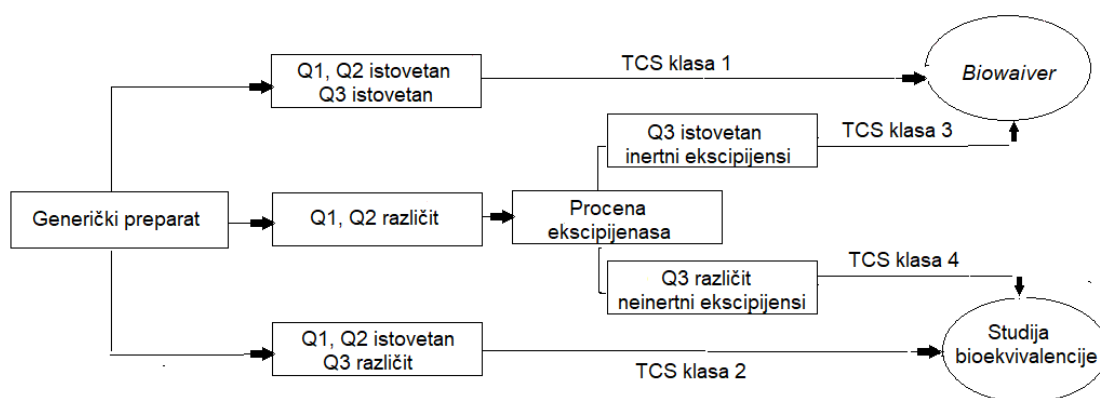
Pored predloženog *Strawman* drveta odluke u čijoj osnovi je analiza specifičnosti ispitivanog preparata, grupa autora koju predvodi čuveni dr Vinod Shah predložila je komplementarni pristup baziran na sistemu klasifikacije za lekove namenjene za primenu na koži (engl., *Topical drug classification system*, TCS sistem). Predloženi TCS sistem odgovara biofarmaceutskom sistemu klasifikacije (BCS sistem) za čvrste farmaceutske oblike. Međutim, za razliku od BCS sistema baziranog na karakteristikama lekovite supstance (rastvorljivost u vodi i intestinalna permeabilnost), u osnovi TCS sistema je procena kvalitativnog (Q1) i kvantitativnog (Q2) sastava i in vitro brzine oslobađanja (pokazatelj mikrostrukturne jednakosti, Q3) preparata koje se porede (generički lek vs. referentni lek) (Shah i sar., 2015). U zavisnosti od prirode i količine, ekscipijensi preparata za primenu na koži mogu značajno da utiču na brzinu oslobađanja, barijerne osobine kože i penetraciju leka u/kroz kožu, te tako direktno određuju brzinu i obim isporuke leka na mesto delovanja. Stoga, na osnovu sastava i brzine oslobađanja, ispitivani preparati se mogu klasifikovati u četiri grupe, kao TCS klasa 1, 2, 3 i 4 (TCS klase 1 i 3 ispunjavaju uslove za *biowaiver*, dok u slučaju TCS klasa 2 i 4, neophodno je sprovođenje odgovarajućih in vivo studija bioekvivalencije) (slika 1.7) (Shah i sar., 2015):

1) TCS klasa 1: Ukoliko je ispitivani generički lek Q1 i Q2 identičan referentnom leku i nema značajnih razlika u brzini oslobađanja lekovite supstance (Q3) ispunjeni su uslovi za *biowaiver*, tj., realno je očekivati da se ispitivani generički lek neće značajno razlikovati u odnosu na referentni lek. Drugim rečima, ukoliko je ispitivani generički lek Q1, Q2 i Q3 ekvivalentan referentnom leku nije potrebno dokazivati terapijsku ekvivalentnost kliničkim studijama. TCS klasa 1 odgovara definiciji za nivo 1 promena prema SUPAC-SS vodiču (1997).

2) TCS klasa 2: Ukoliko je ispitivani generički lek Q1 i Q2 identičan referentnom leku, ali se značajno razlikuju in vitro brzine oslobađanja lekovite supstance (Q3 različit), *biowaiver* se ne može odobriti, te je neophodna odgovarajuća in vivo studija za procenu bioekvivalencije.

3) TCS klasa 3: Ukoliko je ispitivani generički lek Q1 i Q2 različit od referentnog leka, neophodna je procena ekscipijenas, da li su inertni/indiferentni ili ne. Tačnije, neophodno je proceniti bezbednost i efikasnost upotrebljenih ekscipijenas, odnosno da li ekscipijensi utiču na termodinamičku aktivnost lekovite supstance i/ili permeabilnost kože. Takođe, neophodno je odrediti in vitro brzinu oslobađanja lekovite supstance. Ukoliko su ekscipijensi inertni, i nema značajnih razlika u in vitro brzini oslobađanja, smatra se da su ispunjeni uslovi za *biowaiver*. Međutim, treba napomenuti da je predloženi TCS sistem dominantno baziran na SUPAC-SS vodiču (1997), te se promena maksimalno 10% jednog ili svih ekscipijensa u formulaciji smatra prihvatljivom. Ukoliko su promene u sastavu formulacije veće od navedenih, onda je neophodno razmotriti njihov in vivo značaj (Miranda i sar., 2018b).

4) TCS klasa 4: Ukoliko je ispitivani generički lek Q1 i Q2 različit u odnosu na referentni lek i ukoliko se značajno razlikuju in vitro brzine oslobađanja lekovite supstance (Q3 različit), *biowaiver* se ne može odobriti, odnosno, odgovarajuća in vivo studija je neophodna za procenu bioekvivalencije.



**Slika 1.7.** Šematski prikaz predloženog TCS sistema klasifikacije (prilagođeno iz Shah i sar., 2015 i Miranda i sar., 2018b)

Na osnovu navedenog, jasno je da se prema TCS sistemu, in vitro ispitivanje brzine oslobađanja smatra ključnim testom u postupku procene bioekvivalencije. Ukoliko se uoče značajne razlike u *in vitro* brzini oslobađanja, in vivo studije su neophodne za procenu uticaja formulacije na isporuku leka u/kroz kožu, te se predlaže primena



alternativnih metoda, opisanih *Strawman* drvom odluke. Drugim rečima, TCS sistem, baziran na proceni Q1, Q2 i Q3 sličnosti/razlike, predstavlja specifikaciju prvog nivoa *Strawman* drveta odluke. Oba opisana pristupa –*Strawman* drvo odluke i TCS sistem – smatra se da bi omogućila brži razvoj i odobrenje generičkog leka, uz istovremeno obezbeđivanje adekvatne efikasnosti i bezbednosti preparata za primenu na koži (Shah i sar., 2015; Miranda i sar., 2018b).

## **1.8 Trenutni stavovi vodećih svetskih regulatornih agencija o proceni bioekvivalencije preparata za primenu na koži**

### **1.8.1 Američka agencija za hranu i lekove (FDA)**

Od 2007. godine, u cilju pojednostavljenja razvoja i obezbeđivanja bezbednih i pristupačnijih generičkih lekova na tržištu, FDA konstanto izdaje neobavezujuće vodiče specifične za određene preparate (engl., *non-binding product-specific guidances*). Cilj ovih vodiča je da se identifikuju testovi koje treba sprovesti prilikom razvoja i podnošenja zahteva za odobrenje generičkog leka (US-FDA, 2019; Miranda i sar., 2018b). Usled kompleksnosti i brojnih problema udruženih sa kliničkim studijama, tokom poslednje dve do tri godine, FDA za određene preparate prihvata primenu alternativnih metoda u proceni bioekvivalencije. Interesantno, u najvećem broju slučajeva, FDA predlaže fiksnu metodu za procenu bioekvivalencije (grupa A), dok za određene preparate, aplikanti mogu da odaberu jednu od nekoliko predloženih alternativa za procenu bioekvivalencije (grupa B). U grupi A, u više od 50% slučajeva, FDA zahteva sprovođenje kliničkih studija kako bi se potvrdila terapijska ekvivalentnost. Ipak, na primeru 0,1% i 0,04% tretinoin gela, ističe značaj in vitro ispitivanja permeacije primenom *dermatomed* kože, u potvrdi farmaceutske ekvivalentnosti. U ostalim slučajevima, FDA zahteva isključivo primenu vazokonstriktornog testa (kortikosteroidi) ili farmakokinetičkih studija (< 4% slučajeva u kojim se postižu značajne koncentracije lekova u plazmi). U manje od 7 % slučajeva, nije potrebno sprovođenje studija za procenu bioekvivalencije (uglavnom tečni preparati za primenu na koži). Međutim, važno je istaći da se uočava sve veći broj preparata koji mogu biti odobreni samo na osnovu adekvatne fizičko-hemijske karakterizacije in vitro (Miranda i sar., 2018b). Fizičko-hemijskom karakterizacijom analiziraju se

karakteristike generičkog leka koje su posledica jedinstvene formulacije i proizvodnog procesa (Fisher i sar., 2016). U tom smislu, predlaže se komparativna analiza: izgleda, reoloških karakteristika na različitim brzinama smicanja, veličine i distribucije veličine čestica leka, pH vrednosti, aktivnosti vode i drugih relevantnih testova koji su pogodni za potvrdu fizičke i strukturne sličnosti. Važno je napomenuti da se zahteva sprovođenje fizičko-hemijske karakterizacija na minimum 3 serije generičkog i odgovarajućeg referentnog leka (Miranda i sar., 2018b). Za preparate u grupi B, navodi se korišćenje testova za in vitro ispitivanje brzine oslobađanja/permeacije kao prve opcije, a gde je moguće, dodatno se sprovode i farmakokinetička ispitivanja. Kao druga opcija, obično se navode kliničke studije ili odgovarajući farmakodinamski testovi (Miranda i sar., 2018b). Međutim, na osnovu navedenog, važno je naglasiti da, trenutno, FDA daje predlog metoda za procenu bioekvivalencije na „*case by case*“ osnovi, što rezultuje objavljivanjem vodiča specifičnih za određene preparate.

Takođe, treba napomenuti da FDA, usled kompleksnosti polučvrstih preparata za primenu na koži, ističe „*Quality by design*“ (QbD) kao deo koncepta nove inicijative zasnovane na proceni rizika pod nazivom „Farmaceutska Dobra proizvođačka praksa za 21. vek: pristup zasnovan na proceni rizika“ (engl., „*Pharmaceutical cGMPs for the 21st Century: A Risk-Based Approach*“). Osnovna pretpostavka QbD pristupa je da se kvalitet preparata ne može testirati, već se kvalitet preparata obezbeđuje razumevanjem polaznih materijala, formulacije i proizvodnog procesa. U tradicionalnom pristupu koji podrazumeva „*quality by testing*“, veličina uzorka u svakoj fazi testiranja je obično nedovoljna da se osiguraju prihvatljivi atributi kvaliteta cele serije. Stoga, kvalitet treba da bude dizajniran u preparat na osnovu sistematskog razumevanja kako kritični atributi materijala (lekovita supstanca i ekscipijensi) i kritični procesni parametri korišćeni tokom proizvodnog procesa utiču na kritične attribute kvaliteta preparata, korišćenjem QbD alata (kao što su analiza rizika, dizajn eksperimenata i procesne analitičke tehnologije) i posledično, uspostavljanjem strategije kontrole kvaliteta. QbD počinje definisanjem ciljnog profila kvaliteta proizvoda (engl., *quality target product profile*) (QTTP) koji obuhvata parametre kvaliteta koje bi idealno trebalo postići na poslednjem nivou razvoja i proizvodnje preparata, uzimajući u obzir njegovu efikasnost i bezbednost. Tokom razvoja generičkog leka, u cilju definisanja QTTP-a, treba sprovesti fizičko-hemijsku karakterizaciju referentnog leka, analizu pakovanja i označavanja.

Sledeći korak predstavlja definisanje kritičnih atributa kvaliteta (engl., *critical quality attributes*, CQA), kao podskup QTTP-a, koji direktno zavise od sastava formulacije i primenjenih procesnih parametara i koje treba strogo pratiti tokom razvoja, kako bi se obezbedila sličnost mikrostrukture sa referentnim lekom (Chang i sar., 2013a; Simões i sar., 2018).

U cilju razvoja odgovarajućih vodiča za industriju koji bi omogućili pojednostavljen razvoj i odobrenje generičkih preparata za primenu na koži, FDA, tokom nekoliko poslednjih godina sponzoriše različite projekte koji imaju za cilj definisanje atributa kvaliteta i performansi koji na najbolji način karakterišu preparate za primenu na koži i koji su potencijalno kritični za njihove terapijske performanse. Drugim rečima, kako bi se obezbedilo adekvatno poređenje generičkog i referentnog leka, neophodno je definisati 1) attribute kvaliteta koje treba pratiti kako bi se detektovale eventualno prisutne razlike u mikrostrukтури, 2) tehnike koje treba koristiti za merenje odabranih CQA i posebno, 3) kako treba interpretirati dobijene rezultate i 4) nastojati da se koreliraju promene u CQA sa odgovarajućim promenama u relativnoj biološkoj raspoloživosti (Chang i sar., 2013a,b; Murthy, 2016; Shanley, 2016; US-FDA, 2017a,b). Trenutno, kao CQA izdvajaju se: organoleptički izgled, pH vrednost, veličina kapi, veličina čestica lekovite supstance, reološko ponašanje, gustina, polimorfni oblik lekovite supstance, odnos rastvornog i nerastvornog oblika leka, aktivnost vode, in vitro brzina oslobađanja i drugi, ali eksperti u ovoj oblasti još uvek nisu kreirali konačnu listu CQA (Chang i sar., 2013a,b; Murthy, 2016). Razumevanje odnosa između CQA koji definišu mikrostrukturu preparata, njihovih in vitro/in vivo performansi kao i potencijalnih neuspeha koji potiču od razlika u CQA smatra se da će omogućiti efikasno poređenje ispitivanog generičkog leka sa odgovarajućim referentnim lekom (Shanley, 2016).

Dalje, u slučajevima u kojima je uticaj formulacionih i procesnih varijabli na CQA ispitivanog generičkog leka dobro okarakterisan i za koje je potvrđeno da su ekvivalentni atributima kvaliteta referentnog leka, intenzivna istraživanja su usmerena ka proceni da li se bioekvivalencija može uspostaviti objedinjavanjem sveobuhvatnih dokaza koji se odnose na kvalitet preparata i njegove performanse, primenom različitih in vitro/in vivo tehnika baziranih na farmakokinetici (in vitro ispitivanje permeacije primenom izolovane humane kože, *tape stripping*, mikrodijaliza/dermalna *open flow*

mikroperfuzija) (US-FDA, 2017a,b). Prednost primene kombinovanog pristupa u proceni bioekvivalencije zasniva se na činjenici da sve navedene metode poseduju određena ograničenja, te se informacije dobijene primenom jedne metodologije, mogu dopuniti primenom neke druge metode. U tom smislu, sve češće se izdvaja primena in vitro ispitivanja permeacije kroz izolovanu humanu kožu, samostalno ili u kombinaciji sa drugim metodama, jer novije studije ukazuju da se primenom ove metodologije mogu detektovati eventualno prisutne razlike u brzini i obimu isporuke lekovite supstance kroz kožu iz različitih formulacija, kao i da dobijeni podaci koreliraju na zadovoljavajući način sa podacima dobijenim in vivo, na humanim ispitanicima. Međutim, važno je napomenuti da je zadovoljavajuća korelacija između rezultata dobijenih in vitro ispitivanjem permeacije i odgovarajućih in vivo podataka za sada potvrđena samo u slučaju transdermalne isporuke ispitivanih supstanci. Još uvek nema podataka koji ukazuju da se primenom ove tehnike mogu detektovati eventualno prisutne male razlike u lokalnoj (dermalnoj) isporuci leka, u različitim slojevima kože. Stoga, potencijalno ograničenje in vitro ispitivanja permeacije primenom izolovane humane kože može se kompenzovati primenom neke druge metode, mikrodijalize ili *tape stripping*-a kojima se, direktno ili indirektno, određuje sadržaj leka u koži (Lehman i sar., 2013; Raney i sar., 2015).

### **1.8.2 Evropska agencija za lekove (EMA)**

U Evropi, prilikom podnošenja zahteva za registraciju generičkih lekova za primenu na koži, uobičajeno se primenjuje procedura međusobnog priznavanja, odnosno decentralizovana procedura putem bibliografske aplikacije, u skladu sa članom 10a Direktive 2001/83/EC. Ovaj postupak se može primeniti za lekove koji se nalaze na tržištu Evropske unije minimum tokom deset poslednjih godina, sa potvrđenom efikasnošću i zadovoljavajućim nivoom bezbednosti. Podnosilac zahteva treba da dokaže bezbednost i efikasnost svog leka u predloženim indikacijama, na osnovu prethodno publikovanih prekliničkih i kliničkih podataka (European Council, 2001; Miranda i sar., 2018b). Sa druge strane, hibridna aplikacija se koristiti: 1) kada nije zadovoljena striktna definicija generičkog leka, 2) kada se studije biološke raspoloživosti ne mogu koristiti za dokazivanje bioekvivalencije (što je slučaj sa najvećim brojem preparata namenjenih za primenu na koži), 3) kada postoje promene u

aktivnoj supstanci (supstancama), jačini, terapijskoj indikaciji, farmaceutskom obliku ili načinu primene generičkog leka u odnosu na odgovarajući referentni lek. U navedenim slučajevima, podnosilac zahteva može da koristi prekliničke i kliničke studije referentnog leka; ipak, trebalo bi sprovesti dodatna ispitivanja za odobrenje stavljanja leka u promet (European Council, 2001; Miranda i sar., 2018b). Međutim, analizom Evropskih izveštaja o proceni hibridnih aplikacija može se uočiti da regulatorna tela izdaju odobrenje za stavljanje leka u promet i bez odgovarajućih kliničkih studija. Na primer, preparat Grinvix<sup>®</sup> (dimetinden maleat gel) odobren je na osnovu podataka o farmaceutskoj ekvivalenciji sa referentnim lekom Fenistil<sup>®</sup>. Svakako treba spomenuti i primere procene bioekvivalencije primenom in vitro ispitivanja permeacije/oslobađanja u kombinaciji sa odgovarajućim kliničkim, odnosno farmakokinetičkim studijama (diklofenak gel/sprej, lidokain/prilokain krem i slično) (Miranda i sar., 2018b). Međutim, važno je istaći da je, trenutno, primena alternativnih metoda za procenu bioekvivalencije u Evropskoj uniji daleko manje zastupljena u odnosu na SAD, jer se zahtevi za odobrenje generičkih preparata za primenu na koži retko podnose centralizovanom procedurom.

Kao posledica, u cilju efikasne procene kvaliteta i terapijske ekvivalentnosti preparata za primenu na koži, nakon koncepta vodiča donetog 2014. godine (EMA, 2014a), 2018. godine objavljen je nacrt vodiča (engl., *Draft guideline on quality and equivalence of topical products*) (EMA, 2018). Usled kompleksnosti formulacija za primenu na koži, predloženi nacrt vodiča ne daje jedinstvenu proceduru za karakterizaciju, već samo uopštene preporuke, koje treba prilagoditi ispitivanom preparatu („*case-by-case*“). S obzirom na brojna ograničenja kliničkih studija, nacrt vodiča daje predlog metoda i studija koje se mogu koristiti nezavisno za procenu ekvivalentnosti u pogledu i) kvaliteta, ii) efikasnosti i iii) bezbednosti, a koje posmatrane istovremeno treba da pruže odgovarajući dokaz o terapijskoj ekvivalentnosti sa odgovarajućim referentnim lekom, u slučajevima kada je način primene isti i rizik od neekvivalentnosti minimalan za pacijente.

Prema predloženom nacrtu vodiča (EMA, 2018), smernice za kvalitet se primenjuju prilikom nove aplikacije za odobrenje stavljanja leka u promet, kao i u slučaju izmena nakon odobrenja, dok se smernice za ispitivanje ekvivalentnosti preparata primenjuju radi potvrde tvrdnji o terapijskoj ekvivalentnosti sa postojećim lekom na tržištu (umesto

tradicionalno korišćenih kliničkih studija). U slučaju jednostavnih formulacija dovoljno je dokazivanje ekvivalentnosti u pogledu kvaliteta (proširena farmaceutska ekvivalentnost), dok kompleksne formulacije ili prisustvo ekscipijenasa koji mogu da utiču na biološku raspoloživost i/ili terapijske performanse, zahtevaju sprovođenje odgovarajućih testova za procenu kinetike permeacije, odnosno, odgovarajućih farmakodinamskih testova (ekvivalentnost u pogledu efikasnosti). Međutim, važno je napomenuti da su kliničke studije za potvrdu terapijske ekvivalentnosti neophodne u slučajevima kada:

- 1) lekovita supstanca ima uzak terapijski indeks
- 2) preparati sa dozno-zavisnom sistemskom toksičnošću (izuzetak slučajevi u kojima je ekvivalentno sistemsko izlaganje dokazano konvencionalnim farmakokinetičkim studijama)
- 3) ukoliko nije utvrđena/nije razumljiva brzina oslobađanja, difuzije, odnosno kinetika permeacije, kojom aktivna supstanca stiže na mesto delovanja u koži/potkožnom tkivu
- 4) način primene nije isti
- 5) nije moguće u potpunosti okarakterisati ispitivani preparat u pogledu atributa kvaliteta (npr. usled kompleksnog sastava ili metodoloških ograničenja)
- 6) nije moguće kvantitativno odrediti kinetiku permeacije ili farmakodinamski efekat (npr. usled ograničene difuzije ili neosetljivosti testa)
- 7) in vitro i in vivo testovi za ispitivanje kinetike permeacije ili farmakodinamskog efekta nisu primenljivi ili ne mogu dovoljno pouzdano da ukažu na klinički odgovor (npr. preparati za tretman rana i čireva).

Ukoliko se procena ekvivalentnosti ispitivanog generičkog leka sa odgovarajućim referentnim lekom vrši komparativnim poređenjem podataka o kvalitetu (**proširena farmaceutska ekvivalentnost**), prema nacrtu vodiča, treba sprovesti uporednu analizu farmaceutskog oblika, kvalitativnog i kvantitativnog sastava, mikrostrukture/fizičkih osobina, performansi (npr. in vitro brzina oslobađanja) i načina primene. Ukoliko su u sastavu formulacije prisutni isparljivi rastvarači, treba dodatno uporediti transformaciju preparata tokom primene. S obzirom na značajne izvore varijabilnosti, treba sprovesti uporedna ispitivanja minimum tri serije, sa minimum 12 jedinica po seriji. U zavisnosti od farmaceutskog oblika zahteva se:

- određivanje veličine i distribucije veličina čestica lekovite supstance i polimorfnog oblika, uključujući i fotomikrografije (za preparate tipa suspenzije).
- određivanje veličine kapi i distribucije kapi po veličini, uključujući i fotomikrografije (za preparate tipa emulzija). Analizu veličine čestica treba sprovesti primenom različitih metoda, ukoliko je moguće laserskom difrakcijom, *Raman chemical imaging* i mikroskopijom.
- procena izgleda vizuelno i sa fotomikrografijama (posebno značajno za disperzne sisteme).
- karakterizacija mikrostrukture/fizičkih osobina, odnosno fizičkih CQA koji utiču na biološku raspoloživost i način primene ili mogu da ukažu na varijabilnost u proizvodnom procesu ili promene tokom čuvanja. U slučaju rastvora treba određivati pH, puferski kapacitet, viskozitet, gustinu, površinski napon i osmolalnost, a za polučvrste preparate pH, gustinu i reološke osobine.
- procena performansi prevashodno in vitro ispitivanjem brzine oslobađanja, ili eventualno, in vitro ispitivanjem permeacije kroz izolovanu humanu kožu.

Prema nacrtu vodiča (EMA, 2018), generički preparat se može smatrati terapijski ekvivalentnim referentnom preparatu ukoliko su ispunjeni sledeći kriterijumi za proširenu farmaceutsku ekvivalentnost:

- isti farmaceutski oblik, isti oblik lekovite supstance (suspendovana/rastvorena)
- isti sadržaj lekovite supstance
- generalno, isti kvalitativni i kvantitativni sastav formulacije, ali su dozvoljeni određeni izuzeci:

- ekscipijensi koji mogu da utiču na rastvorljivost lekovite supstance, termodinamičku aktivnost/biološku raspoloživost/performanse moraju biti kvalitativno isti.
- nominalni kvantitativni sastav ekscipijenasa treba da bude isti, odnosno razlike u sastavu ne smeju biti veće od  $\pm 5\%$ .
- dozvoljene su razlike u ekscipijensima čija funkcija nije povezana sa performansama preparata (npr. antioksidansi, konzervansi, boje) ili homologa parafina (novi ekscipijens ne sme da utiče na lokalnu podnošljivost ili bezbednost).

– dozvoljene su kvantitativne razlike (ne više od 10%) za ekscipijense koji ne utiču na rastvorljivost lekovite supstance, termodinamičku aktivnost, biološku raspoloživost, performanse (npr. antioksidansi, konzervansi, boje).

- Za kvantitativne karakteristike kvaliteta, 90% interval poverenja za razlike između test i referentnog preparata treba da bude u opsegu  $\pm 10\%$  u odnosu na referenti preparat, pod pretpostavkom da su podaci normalno distribuirani. Kvalitativne karakteristike kvaliteta treba da budu u osnovi iste.
- Način primene ispitivanog generičkog preparata treba da bude identičan referentnom preparatu, odnosno treba da omogući postizanje iste koncentracije lekovite supstance na mestu primene.

Sa druge strane, ukoliko je potrebno sprovesti procenu **ekvivalentnosti u pogledu efikasnosti** (kompleksne formulacije/prisustvo ekscipijenasu koji mogu da utiču na performanse), umesto kliničkih terapijskih studija, predlaže se korišćenje metoda za procenu kinetike permeacije (in vitro ispitivanja permeacije kroz izolovanu humanu kožu, *tape stripping* tehnika ili farmakokinetičke studije) ili primena farmakodinamskih testova (vazokonstriktorni test za kortikosteroide ili antimikrobni testovi). Za svaku od metoda, u odgovarajućim aneksima, nacrt vodiča daje smernice kako treba sprovesti ispitivanja, kako validirati metodu, kako predstaviti i interpretirati dobijene rezultate. Interesantno, za razliku od FDA koja mikrodijalizu smatra obećavajućom tehnikom za procenu dermalne raspoloživosti (US-FDA, 2017a, b), EMA ističe da potencijali primene mikrodijalize ili konfokalne Raman spektroskopije nisu dovoljno istraženi, te se ne mogu primenjivati samostalno za procenu bioekvivalencije, ali se mogu koristiti kao dodatne metode. Uslovi navedenih ispitivanja treba da budu standardizovani kako bi se na minimum smanjila varijabilnost (predlaže se sprovođenje pilot studija). Posebnu pažnju treba posvetiti aplikaciji uzoraka (masa lekovite supstance, površina na kojoj se vrši aplikacija, masa/zapremina preparata), u skladu sa sažetkom karakteristika leka. Trajanje studija treba da bude dovoljno da se omogući kvantitativno praćenje difuzije lekovite supstance u/kroz kožu, ali ujedno i ograničeno, kako bi se minimizirale promene u eksperimentalnim uslovima koje mogu da dovedu do promena u kinetičkim profilima (npr. deskvamacija, gubitak integriteta kože, povratna difuzija, slučajni gubitak ili transfer doze). Takođe, in vitro ispitivanje permeacije kroz kožu i *tape stripping* tehnika treba da uključe i negativnu kontrolu koja nije ekvivalenta ispitivanom



i poredbenom leku. Generički preparat se može smatrati terapijski ekvivalentnim referentnom preparatu ukoliko je 90% interval pouzdanosti za odnos test i poredbenog leka u opsegu 80,00–125,00%. U slučaju lekova niske jačine i ograničene permeabilnosti, usled velike inter- i intraindividualne varijabilnosti dozvoljen je širi interval 69,84 – 143,19% (EMA, 2018).

Konačno, što se tiče **ekvivalentnosti u pogledu bezbednosti**, nacrt vodiča ističe da se bezbednost i lokalna podnošljivost test preparata mogu garantovati detaljnim podacima o lekovitoj supstanci i izborom dobro poznatih ekscipijenasa. Ekvivalentnost u pogledu kvaliteta, ukoliko je pokazana, predstavlja dokaz o bezbednosti i lokalnoj podnošljivosti. Dodatno, ispitivanje kinetike permeacije treba da pokaže da ista količina aktivne supstance dospeva na mesto delovanja ili u sistemsku cirkulaciju, kao nakon primene referentnog leka. Ukoliko lekovita supstanca pokazuje značajnu sistemsku raspoloživost, studije bioekvivalencije pružaju dokaz o efikasnosti i o bezbednosti (EMA, 2018).

## **1.9 Metode za procenu kinetike permeacije – nova saznanja i preporuke**

### **1.9.1 In vitro ispitivanje permeacije kroz kožu**

In vitro ispitivanje permeacije primenom izolovane kože je jednostavan i relativno jeftin test za određivanje brzine permeacije lekovite supstance kroz kožu (Miranda i sar., 2018a). Primenom izolovane kože, posebno humane, blisko se oponašaju in vivo uslovi, jer SC, kao primarna barijera za transport lekovite supstance u/kroz kožu, zadržava svoje barijerne osobine nakon izolovanja sa tela (Raney i sar., 2015). Brojne studije su potvrdile da rezultati dobijeni primenom in vitro ispitivanja permeacije (1) dobro koreliraju sa vrednostima brzine i stepena isporuke leka in vivo, odnosno (2) dovode do istog zaključka o prisustvu/odsustvu bioekvivalencije kao i odgovarajuće kliničke studije sprovedene in vivo, odnosno (3) mogu da ukažu na razlike u brzini i obimu isporuke lekovite supstance kroz kožu iz različitih formulacija (Raney i sar., 2015; Yacobi i sar., 2014). Kao rezultat, nekoliko vodiča predlaže primenu ove metodologije i to u cilju 1) procene rizika agrohemikalija (EFSA, 2012), 2) procene biološke raspoloživosti dermalnih preparata (OECD, 2010), kao i 3) proizvoda sa širokim područjem primene (OECD, 2004). OECD vodič za sprovođenje studija apsorpcije kroz

kožu (OECD, 2004) i SCCS/1602/18 daju smernice za in vitro ispitivanje permeacije sastojaka kozmetičkih proizvoda. Kao što je već naglašeno, FDA u vodičima specifičnim za određene preparate namenjene primeni na koži (npr. aciklovir krem) navodi mogućnost primene in vitro ispitivanja permeacije u proceni bioekvivalencije. Takođe, prema vodiču „*Guideline on quality of transdermal patches*“, in vitro ispitivanje permeacije je integralni deo kontrole kvaliteta transdermalnih flastera (EMA, 2014b). Nacrtom vodiča iz 2018. godine ovo ispitivanje dobija značajnu ulogu u proceni kvaliteta i ekvivalentnosti polučvrstih preparata za primenu na koži (EMA, 2018). Međutim, važno je napomenuti i da druge regulatorne agencije širom sveta (tabela 1.2) odobravaju primenu ove metodologije u proceni bioekvivalencije preparata za primenu na koži.

**Tabela 1.2.** Regulatorno prihvaćene metode u proceni bioekvivalencije preparata za primenu na koži (prilagođeno iz Braddy i sar., 2015; EMA, 2018; US-FDA, 2019)

Međunarodne regulatorne agencije i organizacije	Kliničke studije	PD studije*	PK studije*	In vivo DPK studije*	In vitro studije	Biowaiver (rastvori)
Australija	✓	✓	✓		✓ <sup>a</sup>	✓
Kanada	✓	✓	✓			✓
Kina	✓	✓				
EMA	✓	✓	✓	✓	✓ <sup>a</sup>	✓
Japan	✓	✓	✓	✓	✓	
Novi Zeland	✓	✓				✓
Singapur	✓	✓	✓			✓
Južna Afrika	✓	✓	✓	✓	✓ <sup>a</sup>	✓
Švajcarska	✓	✓	✓		✓ <sup>a</sup>	✓
WHO	✓	✓	✓	✓	✓	✓
FDA	✓	✓	✓		✓ <sup>a</sup>	✓

\* PD studije – farmakodinamske studije; PK – farmakokinetičke studije; DPK studije–dermofarmakokinetičke studije, <sup>a</sup> – zemlje u kojima se in vitro ispitivanje permeacije može samostalno koristiti za procenu bioekvivalencije (u ostalim se primenjuje kao potvrda in vivo studijama)

In vitro ispitivanje permeacije sprovodi se primenom vertikalnih difuzionih ćelija koje omogućavaju održavanje fiziološke temperature (32 °C) i hidratacije kože postavljane između donorskog i akceptorskog dela. Izolovana humana koža se smatra „zlatnim

standardom“ za in vitro ispitivanje permeacije (EMA, 2018; US-FDA, 2017a,b). Međutim, dovoljne količine humane kože veoma je teško obezbediti, jer se dobijaju od donora koji se podvrgavaju plastičnoj hirurgiji. Stoga, za potrebe in vitro ispitivanja permeacije može se koristiti i koža drugih vrsta (svinja, glodari (najčešće pacovi), zamorci), ali se dominantno koristi koža uha svinje, pre svega zbog sličnosti sa humanom kožom u pogledu morfoloških karakteristika i permeabilnosti (EMA, 2014b; Jacobi i sar., 2007; OECD, 2004; Yacobi i sar., 2014). Generalno, različite tehnike se mogu koristiti za pripremu kože (izolovani epidermis, *split/dermatomed* koža, ili koža pune debljine), pri čemu je važno dokazati da tehnika pripreme i uslovi čuvanja kože ne utiču na integritet i barijernu funkciju kože (EMA, 2018). Takođe, važno je istaći da lekovite supstance potencijalno ulaze u sistemsku cirkulaciju u početnim slojevima dermisa, te se prisustvo kompletnog hidrofилnog derma u in vitro uslovima ponaša kao veštačka barijera za slabo rastvorne lekovite supstance, i uslovljava veštačko odlaganje permeacije kroz kožu (EMA, 2018; Pantelić, 2013; Selzer i sar., 2013). Procena integriteta kožne barijere može se vršiti praćenjem permeacije tricijumske vode, merenjem transepidermalnog gubitka vode (TEGV) ili električne impedanse/provodljivosti (EMA, 2014b).

Generalno, količina uzorka koja se aplikuje na površinu kože treba da simulira uslove kliničke primene, odnosno da bude u skladu sa sažetkom karakteristika leka (EMA, 2018; Selzer i sar., 2013, Yacobi i sar., 2014). Uobičajeno se aplikuje 2–15 mg/cm<sup>2</sup>, ukoliko nije drugačije opravdano. Postupak aplikacije uzoraka treba validirati kako bi se obezbedila potrebna reproducibilnost ( $\pm 5\%$ ) i homogeno nanošenje uzorka preko membrane (EMA, 2018). Međutim, tokom razvoja formulacije, mnogo češće se primenjuje tzv. *infinite dose regimen* koji podrazumeva aplikaciju mnogo veće količine uzorka (deplecija lekovite supstance izazvana evaporacijom ili difuzijom u/kroz kožu se smatra zanemarljivom). Na ovaj način, moguće je parametarski okarakterisati proces permeacije i porediti različite formulacije. Međutim, uobičajeno, primena velikih količina uzorka ispoljava okluzivni efekat na koži, što može dovesti do povećane permeabilnosti. Određeni dokazi ukazuju da se okluzivni efekat može javiti i pri primeni uzoraka u tankom sloju (Selzer i sar., 2013).

Odabrani receptorski medijum treba da odgovara fiziološkim uslovima i obezbedi sink uslove za difuziju lekovite supstance kroz kožu. Sink uslovi su postignuti ukoliko

najveća koncentracija permeanta ne prelazi 10% njegove saturacione rastvorljivosti u receptorskom medijumu. U slučaju lekovitih supstanci sa veoma niskom rastvorljivošću, dozvoljeno je da maksimalna koncentracija permeanta bude u opsegu od 10 do 20%, a nekada čak do 30% saturacione rastvorljivosti (Selzer i sar., 2013). Ukoliko je moguće, treba koristiti vodene pufere (idealno, fosfatni pufer pH 7,4). Međutim, u slučaju veoma lipofilnih lekova sa niskom rastvorljivošću, problem se može rešiti dodatkom solubilizatora (npr. surfaktanti), korastvarača (npr. do 50% etanola) ili proteina (npr. do 5% goveđeg serumskog albumina) koji ne utiču na barijernu funkciju kože. Takođe, dozvoljena je upotreba antimikrobnih agenasa (natrijum-azid, formaldehid), kako bi se smanjio rizik od bakteriološke degradacije kožne barijere. Međutim, važno je potvrditi da dodatak antimikrobnog agensa ne utiče na integritet kožne barijere, kao i da ne interferira sa permeantom tokom određivanja (EMA, 2014b; EMA, 2018; Selezer i sar., 2013).

Uzorkovanje receptorskog medijuma treba da bude dovoljno često kako bi se dobili adekvatni profili i održali sink uslovi koji imitiraju klirens koji potiče od dermalne mikrocirkulacije. Preporuka je da in vitro ispitivanje permeacije traje 24h. Ukoliko je neophodno duže vreme ispitivanja, neophodno je potvrditi da je očuvana barijerna funkcija kože i tokom vremena (EMA, 2014b; EMA, 2018; Raney i sar., 2015; Selezer i sar., 2013). Glavni nedostatak in vitro ispitivanja permeacije kroz kožu je visoka inter- i intraindividualna varijabilnost (Raney i sar., 2015; Yacobi sar., 2014). Stoga, predlaže se korišćenje kože sa najmanje 2 (EMA, 2014b), 3 (OECD, 2004), odnosno ne manje od 12 donora i sa najmanje 2 ponavljanja po donoru (EMA, 2018). Na kraju, interesantno je napomenuti da, za razliku od evropskih vodiča, FDA u vodičima specifičnim za određeni preparat, pored preporuka za sprovođenje ovog ispitivanja, daje i preporuke za detaljan postupak validacije metode.

### **1.9.2 Dermofarmakokinetički metod**

Dermofarmakokinetički metod, ili poznatije *tape stripping*, je minimalno invazivna in vivo procedura za određivanje penetracionih profila lekovite supstance kroz SC, kao primarnu barijeru za difuziju u/kroz kožu. Ukratko, ova metoda se zasniva na uklanjanju slojeva SC primenom adhezivnih traka, i sledstveno, određivanju sadržaja lekovite supstance primenom kvantitativne analitičke metode, nakon odgovarajućeg postupka

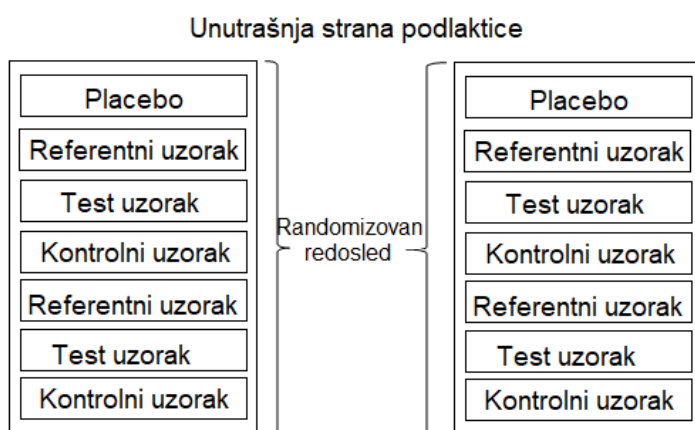
ekstrakcije (Cordery i sar., 2017; Miranda i sar., 2018a; Pantelić, 2013; Russell i Guy, 2009; Selzer i sar., 2013). U slučaju lekovitih supstanci čije primarno mesto delovanja je SC, određivanjem koncentracije u SC tokom vremena, direktno se karakteriše brzina i obim isporuke supstance na mestu delovanja. Za ostale lekovite supstance, pretpostavka je da razlike u brzini i obimu isporuke lekovite supstance na mestu delovanja, u dubljim delovima epidermisa ili u dermisu, potiču od razlika u koncentracionim profilima u SC (Raney i sar., 2015).

Posledično, 1998. godine Kancelarija za generičke lekove FDA predložila je dermatofarmakokinetički metod kao univerzalni metod za procenu bioekvivalencije (US FDA 25 Draft Guidance for Industry, 1998), ali je nacrt vodiča povučen četiri godine kasnije. Ukratko, predloženi protokol je podrazumevao primenu 12 adhezivnih traka za uklanjanje slojeva SC (prve dve trake se odbacuju, a ostalih 10 kombinuju i zajedno analiziraju), kako bi se odredio sadržaj lekovite supstance u SC. Kako bi se uspostavio farmakokinetički profil, predloženo je sprovođenje *tape stripping* na minimum osam test mesta: najmanje četiri mesta za karakterizaciju faze resorpcije i najmanje četiri mesta za fazu eliminacije. Na osnovu zavisnosti količine leka u SC od vremena, odredili bi se farmakokinetički parametri kao što su: površine ispod krive (engl., AUC), maksimalna koncentracija ( $C_{max}$ ) i vreme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije ( $T_{max}$ ). Međutim, predloženi nacrt vodiča je povučen jer su dobijeni kontradiktorni rezultati prilikom ispitivanja komercijalno dostupnih preparata tretinoin gela od strane dve nezavisne laboratorije (Pantelić, 2013; Raney i sar., 2015; Yacobi i sar., 2014). Stoga, nakon 2002. godine, FDA je inicirala pokretanje brojnih studija za identifikaciju i karakterizaciju izvora varijabilnosti i optimizaciju protokola. Kao rezultat, utvrđeno je da se varijabilnost može redukovati a) korišćenjem odgovarajuće tehnike za uklanjanje viška ispitivanog uzorka sa kože, b) uključivanjem prve dve trake u određivanju ukupne količine leka u koži, c) korišćenjem merenja transepidermalnog gubitka vode u određivanju broja traka koje treba ukloniti sa svakog mesta, umesto unapred definisanog broja traka, d) određivanjem količine leka u SC u dve vremenske tačke (koje karakterišu proces resorpcije i eliminacije) (N'Dri-Stempfer i sar., 2009; Parfitt i sar., 2011; Raney i sar., 2015; Yacobi i sar., 2014).

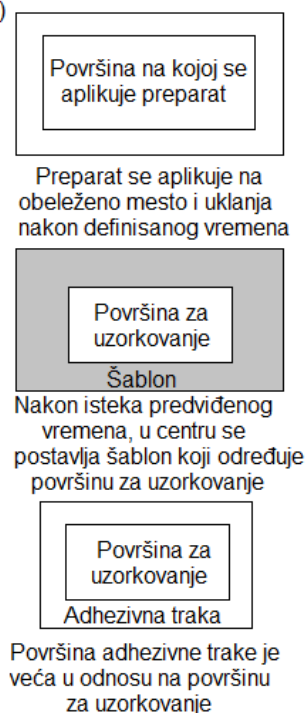
Kao rezultat intenzivnih istraživanja sprovedenih tokom poslednje decenije, regulatorne agencije širom sveta počinju da odobravaju primenu *tape stripping* tehnike u proceni

bioekvivalencije preparata za primenu na koži (tabela 1.8) (Braddy i sar., 2015; EMA, 2018). Ukratko, prema nacrtu Vodiča za kvalitet i ekvivalentnost preparata za primenu na koži koji je nedavno izdala EMA (EMA, 2018), *tape stripping* se sprovodi na volarnim stranama podlaktica zdravih ispitanika (jasno su definisani kriterijumi za uključivanje ispitanika u studiju), sa minimum šest test mesta po svakoj podlaktici (slika 1.8). Pre i tokom *tape stripping* procedure treba na adekvatan način proveriti integritet kožne barijere (najjednostavnije, merenjem TEGV). Potreban broj ispitanika treba odrediti na osnovu pilot studije (minimalno 12 ispitanika je neophodno za demonstriranje bioekvivalencije). Usled relativno velike interindividualne varijabilnosti, test i referentni preparat treba da budu aplikovani na istom ispitaniku. Dodatno treba uključiti negativnu kontrolu koja nije ekvivalentna poredbenom preparatu, kako bi se dokazala zadovoljavajuća diskriminatorsna snaga testa.

a)



b)



**Slika 1.8.** a) Predloženi način aplikacije ispitivanih preparata i b) sažeti prikaz predloženog protokola *tape stripping* metode (prilagođeno iz EMA, 2018)

Ispitivani uzorci se nanose jedanput (engl., *single dose approach*) na obeleženi deo kože, u skladu sa načinom primene opisanim u sažetku karakteristika leka. Ukoliko je potrebno, ispitivani preparati se porede u dve vremenske tačke (jedna za fazu resorpcije, jedna za fazu eliminacije) na svakom ispitaniku. Dužina kontakta kože sa ispitivanim

uzorcima zavisi od karakteristika lekovite supstance i preparata (određuje se u pilot studiji). Faza resorpcije treba da traje dovoljno dugo kako bi se postigao difuzioni *steady-state*. Sa druge strane, tokom faze eliminacije treba da se detektuje smanjenje (najmanje 25%) količine lekovite supstance u SC u odnosu na fazu apsorpcije (usled difuzije u potkožno tkivo).

Ispitivane uzorke treba ukloniti sa svih test mesta na kraju faze apsorpcije (apsorpcija i eliminacija), pri čemu sam proces čišćenja kože (primenom vlažne/suve maramice, pamučnih/alkoholnih tupfera) treba da traje minimalno, kako bi se sprečio negativan uticaj produžene difuzije na količinu lekovite supstance u koži u fazi eliminacije. Stoga, posebnu pažnju treba posvetiti validaciji postupka čišćenja kože tokom pilot studije. Broj traka koji se uklanja sa svakog test mesta određuje se merenjem TEGV. Procedura uklanjanja traka se zaustavlja kada je uklonjeno 75% SC (osmostruko povećanje vrednosti TEGV). Adhezivne trake koje se koristi tokom *tape stripping* procedure, treba da zadovolje sledeće zahteve: a) ne gube masu prilikom aplikacije na površinu kože, b) minimalno gube/dobijaju masu tokom čuvanja, c) lekovita supstance se jednostavno ekstrahuje sa trake, d) komponente adheziva ne interferiraju sa lekovitim supstancom tokom analitičke kvantifikacije, e) najveći deo SC uklanja se primenom relativno malog broja traka (ne više od 30). Količina SC uklonjena svakom trakom određuje se gravimetrijskim postupkom (dozvoljeni su i alterantivni načini ukoliko su adekvatno opisani i opravdani). Prema predloženom vodiču, treba analizirati svaku uklonjenu traku, sa svakog test mesta. Prve dve trake treba analizirati odvojeno od ostalih, a zatim proceniti njihov doprinos ukupnoj količini leka u SC. Kako bi se olakšala kvantifikacija, trake mogu da se kombinuju u grupe. Ukupna količina leka u SC izračunava se kao suma količina ekstrahovanih iz svih uklonjenih traka. Takođe, treba odrediti i količinu lekovite supstance koja je uklonjena sa površine kože čišćenjem (*recovery* treba da bude u opsegu 90-110%). Za potrebe procene bioekvivalencije, statistički treba porediti ukupnu količinu leka u SC u fazi resorpcije, odnosno u fazi eliminacije – 90% interval pouzdanosti odnosa test i referentnog preparata treba da bude u opsegu 80–125%. Interesantno, nacrt predloženog vodiča predlaže da se grafički predstavi sadržaj leka u SC za svako test mesto u funkciji debljine SC (EMA, 2018), a ne u funkciji normalizovane/standardizovane debljine SC, kako je do nedavno intenzivno predlagano (N'Dri-Stempfer i sar., 2009; Parfitt i sar., 2011; Russel i Guy, 2009).

Na kraju treba naglasiti, da iako se *tape stripping* smatra veoma pogodnom metodom za procenu dermalne raspoloživosti/bioekvivalencije, kao glavni nedostaci navode se: a) nemogućnost razlikovanja količine lekovite supstance u koži koja je dostupna za ispoljavanje terapijskog efekata odnosno koja je kristalizovala u koži, b) nemogućnost određivanja količine lekovite supstance koja je penetrirala u folikule dlake, c) ispitivanja se sprovode na zdravoj koži čije se barijerne osobine značajno razlikuju od osobina kože zahvaćene različitim dermatološkim oboljenjima, d) neophodnost standardizacije površine za aplikaciju, e) nemogućnost obezbeđivanja zadovoljavajuće ekvivalentnosti adhezivnih traka između različitih serija, godina proizvodnje i različitih proizvođača, što se negativno odražava na reproducibilnost same metode. Stoga, svi navedeni faktori se moraju pažljivo razmotriti i kontrolisati, i deo su validacione strategije (Pantelić, 2013; Yacobi i sar., 2014).

### 1.9.3 Mikrodijaliza

Mikrodijaliza je *in vivo* metoda koja omogućava kontinuirano praćenje koncentracije lekovite supstance u koži pomoću ultratanke, polupropustljive i šuplje sonde koja se postavlja direktno u dermis. Sonda za uzorkovanje je perfuzovana sterilnim puferom koji je kompatibilan sa okolnim tkivom (obično fosfatni pufer ili Ringerov rastvor) primenom mikrodijalizne pumpe, pri izuzetno maloj brzini protoka 0,1 – 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Zahvaljujući poroznoj strukturi, sonda deluje kao veštački krvni sud koji omogućava izmenu difuzibilnih molekula iz ekstracelularne tečnosti u sondu i obratno (Miranda i sar., 2018a; Pantelić, 2013; Russell i Guy, 2009; Yacobi i sar., 2014). Oblik (linearni, koncentrični, u formi petlje) i veličina pora sonde biraju se prema karakteristikama lekovite supstance (prevažodno molekulske mase). Linearne sonde izrađene u laboratorijskim uslovima mogu se koristiti za uzorkovanje molekula mase do 10 kDa, dok se komercijalno dostupne membrane mogu koristiti i za supstance većih molekulskih masa (imaju *cut-off* do 3000 kDa) (Yacobi i sar., 2014).

Iako je generalno značajno invazivnija tehnika u odnosu na dermofarmakokinetički metod, mikrodijaliza se smatra obećavajućom metodom u proceni bioekvivalencije preparata za primenu na koži, jer u realnom vremenu omogućava praćenje različitih farmakokinetičkih procesa (apsorpcija, eliminacija, metabolizam). Naime, primenom ove metode moguće je pratiti slobodnu frakciju leka u intersticijalnoj tečnosti, što dalje



omogućava određivanje zavisnosti koncentracije leka od vremena. Glavna prednost mikrodijalize u odnosu na ostale metode predložene za određivanje dermalne raspoloživosti/bioekvivalencije je mogućnost praćenja promena u permeabilnosti kože kod različitih kožnih oboljenja. Takođe, mikrodijaliza pruža mogućnost uzorkovanja na nekoliko mesta na istom ispitaniku, što omogućava smanjenje interindividualne varijabilnosti (Miranda i sar., 2018a; Raney i sar., 2015; Yacobi i sar., 2014).

Međutim, uprkos navedenim prednostima, postoje značajni problemi koji ograničavaju širu primenu mikrodijalize. Prvo, rezultati dobijeni primenom mikrodijalize su izuzetno varijabilni, te iako je potvrđena pogodnost primene ove tehnike u proceni biološke raspoloživosti, teško je postići adekvatnu statističku snagu testa za procenu bioekvivalencije. Takođe, kao dodatni nedostaci navode se: a) problemi u praćenju niskodoziranih lekovitih supstanci (npr. kortikosteroidi); b) koncentraciju lekovite supstance u koži treba pratiti tokom 8-10 h (kako bi se dobio potpuni uvid u farmakokinetički profil), što ograničava mobilnost ispitanika tokom trajanja studije, a može dovesti i do inflamacije tkiva (usled prisustva sonde); c) posledično, studije obično traju 4–5 h, što je u najvećem broju slučajeva nedovoljno da se dobije uvid u performanse ispitivanih preparata, odnosno, da se detektuju razlike između ispitivanih formulacija; d) problem reproducibilne aplikacije i proizvodnje sonde, e) problem u odabiru odgovarajuće brzine protoka, f) neophodnost primene izuzetno osetljivih analitičkih metoda za određivanje niske koncentracije lekovite supstance u perfuzatu. Međutim, posebno ograničenje mikrodijalize predstavlja nemogućnost praćenja veoma lipofilnih supstanci i supstanci koji pokazuju visok afinitet vezivanja za proteine (Miranda i sar., 2018a; Raney i sar., 2015; Yacobi i sar., 2014). Ovaj nedostatak se potencijalno može rešiti korišćenjem *open flow* mikroperfuzije, koja deli zajedničke principe sa mikrodijalizom, ali se za razliku od mikrodijalize, intersticijalna tečnost sakuplja direktno, bez korišćenja membrane. Zidovi sonde koja se koristi za mikrodijalizu sastoje se od semipermeabilne membrane, dok se u slučaju *open flow* mikroperfuzije koristi otvorena metalna mreža. Otuda, fizičko-hemijske karakteristike i molekulska masa lekovitih supstanci ne predstavljaju ograničavajući faktor, te se *open flow* mikroperfuzija može koristiti za određivanje lekovitih supstanci koje se vezuju za proteine u značajnom stepenu. Međutim, treba imati na umu da je *open flow* mikroperfuzija značajno komplikovanija metoda u odnosu na mikrodijalizu (Miranda i

sar., 2018a; Raney i sar., 2015). Nedavno sprovedena istraživanja ukazuju da adekvatno dizajnirana i dobro kontrolisana studija bazirana na primeni *open flow* mikroperfuzije poseduje zahtevanu tačnost, preciznost, reproducibilnost i statističku snagu potrebnu za poređenje brzine i obima isporuke leka u dermis iz različitih formulacija, odnosno za procenu bioekvivalencije. Svakako, potrebna su dodatna ispitivanja kako bi se definisali kriterijumi za uključivanje/isključivanje ispitanika, korigovali problemi u uzorkovanju koji potiču od promena u protoku krvi ili dubini aplikacije sonde, i optimizovala zadovoljavajuća dužina trajanja samog ispitivanja (Bodenlenz i sar., 2017). Na kraju, treba istaći da je relativno mali broj istraživača u svetu koji poseduju odgovarajuća znanja i veštine za sprovođenje mikrodijalize/*open flow* mikroperfuzije, kao i za tumačenje dobijenih rezultata. Tokom nekoliko poslednjih godina, FDA intenzivno traži informacije o ovim metodama, podržava submitovanje rezultata sprovedenih ispitivanja, kako bi se dobio detaljniji uvid u potencijalni značaj njihove primene u proceni bioekvivalencije (US-FDA, 2017a,b).

### **1.10 Mikroigle – definicija, prednosti i nedostaci**

Usled izuzetnih barijernih svojstva kože, i pored brojnih napora, optimalnu isporuku leka kroz kožu, često nije moguće postići samo odgovarajućim dizajnom formulacije. Otuda, tokom poslednjih godina uočava se i sve veće interesovanje za fizičkim premošćavanjem barijerne funkcije SC primenom mikroigala, koje povećavaju permeabilnost kože formiranjem pora mikrometarskih dimenzija u koži, i tako olakšavaju pasivnu difuziju leka u/kroz kožu (Kim i sar., 2012; Larrañeta i sar., 2016; Maaden i sar., 2012; Waghule i sar., 2019). Mikroigle se sastoje od nizova mikrometarskih iglica (retko jedna) fiksiranih na odgovarajućoj potpornoj odnosno adhezivnoj membrani. U cilju optimizacije isporuke leka u kožu, mikroigle se danas mogu izrađivati od različitih materijala, u različitim veličinama, obliku i gustini (broj mikroigala po jedinici površine potporne membrane). Uobičajeno, dužina mikroigala je u opsegu 150 – 1500 (2000)  $\mu\text{m}$ , širina 50 – 250  $\mu\text{m}$ , sa debljinom vrha u opsegu 1 – 25  $\mu\text{m}$  (Maaden i sar., 2012; Nguyen i Park, 2017; Vučen, 2013; Waghule i sar., 2019).

**Tabela 1.3.** Poređenje konvencionalnih farmaceutskih oblika za primenu na koži, kao i primene leka pomoću potkožnih igala i mikroigala (prilagođeno iz Waghule i sar., 2019)

Karakteristika	Konvencionalni farmaceutski oblici za primenu na koži (krem/gel/mast)	Transdermalni flasteri	Potkožne igle	Mikroigle
Početak delovanja	Spor	Spor	Brz	Brz
Bol	Bezbolno	Bezbolno	Bolno	Bezbolno
Biološka raspoloživost	Loša	Nedovoljna	Dobra/dovoljna	Dobra/dovoljna
Komplijansa pacijenata	Dobra	Dobra	Loša	Dobra
Mogućnost samo-administracije	Moguće	Moguće	Nemoguće	Moguće
Isporuka leka u/kroz kožu	Najčešće ograničena penetracija lekovite supstance kroz SC do dubljih slojeva kože (10-20% primenjene količine leka)	U zavisnosti od fizičko-hemijskih osobina, moguća isporuka leka u sistemsku cirkulaciju – problem hidrofilni molekuli i molekuli velike molekulske mase	Isporuka leka direktno u dermis	Formiranjem pora u SC omogućena je isporuka leka direktno u epidermis ili dermis

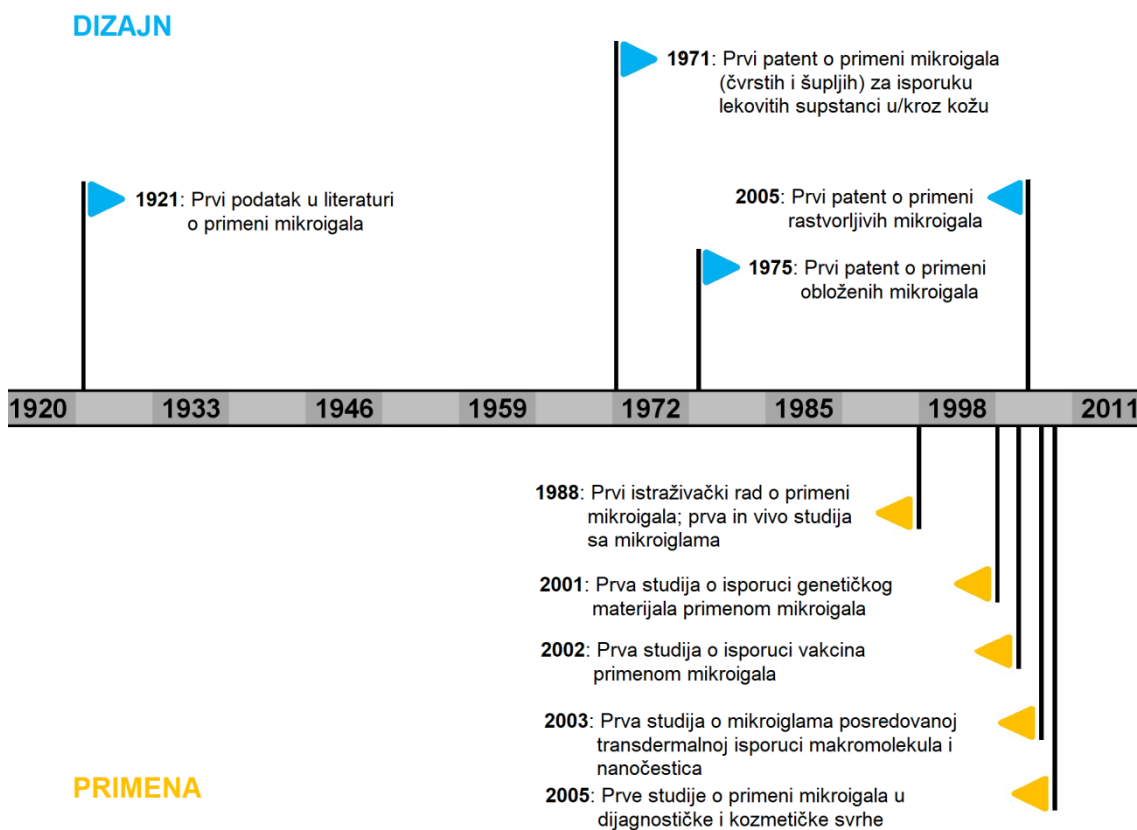
Isporuka lekovitih supstanci u/kroz kožu pomoću mikroigala kombinuje prednosti transdermalnog (neinvazivnog) i parenteralnog (invazivnog) puta primene, uz istovremeno prevazilaženje njihovih specifičnih nedostataka (tabela 1.3). Primena leka parenteralnim putem, pomoću potkožnih igala, omogućava i) direktnu i brzu isporuku lekovitih supstanci u sistemsku cirkulaciju, ii) zaobilazanje metabolizma prvog prolaza, kao i iii) sprečavanje gastrične i intestinalne degradacije lekovitih supstanci. Međutim, primena leka parenteralnim putem praćena je obično slabom komplijansom pacijenata (potrebno je obučeno medicinsko osoblje za aplikaciju). Suprotno, transdermalni flasteri omogućavaju: i) postizanje relativno konstantnih profila lekovitih supstanci u plazmi, ii) jednostavnu aplikaciju i iii) bolju komplijansu pacijenata; međutim, u najvećem broju slučajeva, teško je postići efikasnu isporuku lekovitih supstanci kroz kožu u količini dovoljnoj za postizanje terapijskog efekta usled izuzetnih barijernih svojstava kože (Bhatnagar i sar., 2017; Waghule i sar., 2019). Sa druge strane, za razliku od potkožnih igala, mikroigle, u zavisnosti od dužine, penetriraju kroz SC i vijabilni epidermis, ali ne

dopiru do nervnih završetaka u dermisu, te je stoga primena mikroigala potpuno bezbolna i lako prihvatljiva od strane pacijenata (mogućnost samoadministracije). Primenom mikroigala narušavaju se barijerna svojstva SC, što omogućava brži početak delovanja, bolju isporuku leka u/kroz kožu, a time i bolju terapijsku efikasnost. Dodatno, mikroigle omogućavaju dobijanje visoko reproducibilnih rezultata, sa minimalnom interindividualnom varijabilnošću u biološkoj raspoloživosti (Waghule i sar., 2019).

Kao glavni nedostatak mikroigala, navodi se mogućnost iritacije kože ili pojava alergija kod osoba sa veoma osetljivom kožom. Takođe, usled specifičnih dimenzija mikroigala, može doći do lomljenja vrha, koji ako zaostane u koži može biti izvor različitih neželjenih efekata. Međutim, ovaj problem se danas jednostavno rešava pažljivim odabirom materijala za izradu mikroigala (Waghule i sar., 2019). Konačno, određeni autori kao nedostatak mikroigala, navode i slabiju preciznost doziranja u poređenju sa potkožnim iglama, i varijabilnost dubine penetracije, usled interindividualnih varijacija u debljini kože (Bariya i sar., 2012).

Iako se termin mikroigle pominje u literaturi iz davne 1921. godine, koncept mikroigala za isporuku leka u/kroz kožu, prvi put je opisan u američkom patentu iz 1971. godine od strane Gerstel i Place-a (slika 1.9). Mikroigle su opisane kao uređaji koji se sastoje od mnoštva mikroprojektila, koji se nastavljaju na rezervoar leka i namenjene su za penetraciju u kožu u cilju postizanja lokalnog ili sistemskog delovanja (Bhatnagar i sar., 2017; Duarah i sar., 2019). Prvi eksperimentalni rad o primeni mikroigala u cilju poboljšane isporuke leka kroz kožu (*proof-of-concept*) publikovan je 1998. godine od strane Henry i saradnika. Tretman kože silikonskim mikroiglama dužine 150  $\mu\text{m}$  (pripremljene reaktivnom *ion-etching* mikrofabricacionom tehnologijom) doveo je do značajnog povećanja permeacije kalceina (4x) *in vitro*, kroz izolovanu humanu kožu, u odnosu na kontrolu. Nakon toga, usledile su brojne studije o uspešnoj primeni mikroigala u isporuci oligonukleotida, makromolekula (npr. insulin, albumin) i nanočestica kroz kožu (*in vitro* i *in vivo*). Posebno interesantno, 2002. godine, Mikszta i sar. publikovali su studiju o uspešnoj primeni silikonskih mikroigala u dermalnoj imunizaciji. Zatim, 2005. godine, mikroigle su prvi put upotrebljene u dijagnostičke svrhe, za uzorkovanje dermalne intersticijalne tečnosti u cilju praćenja nivoa glukoze.

Iste godine, beleži se i prva uspešna primena mikroigala u kozmetičke svrhe, za zatezanje kože i redukciju bora primenom kolagena (Bhatnagar i sar., 2017).



**Slika 1.9.** Vremenska lenta istorijskog razvoja mikroigala sa važnim prekretnicama u razvoju i primeni (prilagođeno iz Bhatnagar i sar., 2017).

Tokom poslednjih godina, beleži se značajan porast broja publikacija koje se bave primenom mikroigala u cilju poboljšane isporuke različitih lekova, vakcina i kozmetički aktivnih supstanci u/kroz kožu. Međutim, za uspešan razvoj mikroigla i prenos iz laboratorije na tržište, neophodni su odgovarajući dokazi o efikasnosti i bezbednosti primene iz adekvatno dizajniranih kliničkih studija. Prva klinička studija, sprovedena 2008. godine od strane Wermeling i saradnika, imala je za cilj procenu čvrstih mikroigala od čelika ( $5 \times 10$  mikroigala, dužine  $620 \mu\text{m}$  i širine  $160 \mu\text{m}$ ) da povećaju permeabilnost kože i omoguće transdermalnu isporuku naltreksona iz odgovarajućeg flastera kako bi se postiglo efikasno lečenje heroinske i alkoholne zavisnosti putem kože. Za razliku od standardnog transdermalnog flastera, čijom primenom nije moguće

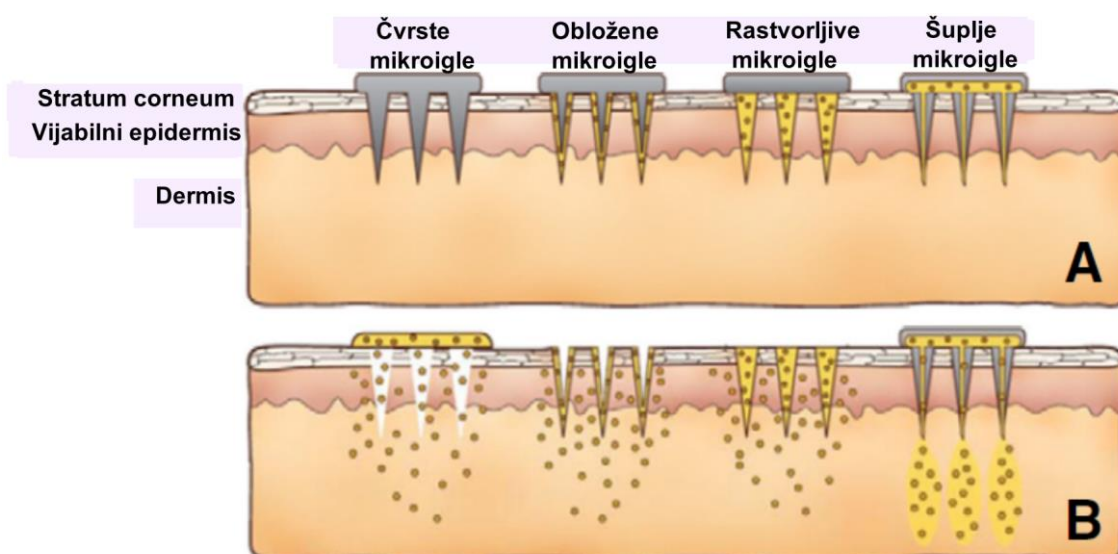
postići značajne nivoe naltreksona u plazmi, primena čvrstih mikroigala omogućila je postizanje *steady-state* koncentracija naltreksona u plazmi i održavanja isporuke leka (*zero-order*) tokom 48 h. Takođe, primenom mikroigala postignute su značajne koncentracije naltreksona u plazmi ( $> 2$  ng/ml), što odgovara 85,6% narkotičke blokade kod pacijenata koji su uzeli 25 mg heroina intravenski. Trenutno, pretraživanjem baze [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) korišćenjem „*microneedle*“, kao ključne reči, pronalazi se 51 klinička studija (završena i/ili trenutno u toku) vezana za procenu različitih aspekta primene mikroigala. Interesantno, najveći broj studija posvećen je proceni karakteristika šupljih mikroigala, zatim nešto manje čvrstih, dok su znatno manje zastupljene obložene i rastvorljive mikroigle (videti ispod) (Nguyen i Park, 2017).

Takođe, važno je napomenuti da se tokom nekoliko poslednjih godina, na tržištu intenzivno pojavljuju različiti uređaji bazirani na mikroiglama, a koji su namenjeni za isporuku lekovitih supstanci i vakcina u/kroz kožu, ili se pak mogu koristiti u kozmetičkim tretmanima. Na primer, *Microstructured Transdermal System*<sup>®</sup>, razvijen od strane 3M (SAD), sastoji se od obloženih mikroigala i omogućava brzu i poboljšanu isporuku različitih lekovitih supstanci i vakcina u/kroz kožu. *Macroflux*<sup>®</sup>, razvijen od strane Alza i Johnson & Johnson, koristi obložene mikroigle za poboljšanu isporuku makromolekula u/kroz kožu, pružajući mogućnost regulacije dubine penetracije. *MicronJet*<sup>®</sup>, razvijen od strane Nanopass Technologies (Izrael), sastoji se od 4 šuplje mikroigle dužine manje od 500  $\mu$ m, i može da se postavi na bilo koji špric za intradermalnu injekciju. *H-patch*<sup>TM</sup> (Valeritas, SAD) je specijalno dizajniran uređaj za isporuku različitih makromolekula (npr. insulin) u potkožno tkivo. *MTS Roller*<sup>TM</sup>, odobren od strane FDA za kozmetičku primenu, pogodan je za tretman različitih promena na koži, kao što su hiperpigmentacije, bore, ožiljci i slično (Duarah i sar., 2019; Waghule i sar., 2019).

### **1.10.1 Tipovi mikroigala i mehanizmi isporuke leka u/kroz kožu**

Generalno, sve mikroigle se mogu svrstati u jednu od 4 osnovne grupe: čvrste, obložene, rastvorljive i šuplje mikroigle. Kao što se može videti i na slici 1.10, svaki od navedenih tipova mikroigala omogućava isporuku leka u/kroz kožu specifičnim mehanizmom.

**Čvrste mikroigle**, iako najjednostavnije i među prvima korišćene, još uvek su interesantne, jer se dominantno koriste u predtretmanu kože, za prevazilaženje barijernih osobina SC. Primena čvrstih mikroigala se obično zasniva na „*poke and patch*“ pristupu – mikroigle se insertuju u kožu, nakon određenog vremena (10 s – 1 min) uklanjaju, i zatim na tretirano mesto nanosi ispitivana formulacija (transdermalni flasteri, polučvrsti preparati za primenu na koži). Prilikom insertovanja i uklanjanja čvrstih mikroigala iz kože, formiraju se pore mikrometarskih dimenzija, kroz koje lekovita supstanca pasivno difunduje u dublje slojeve kože radi postizanja lokalnog efekta, odnosno u krvne sudove, u cilju sistemskog delovanja (Duarah i sar., 2019; Kim i sar., 2012; Maaden i sar., 2012). Otuda, jasno je da efekat primene čvrstih mikroigala zavisi od veličine i broja pora formiranih u koži, kao i od karakteristika formulacije i koncentracije/sadržaja leka u formulaciji nanetoj na površini kože. Glavni nedostaci ovog tipa mikroigala su nemogućnost preciznog doziranja, ograničena količina lekovite supstance koja može biti isporučena u/kroz kožu, kao i dvostepeni proces administracije (Maaden i sar., 2012).



**Slika 1.10.** Šematski prikaz različitih tipova mikroigala koji se koriste za poboljšanu isporuku lekovite supstance u/kroz kožu. Mikroigle se prvo aplikuju u kožu (A), a zatim koriste za isporuku lekovite supstance u/kroz kožu (B) (prilagođeno iz Kim i sar., 2012).

Čvrste mikroigle, pored jednostavne primene u formiranju pora u SC i vijabilnom epidermisu, mogu se koristiti i kao nosači lekovite supstance, omogućavajući isporuku i deponovanje lekovite supstance u koži i drugim tkivima. Ovaj efekat se ostvaruje nanošenjem rastvora lekovite supstance u vidu tankog filma na površinu mikroigala (**obložene mikroigle**), a koji se nakon insertovanja mikroigala u kožu rastvara i oslobađa lekovitu supstancu. Mikroigle se potom uklanjaju iz kože, a ovaj pristup se u literaturi označava još i kao „*coat and poke*“ (Duarah i sar., 2019; Kim i sar., 2012; Maaden i sar., 2012). Jasno je da je brzina rastvaranja filma u koži važan faktor koji određuje efikasnost isporuke lekovite supstance u kožu primenom obloženih mikroigala. Međutim, iako primena obloženih mikroigla omogućava značajno preciznije doziranje u odnosu na čvrste mikroigle, treba imati na umu da se primenom „*coat and poke*“ pristupa može isporučiti jako mala količina lekovite supstance u kožu (obično manje od 1 mg). Takođe, važno je napomenuti da se oblaganjem redukuje oštrina mikroigala i sposobnost prodiranja u kožu (Maaden i sar., 2012), što ograničava njihovu efikasnost.

Alternativno, mikroigle mogu biti kompletno izrađene od biodegradabilnih polimera ili polimera rastvornih u vodi, pri čemu je lekovita supstanca inkorporirana u matriks mikroigala (**rastvorljive mikroigle**). Nakon aplikacije u kožu, mikroigle se u potpunosti degradiraju, odnosno rastvaraju, oslobađajući inkapsuliranu lekovitu supstancu („*poke and release*“ pristup). Korišćenjem polimera u izradi mikroigala otvara se mogućnost modifikovanja oslobađanja leka, smanjuju se troškovi izrade i skladištenja biokontaminiranog, nedegradabilnog otpada (Duarah i sar., 2019; Kim i sar., 2012; Maaden i sar., 2012). Međutim, rastvorljive mikroigle su sklone lomljenju i deformaciji tokom čuvanja i upotrebe. Takođe, često je vrlo teško postići potrebnu oštrinu vrha za efikasnu penetraciju u kožu. Iako omogućavaju relativno precizno doziranje, rastvorljive mikroigle su prevashodno pogodne za isporuku niskodoziranih lekovitih supstanci u/kroz kožu (sadržaj > 10 % ima negativan uticaj na mehaničke karakteristike rastvorljivih mikroigala) (Maaden i sar., 2012; Miyano i sar., 2005).

Konačno, razvojem **šupljih mikroigala** omogućena je precizna isporuka većih (terapijskih) doza leka u/kroz kožu. Slično potkožnim iglama, šuplje mikroigle pružaju mogućnost isporuke tečnih formulacija pod pritiskom u kožu i okolna tkiva („*poke and flow*“ pristup). Alternativno, šuplje mikroigle omogućavaju difuziju lekovite supstance



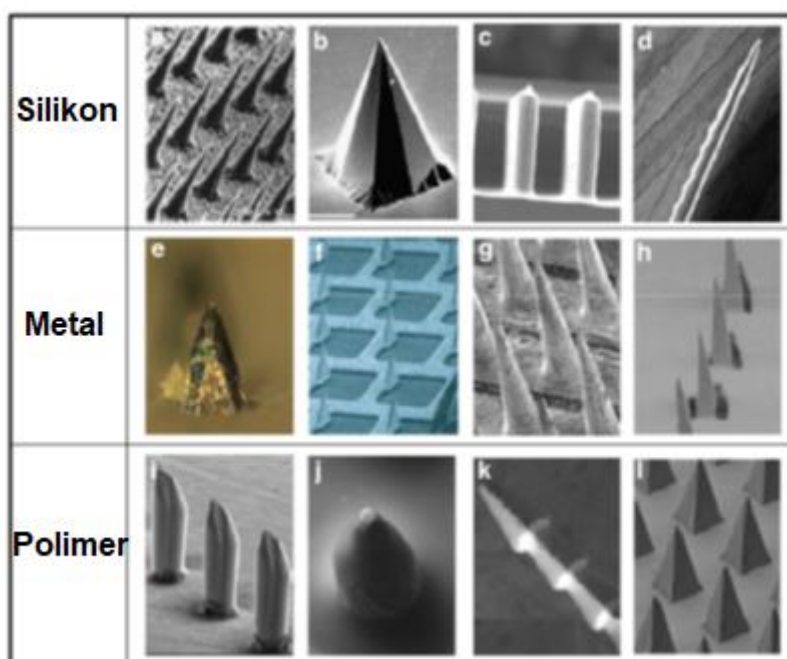
iz odgovarajućeg rezervoara kroz otvor na vrhu iglica (bez pritiska) u određene slojeve kože (Duarah i sar., 2019; Kim i sar., 2012; Maaden i sar., 2012). Međutim, kao glavni nedostaci šupljih mikroigala navode se: mogućnost začepljenja, problemi u mehaničkoj snazi, povećan rizik od curenja, kompleksan dizajn samih mikroigala (Maaden i sar., 2012). Čvrste mikroigle su predmet ove doktorske disertacije, pa će u narednom delu posebna pažnja biti posvećena njihovim karakteristikama i različitim aspektima primene.

### **1.11 Čvrste mikroigle – karakteristike i faktori koji određuju efikasnost**

Tokom proizvodnje čvrstih mikroigla, pažnja je fokusirana na: i) obezbeđivanje adekvatnih mehaničkih karakteristika, pravilnim odabirom materijala za izradu i geometrije mikroigala, kao i na ii) redukovanje sile potrebne za aplikaciju mikroigala u kožu povećanjem oštine vrha mikroigala (Kim i sar., 2012). U početku, čvrste mikroigle izrađivane su isključivo od silikona. Međutim, proizvodnja silikonskih mikroigala je prilično skup proces, posebno jer se sprovodi u čistim sobama. Dodatno, usled fragilne prirode silikona, silikonske mikroigle su sklone lomljenju (povećan rizik od zaostajanja vrha mikroigala u koži), što ograničava njihovu širu primenu (Maaden i sar., 2012; Waghule i sar., 2019). Kao rezultat, intenzivno se radi na proizvodnji čvrstih mikroigala primenom jeftinijih i/ili biokompatibilnih materijala, kao što su metali (čelik, titanijum, nikal), keramika, nedegradabilni polimeri (polimetilmetakrilat (PMMA), polikarbonat, kopolimer metilviniletra i anhidrida maleinske kiseline (PMVE/MA)), biodegradabilni polimeri (polilaktid-ko-glikolid (PLGA), polimlečna kiselina (PLA), poliglikolna kiselina (PLGA)) i slično (slika 1.11) (Bariya i sar., 2012; Kim i sar., 2012; Lim i sar., 2018).

Međutim, treba imati na umu da nekoliko faktora može da utiče na efikasnost isporuke lekovite supstance u kožu primenom čvrstih mikroigala, kao što su mehaničke karakteristike mikroigala, karakteristike formulacije i kinetika zatvaranja pora u koži nakon primene mikroigala (Milewski i sar., 2010). Generalno, elastična priroda kože ograničava penetraciju mikroigala u kožu deformacijom (uvijanjem oko iglica) tokom aplikacije, što posebno dolazi do izražaja u slučaju kratkih i tupih mikroigala (Vučen, 2013). Usled robusnosti kože, sila neophodna za aplikaciju mikroigala u kožu može preći zateznu silu mikroigala, što rezultuje lomljenjem mikroigala, posebno dugačkih i

izrađenih od relativno slabih materijala (Maaden i sar., 2012; Vučen, 2013). Stoga, geometrija mikroigala je ključna za efikasnost isporuke lekovite supstance u kožu, jer određuje mehaničku snagu mikroigala i njihovu sposobnost da penetriraju u kožu. Pod pojmom geometrija mikroigala podrazumeva se dužina, oblik, površina vrha, odnos širine i visine mikroigle, broj mikroigala po jedinici površine potporne membrane (gustina) kao i međusobno rastojanje između mikroigala (Vučen, 2013).



**Slika 1.11.** Čvrste mikroigle izrađene od silikona, metala i različitih polimera (prilagođeno iz Kim i sar., 2012)

Kako bi se obezbedila efikasna penetracija mikroigala u kožu, razvijene su mikroigle različitog oblika (kružne, cilindrične, pravougaone, piramidalne, konusne, osmougaone, cevaste), različite dužine i širine (slika 1.11). Kružne silikonske mikroigle mogu da podnesu najveći stres/silu, a zatim slede pravougaone i kvadratne mikroigle (Nava-Arzaluz i sar., 2012). Generalno, oštrije mikroigle penetriraju efikasnije u kožu pri određenoj sili, odnosno, veći dijametar vrha zahteva veću silu za penetraciju u kožu (Davis i sar., 2004). Dužina mikroigla zavisi od namene – na primer, minimalna dužina 100  $\mu\text{m}$  je neophodna za penetraciju kroz SC, dok su duže mikroigle (500 – 2000  $\mu\text{m}$ ) potrebne za poboljšanu isporuku leka u sistemsku cirkulaciju (mikrocirkulacija se nalazi približno 200  $\mu\text{m}$  ispod površine kože) (Nava-Arzaluz i sar., 2012). Takođe, broj

mikroigala po jedinici potporne/adhezivne membrane je od posebnog značaja za efikasnu penetraciju u kožu. Smatra se da su mikroigle manje gustine pogodnije za aplikaciju, jer mogu da povuku kožu vezanu između iglica. Suprotno, prilično neočekivano, mikroigle velike gustine su manje efikasne, zbog tzv. „*bed of nails*“ efekta (Maaden i sar., 2012; Vučen, 2013). Naime, efikasnost penetracije mikroigala u kožu direktno određuje sila koja se izvrši po jedinice površine vrha mikroigala prilikom aplikacije u kožu (tj. pritisak). Ukoliko se na odgovarajućoj potpornoj membrani nalazi samo jedna mikroigla, celokupno opterećenje koje se izvrši prilikom aplikacije raspoređuje se na veoma malu površinu vrha mikroigle. Drugim rečima, sila po jedinici površine vrha je prilično velika (jer je mala ukupna površina), što rezultuje efikasnom penetracijom mikroigale u kožu. Međutim, sa povećanjem broja mikroigala, ukupno opterećenje koje se izvrši na potpurnu membranu, raspodeljuje se na veći broj mikroigala, što za posledicu ima smanjene sile koje deluje na pojedinačnu mikroiglu. Preciznije, povećanje broja mikroigala uslovljava smanjenje sile po jedinici površine vrha, koja je često nedovoljna za efikasno probijanje kože. U ovom slučaju, kako bi se postigla efikasna penetracija mikroigala u kožu, neophodno je povećanje pritiska prilikom aplikacije (Yang i Zahn, 2004).

Dalje, kako bi se postigla reproducibilna aplikacija mikroigala u kožu, neophodno je korišćenje odgovarajućeg aplikatora (čak i u slučaju izuzetno oštih mikroigala). Međutim, u literaturi je dugo potcenjivan značaj korišćenja aplikatora, te su uobičajeno čvrste mikroigle primenjivane pritiskom prsta. Aplikator namenjen za kliničku primenu mikroigala treba da zadovolji nekoliko zahteva. Prvo, kako je cilj primene mikroigala smanjenje neprijatnosti za pacijente i eliminacija bola, aplikator sam po sebi ne sme da izaziva bol. Takođe, aplikator treba da omogući efikasnu, reproducibilnu penetraciju mikroigala u kožu, bez povećanja rizika od lomljenja mikroigala. Iako je u literaturi predloženo nekoliko različitih tipova aplikatora, ne postoji univerzalan aplikator – karakteristike mikroigala (dužina, oštrina, gustina) i svrha primene, određuju odabir aplikatora (Duarah i sar., 2019; Maaden i sar., 2012).

Dodatno, važan faktor koji određuje efikasnost čvrstih mikroigala u „*poke and patch*” pristupu je i kinetika zatvaranja mikropora formiranih u koži nakon uklanjanja mikroigala. S aspekta isporuke leka u kožu, poželjno je da pore budu što duže otvorene. Međutim, sa aspekta bezbednosti, poželjno da je da se mikropore brzo zatvore, kako bi

se smanjio rizik od infekcije kože (Kim i sar., 2012; Maaden i sar., 2012). Otuda, Gupta i sar. (2011) ispitivali su kinetiku zatvaranja pora nakon predtretmana kože čvrstim mikroiglama od čelika različite dužine (500, 750 i 1500  $\mu\text{m}$ ) i broja iglica (10 i 50), merenjem električne impedanse kože humanih dobrovoljaca. Interesantno, utvrđeno je da se, u odsustvu okluzije, barijerne osobine kože obnavljaju u roku od 2 h, dok pod okluzijom, mikropore se zatvaraju mnogo sporije, između 3 i 40 h, u zavisnosti od geometrije mikroigala. Generalno, povećanjem dužine i poprečnog preseka mikroigala, kao i broja iglica produžava se vreme potrebno za zatvaranje pora, što ukazuje da geometrija samih mikroigala ima važnu ulogu u kinetici zatvaranja mikropora (Gupta i sar., 2011; Vučen, 2013). Interesantno, uočeno je da se dodatkom diklofenaka značajno produžava vreme potrebno za zatvaranje pora (čak do 7 dana), što ukazuje na potencijalnu ulogu inflamacije u kinetici zatvaranja pora. Međutim, s obzirom da nisu detektovani znaci inflamatornog odgovora (ćelijska infiltracija), smatra se da efekat diklofenaka potiče od inhibicije COX-1 zavisne proliferacije (većina keratinocita na različitom stepenu diferencijacije poseduje COX-1) (Banks i sar., 2011).

### **1.11.1 Primena čvrstih mikroigla kao fizičkih inhensera**

Predtretman kože čvrstim mikroiglama prevashodno je značajan za poboljšanu isporuku **lekovitih supstanci male molekulske mase** u/kroz kožu, jer se primenjuju u dozama koje su suviše velike za nanošenje u vidu filma na čvrste mikroigle ili za efikasno inkorporiranje u rastvorljive mikroigle. Drugim rečima, formiranje mikropora u koži pomoću čvrstih mikroigala omogućava pasivnu difuziju lekovite supstance primenjene na površini kože u obliku flastera ili tečne/polučvrste formulacije tokom produženog vremena, čime se postiže isporuka veće količine lekovite supstance u/kroz kožu. U tom smislu, važno je istaći da lekovite supstance male molekulske mase imaju veći difuzioni koeficijent u poređenju sa makromolekulima (mogu mnogo brže da difunduju u kožu), što je od značaja za njihovu primenu pomoću čvrstih mikroigala (Kim i sar., 2012). Međutim, svakako treba imati na umu da karakteristike lekovite supstance (molekulska masa, particioni koeficijent, rastvorljivost, tačka topljenja, koeficijent permeabilnosti) određuju u kom stepenu će penetrirati kroz kožu tretiranu mikroiglama (Lim i sar., 2018). Drugim rečima, pasivni transport lekovitih supstanci kroz mikropore formirane u koži primenom čvrstih mikroigala ne dovodi uvek do poboljšanja biološke

raspoloživosti (Maaden i sar., 2012). Jasno je da ne samo karakteristike lekovite supstance, već i karakteristike formulacije, značajno određuju efikasnost isporuke u/kroz kožu primenom mikroigala. Na primer, pH vrednost formulacije direktno utiče na stepen jonizacije lekovite supstance i njene fizičko-hemijske osobine, te tako direktno određuje permeaciju kroz kožu. Banks i sar. (2008) su uočili da nakon predtretmana kože zamorca mikroiglama došlo do blagog povećanja fluksa nejonizovanog (slabo rastvornog) oblika naltreksola kroz kožu. Smanjenjem pH vrednosti formulacije, jonizovan oblik naltreksola (lako rastvorljiv) je permeirao kroz kožu značajno brže i u većem procentu, što ukazuje da naelektrisani molekuli pokazuju veću selektivnost za difuziju kroz mikropore formirane u koži pod dejstvom mikroigala u odnosu na intaktnu kožu. Međutim, interesantno, prisustvo naelektrisanja na molekulu naltreksona kao druge primenjene model lekovite supstance nije značajno uticalo na transport kroz kožu tretiranu mikroiglama. Stoga, autori su zaključili da rastvorljivost leka u formulaciji ima ključnu ulogu u transportu kroz kožu tretiranu mikroiglama (veći koncentracioni gradijent). Takođe, važno je naglasiti da je uticaj promene pH vrednosti formulacije na permeaciju lekovite supstance isti za intaktnu i kožu tretiranu mikroiglama (samo je izraženiji u slučaju primene mikroigala), iako su uključeni različiti putevi isporuke u/kroz kožu. Sa druge strane, Milewski i sar. (2010) ispitivanjem permeacije naltrekson-hidrohlorida kroz kožu jukatanskih svinja iz propilenglikol-voda binarnih smeša, uočili su da, za razliku od intaktne kože, transport naltrekson-hidrohlorida kroz kožu tretiranu mikroiglama, direktno zavisi od sastava smeše i važnije, obrnuto je proporcionalan viskozitetu.

Tokom poslednjih nekoliko godina, sve veći značaj dobija i primena mikroigala u isporuci **različitih bioloških lekova** (npr. različiti peptidi, proteini, DNK, RNK), koji se kao veliki molekuli, ne mogu jednostavno primenjivati peroralnim ili transdermalnim putem. Međutim, iako se beleže studije uspešne isporuke bioloških lekova kroz kožu pomoću čvrstih mikroigala (npr. Martanto i sar. (2004) su uočili da je predtretman kože pacova čvrstim mikroiglama od čelika (dužine ~1000  $\mu\text{m}$ ) neposredno pre primene rastvora insulina doveo do značajnog poboljšanja isporuke insulina kroz kožu, kao i značajnog smanjenja nivoa glukoze u plazmi, slično primeni 0,05–0,5 U insulina subkutano), danas, usled malih doza ovih lekova (često nekoliko mikrograma),

dominanto se vrši oblaganje mikroigala odgovarajućim rastvorom ili se pak inkorporiraju u rastvorljive mikroigle (Kim i sar., 2012; Maaden i sar., 2012).

Takođe, poslednjih godina, mikroigle postaju sve interesantnije i za isporuku **vakcina** u kožu. Intramuskularnom ili subkutanom primenom, vakcine se isporučuju kroz kožu u regione koji ne sadrže značajne koncentracije antigen-prezentujućih ćelija. Sa druge strane, pomoću mikroigala postiže se isporuka vakcina direktno u epidermis i/ili dermis, koji sadrže bogatu mrežu antigen-prezentujućih ćelija, što olakšava njihovo prepoznavanje od strane ćelija imunog sistema. Rezultati do sada sprovedenih studija ukazuju da se korišćenjem mikroigala za isporuku vakcina kroz kožu postiže bolja imunogenost, kao i bolja stabilnost antigena u odnosu na konvencionalne puteve primene. Međutim, iako postoje podaci o primeni vakcina pomoću čvrstih mikroigala, danas, kliničku primenu pronalaze pre svega napredniji tipovi mikroigala (šuplje/obložne mikroigle). Na primer, *Soluvia™ microinjection* (BD Bioscience) i *MicronJet™* (Nanopass technologies) su klinički odobrene šuplje mikroigle za intradermalnu isporuku vakcine gripa. Takođe, primenom *MicronJet™* dobijeni su obećavajući rezultati faze III kliničkih studija za intradermalnu isporuku inaktivirane polio vakcine kod dece uzrasta 6-14 meseci. Interesantno, primenom *MicronJet™* sistema dobijeni su ohrabrujući rezultati i kod pacijenata sa HIV-om, koji generalno pokazuju slab imuni odgovor na većinu vakcina primenjenih konvencionalnim putevima primene. Takođe, vredi napomenuti i istraživanja na polju primene obloženih mikroigala za intradermalnu isporuku vakcine protiv Alzhajmerove bolesti (Duarah i sar., 2019; Kim i sar., 2012).

Konačno, važno je pomenuti i primenu čvrstih mikroigala za poboljšanje isporuke mikro/nanočestica u/kroz kožu. Naime, obimna istraživanja sprovedena tokom poslednjih godina ukazuju da penetracija nanočestica u kožu zavisi od karakteristika samih nanočestica (sastav formulacije, veličina čestica, površinsko naelektrisanje i drugo) i ograničena je isključivo na gornje slojeve SC-a (Patzelt i sar., 2017). Stoga, kombinovani pristup baziran na predtretmanu kože mikroiglama i primeni nanočestica je prepoznat kao obećavajući za poboljšanu i/ili produženu dermalnu/transdermalnu isporuku lekovitih supstanci (Coulman i sar., 2009; Larrañeta i sar., 2016; Milewski i sar., 2010). Međutim, treba imati na umu da efikasnost isporuke leka u/kroz kožu primenom nanonosaa i mikroigala može da zavisi od brojnih faktora vezanih za

geometriju mikroigala sa jedne strane i karakteristika nanonosaa sa druge strane. Među prvima, Coulman i sar. (2009) su ispitivanjem difuzije fluorescentnih polistirenskih nanosfera (100–150 nm) kroz kožu tretiranu silikonskim mikroiglama (280  $\mu\text{m}$ ) uočili, značajnu varijabilnost u dobijenim rezultatima, verovatno kao posledica nekonzistentnosti u broju i geometriji/dimenzijama mikropora formiranih u koži pod dejstvom mikroigala. Dalje, detaljnim pregledom kože, utvrđeno je prisustvo nanočestica na površini kože, oko mikrokanala, kao i u njihovim unutrašnjim delovima, što ukazuje da predtretman kože mikroiglama podstiče agregaciju nanočestica. Otuda, stabilnost koloidnih formulacija u ekstracelularnom prostoru i/ili direktna interakcija sa izloženim tkivom smatraju se glavnim faktorima koji određuju efikasnost penetracije nanočestica u mikropore formirane u koži dejstvom mikroigala. Kasnije, Gommaa i sar. (2014) su ispitivali permeaciju PLGA nanočestica sa inkapsuliranom bojom (rodamin B ili fluorescein izotiocijanat) kroz kožu uha svinje, nakon predtretmana kože čvrstim polimernim mikroiglama (dužina 600  $\mu\text{m}$ , 121 mikroigla). Smanjenjem veličine nanočestica (sa 420 nm do 150 nm), kao i povećanjem hidrofilnosti površine postignuto je značajno povećanje permeacije rodamina B kroz kožu tretiranu mikroiglama. Takođe, uočeno je značajno povećanje fluksa nakon primene negativno naelektrisanih nanočestica, verovatno usled smanjene adsorpcije na negativno naelektrisanu površinu kože i mikropora formiranih u koži pod dejstvom mikroigala. Interesantno, pored karakteristika nanonosaa, hemijska priroda inkapsulirane boje, imala je značajan uticaj na efekat primene mikroigala – fluorescein natrijum je dominantno prisutan na površini kože, i u gornjim delovima mikropora, dok je rodamin B penetrirao značajno dublje u kožu).

Pored opisanih primera studija koje su imale za cilj mehanističko razumevanje faktora koji određuju efikasnost kombinovanog pristupa čvrste mikroigle/nanočestice, u literaturi postoje i primeri različitih studija u kojima je ovaj pristup korišćen sa ciljem poboljšane isporuke različitih lekovitih supstanci u/kroz kožu. Na primer, Qui i sar. (2008) su uočili da se kombinacijom čvrstih mikroigala (dužina 150  $\mu\text{m}$ ) i elastičnih liposoma značajno povećava isporuka docetaksela (supstanca relativno velike molekulske mase i slabe rastvorljivosti u vodi) kroz kožu, uz značajno smanjenje vremena odlaganja (*lag-time*). Interesantno, Paleco i sar. (2014) su uočili da predtretman kože čvrstim silikonskim mikroiglama (36 mikroigala na površini 1  $\text{cm}^2$ ;

dužina 200  $\mu\text{m}$ ) dovodi do značajnog povećanja penetracije kvercetina inkorporiranog u mikročestice (dijametra  $\sim 8,1 \mu\text{m}$  i PI 0,66) u kožu u poređenju sa slobodnim kvercetinom. Odsustvo povećanja penetracije slobodnog kvercetina u SC i vijabilni epidermis, uprkos formiranju mikropora, može se pripisati ograničenoj rastvorljivosti kvercetina u vodi i/ili interakcijama (npr. metabolizmu, degradaciji) sa komponentama kože.

### 1.11.2 Bezbednost primene čvrstih mikroigala

Pored procene efikasnosti mikroigala, važan aspekt je i bezbednost njihove primene. Sprovedene studije na životinjama i ljudima potvrđuju odsustvo ozbiljnih neželjenih efekata nakon aplikacije mikroigala u kožu. Kao što je već naglašeno, za razliku od potkožnih igala, mikroigle ne dopiru do nervnih završetaka u dermisu, te se smatra da je njihova primena bezbolna. Otuda, Gill i sar. (2008) su u opsežnoj studiji ispitivali uticaj dužine (480, 700, 960, i 1450  $\mu\text{m}$ ), širine (160, 245 i 465  $\mu\text{m}$ ), debljine (30, 45, i 100  $\mu\text{m}$ ) i broja (5 i 50) čvrstih mikroigla od čelika na intenzitet bola. Utvrđeno je da dužina i broj mikroigla značajno utiču na intenzitet bola, dok debljina i karakteristike vrha mikroigala nemaju značajan uticaj. Trostruko povećanje dužine mikroigala praćeno je sedmostrukim povećanjem intenziteta bola. Takođe, desetostruko povećanje broja mikroigala praćeno je dvostrukim povećanjem intenziteta bola. Kao što je i bilo očekivano, primena svih ispitivanih mikroigala praćena je daleko manjim bolom (5-40 %) u odnosu na potkožne igle (26 G). Otuda, 2014. godine, Mooney i sar. ispitivali su efekat primene mikroigala, kao alternativnog pristupa za uzorkovanje krvi i primenu lekova kod 86 dece školskog uzrasta (10-14 godina). Redukcija bola i eliminacija upotrebe klasičnih igala uslovlila je široko prihvatanje mikroigala među decom.

Primena mikroigala može prouzrokovati pojavu blage, prolazne iritacije kože, uglavnom u formi visoko lokalizovanog, blagog eritema i/ili otoka, čiji intenzitet direktno zavisi od dužine mikroigala (čvrste mikroigle dužine 400  $\mu\text{m}$  dovode do intenzivnijeg eritema i protoka krvi u odnosu na mikroigle dužine 200  $\mu\text{m}$ ) i koji se gubi u roku nekoliko sati (najčešće 2h), retko nekoliko dana (Bal i sar., 2008; Kim i sar., 2012). Takođe, kod određenog broja pacijenata, primena mikroigala može dovesti do svraba koji relativno brzo nestaje (Waghule i sar., 2019). Bal i sar. (2008) uočili su da se čvrste metalne mikroigle dužine do 550  $\mu\text{m}$  mogu koristiti za bezbolno narušavanje



barijerne funkcije SC, uz minimalnu iritaciju kože. Međutim, treba imati na umu da pore koje zaostaju u koži nakon primene mikroigala mogu potencijalno biti mesto infekcije. Kliničko iskustvo ukazuje da nakon primene sterilnih potkožnih igala izuzetno retko dolazi do infekcija, pre svega zahvaljujući odbrambenim mehanizmima kože protiv patogena. Stoga, Donnelly i sar. (2009) ispitivali su mogućnost ulaska različitih mikroorganizama (*Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus epidermidis*) u pore formirane u koži svinje primenom čvrstih silikonskih mikroigala dužine 280  $\mu\text{m}$ . Predtretman kože mikroiglama praćen je značajno manjom mikrobiološkom penetracijom u poređenju sa potkožnim iglama (nije detektovano prisustvo mikroorganizama u vijabilnom epidermisu). Stoga, logično je očekivati da primena mikroigala na odgovarajući način, neće prouzrokovati lokalnu ili sistemsku infekciju kod pacijenata sa očuvanim imunim sistemom. Svakako, bezbednost pacijenata se povećava proizvodnjom mikroigala pod aseptičnim uslovima, odnosno primenom odgovarajuće metode sterilizacije. Na primer, čvrste mikroigle izrađene od čelika pod aseptičnim uslovima su uspešno sterilisane etilenoksidom (Wermeling i sar., 2008). Međutim, treba imati na umu da se određeni tipovi mikroigala (npr. rastvorljive mikroigle) mogu degradirati tokom terminalne sterilizacije (npr. sterilizacija toplotom, etilenoksidom, gama zračenjem) (Duarah i sar., 2019).

## 2. CILJ RADA

Kako bi se poboljšala biološka raspoloživost i posledično terapijski efekat NSAIL primenjenih na koži, neophodno je rešiti problem ograničene isporuke u/kroz kožu, koji dominantno potiče od izuzetnih barijernih svojstava SC. Među brojnim nanotehnološkim strategijama koje su predložene za postizanje optimalne isporuke lekovitih supstanci u/kroz kožu tokom poslednjih nekoliko godina, posebno su interesantne nanoemulzije zbog niza jedinstvenih osobina kao što su biokompatibilnost, biodegradabilnost, visok solubilizacioni kapacitet za lipofilne lekove, dobra kinetička stabilnost, niska koncentracija surfaktanata i posledično nizak iritacioni potencijal, kao i relativno jednostavna proizvodnja i *scale up*. Međutim, razvoj nanoemulzija je prilično izazovan zadatak, jer brojni faktori (parametri formulacije, procesni parametri i karakteristike lekovite supstance) mogu da utiču na fizičko-hemijske karakteristike i stabilnost nanoemulzija. Posebno, pravilan izbor surfaktanata je od ključnog značaja za postizanje odgovarajuće stabilnosti, bezbednosnog profila nanoemulzija, ali i efikasne isporuke inkorporiranog leka u/kroz kožu.

Sa druge strane, kako su bol i prateći simptomi jedinstveno iskustvo svakog pojedinca, poslednjih godina uočava se težnja da se tretman povreda/bolesti skeletno-mišićnog sistema prilagodi specifičnim potrebama svakog pacijenta (lekovita supstanca, doza/koncentracija i vehikulum treba da odgovaraju individualnim potrebama pacijenta), zbog čega izrada magistralnih lekova u apoteci dobija sve veći značaj. Prema zahtevu lekara, NSAIL (sami ili u kombinaciji sa drugim lekovitim supstancama) često se inkorporiraju u gotove, tzv. „*ready to use*“ podloge ili podloge izrađene prema propisima domaćih ili stranih farmakopeja ili njihovih dodataka. Međutim, praksa je pokazala da trenutno dostupne emulzione podloge često ne pružaju željeni terapijski efekat inkorporiranog NSAIL, kao i da, u većini slučajeva, ne zadovoljavaju očekivanja pacijenta u pogledu željene teksture preparata, senzornih atributa i bezbednosnog profila. Otuda, javlja se potreba za inoviranjem sastava ovih podloga u cilju postizanja optimalne dermalne raspoloživosti NSAIL i zadovoljenja specifičnih potreba pacijenata. Na kraju, treba imati na umu da usled izuzetnih barijernih svojstva kože, i pored brojnih napora, optimalnu isporuku leka kroz kožu često nije moguće postići samo odgovarajućim dizajnom formulacije. Drugim rečima, postoji potreba za dodatnim, fizičkim premošćavanjem barijerne funkcije SC. U tom smislu, predtretman kože

čvrstim mikroigalama koje dovode do formiranja pora mikrometarskih dimenzija u koži, i tako olakšavaju pasivnu difuziju leka kroz kožu, je prepoznat kao obećavajući pristup. Interesantno, dimenzije pora su mnogo veće u odnosu na dijametar kapi nanoemulzija, te je realno očekivati da kapi nanoemulzija, intaktne prođu kroz SC do dubljih slojeva kože, čime se može potencijalno poboljšati isporuka leka inkorporiranog u nanoemulzije. Međutim, u literaturi su ograničeni podaci o efektima kombinovane primene čvrstih mikroigala i nanoemulzija.

U skladu sa prethodnim navodima, cilj ove doktorske disertacije bio je razvoj, optimizacija i sveobuhvatna fizičko-hemijska i biofarmaceutska karakterizacija ulje-u-vodi (U/V) nanoemulzija, kao i konvencionalnih (mikrostrukturiranih) emulzionih sistema na bazi prirodnih polihidroksilnih surfaktanata (saharozni estri, mešani emulgator iz grupe alkil poliglukozida) za (trans)dermalnu isporuku aceklofenaka, kao model lekovite supstance iz grupe NSAIL, kako bi se procenio uticaj stepena disperziteta emulzionih sistema, kao i stanja leka (suspendovan/rastvoren), na isporuku NSAIL u/kroz kožu. Drugim rečima, cilj je bio da se primenom različitih in vitro i in vivo metoda dobije uvid u uticaj varijacija u sastavu formulacije svakog od tipova odabranih sistema (tradicionalni vs. surfaktanti novije generacije, prisustvo/odsustvo hemijskih pojačivača penetracije) na dermalnu raspoloživost aceklofenaka, kao i da se proceni potencijalni značaj primene naprednih sistema, kao što su nanoemulzije, u odnosu na emulzione sisteme koji se jednostavno mogu izraditi u uslovima apoteke. Dodatno, imajući na umu izuzetna barijerna svojstva kože (pre svega SC-a), značajno je proceniti i da li se predtretmanom kože čvrstim mikroiglama može značajno poboljšati isporuka aceklofenaka kroz kožu iz nanoemulzionih sistema, odnosno da li se kombinovanom primenom nanoemulzija i mikroigala može obezbediti efikasna i produžena (trans)dermalna isporuka NSAIL.

Kako bi se realizovao cilj doktorske disertacije odnosno navedeni ciljevi, eksperimentalni rad u okviru ove doktorske disertacije podeljen je u četiri faze, sa sledećim pojedinačnim ciljevima:

Cilj **prve faze eksperimentalnog rada** bio je da se formulišu i optimizuju nanoemulzije na bazi prirodnih surfaktanata kao nosači za aceklofenak, model slabo rastvorljive lekovite supstance iz grupe NSAIL. U tom smislu, kako kvalitet

nanoemulzija zavisi ne samo od sastava formulacije, već i od uslova izrade, tokom procesa razvoja, nakon odgovarajućih preliminarnih ispitivanja i odabira biokompatibilnih ekscipijenasa, primenom kombinovanog smeša–proces eksperimentalnog dizajna, cilj je bio da se ispita uticaj sastava smeše surfaktanata (lecitin iz jajeta, saharoza palmitat, saharoza stearat), procesnih parametara (pritisak i broj ciklusa homogenizacije), prisustva/odsustva aceklofenaka, i njihovih interakcija na kritične attribute kvaliteta (CQA) nanoemulzija (veličina kapi i PI). Nakon detaljne analize i kvantifikacije efekata svake pojedinačne promenljive i njihovih interakcija, cilj je bio da se izvrši optimizacija sastava formulacije i uslova izrade kako bi se dobile nanoemulzije optimalnih/željenih karakteristika (najmanja veličina kapi i uska distribucija kapi po veličini). Odabrane optimalne nanoemulzije dalje su podvrgnute detaljnoj fizičko-hemijskoj karakterizaciji i proceni stabilnosti, kako bi se dobio dodatni uvid u pogodnost primene razvijenih nanoemulzija kao nosača za aceklofenak. Optimalne nanoemulzije aceklofenaka i odgovarajući placebo uzorci detaljno su okarakterisane u pogledu veličine kapi (foton korelaciona spektroskopija, laserska difrakcija, svetlosna/polarizaciona mikroskopija), zeta potencijala (merenje elektroforetske pokretljivosti i izračunavanje zeta potencijala), morfoloških karakteristika (mikroskopija atomskih sila), viskoziteta (reološka merenja), pH vrednosti, električne provodljivosti, lek-nosač interakcija (diferencijalna skenirajuća kalorimetrija, FTIR spektroskopija). Kako je aceklofenak slaba kiselina (pKa 4,7) i pokazuje pH zavisnu rastvorljivost, dodatno je sprovedena analiza uticaja različitih tipova vodene faze (fosfatni pufer pH 5,8, acetatni pufer pH 4,1, ultračista voda) na karakteristike i stabilnost nanoemulzija tokom 6 meseci čuvanja na sobnoj temperaturi ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), u cilju odabira odgovarajuće vodene faze koja će omogućiti njegovo zadržavanje u uljanoj fazi, kao i odgovarajuću stabilnost sistema. U cilju procene dugoročne fizičko-hemijske stabilnosti, relevantna ispitivanja odabranih nanoemulzija sprovedena su inicijalno, nakon tri meseca i nakon godinu dana čuvanja na sobnoj temperaturi ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) i u frižideru ( $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Dodatno, s obzirom da je aceklofenak relativno nestabilan, posebna pažnja usmerena je ka proceni sposobnosti razvijenih nanoemulzija da očuvaju njegovu hemijsku stabilnost tokom godinu dana čuvanja na različitim temperaturama (sobna temperatura vs. frižider). Na kraju, sprovedena je preliminarna procena bezbednosnog profila razvijenih nanoemulzija aceklofenaka in

vivo na zdravim dobrovoljcima primenom savremenih biofizičkih tehnika, u tzv. 24-časovnoj studiji pod okluzijom. U cilju poređenja, paralelno sa nanoemulzijama kostabilizovanim saharoznim estrima, izrađene su i sveobuhvatno okarakterisane placebo i nanoemulzije aceklofenaka stabilizovane smešom lecitina i polisorbata 80 (kombinacija emulgatora koja je u literaturi najčešće korišćena za izradu nanoemulzija).

**Cilj druge faza eksperimentalnog rada** bio je procena mogućnosti primene „*ready-to-use*“ podloge na bazi polihidroksilnog surfaktanta (alkil poliglukozidni (APG) mešani emulgator – cetearil glukozid i cetearil alkohol) kao odgovarajućeg surogata za široko korišćene podloge farmakopejskog kvaliteta (npr. Nejonski hidrofilni krem po DAB ili MF2008) u izradi magistralnih lekova. U tom smislu, u odsustvu odgovarajućih regulatornih smernica za podloge koje se mogu izraditi u industrijskim uslovima, a namenjene su izradi magistralnih lekova, primenjen je pristup sličan onome koji se tokom poslednjih nekoliko godina intenzivno ispituje za pojednostavljenje razvoja generičkih polučvrstih preparata i poređenje sa odgovarajućim referentnim preparatom dokazanog kvaliteta, efikasnosti i bezbednosti. Naime, nakon detaljnog uvida u mikrostrukturu uzoraka izrađenih suspendovanjem aceklofenaka u podlogu na bazi APG emulgatora i referentu podlogu (Nejonski hidrofilni krem, DAB) primenom polarizacione mikroskopije i konfokalne Raman spektroskopije, sprovedena je karakterizacija atributa kvaliteta koji su odabrani kao kritični, odnosno za koje je očekivano da mogu značajno da utiču na isporuku aceklofenaka u/kroz kožu i posledično, na njegove terapijske performanse: količina aceklofenaka rastvorena u podlozi (određivanjem saturacione koncentracije), pH vrednost, reološke karakteristike i način distribucije vode (termogravimetrijskom analizom i merenjem električne provodljivosti). Dodatno, kako je aceklofenak slabo rastvoran u vodi, od posebnog značaja je bilo proceniti da li dodatak korastvarača/penetracionih inhensera (izopropanol vs. glicerol) utiče na mikrostrukturu APG podloge, kao i da li eventualno prisutne promene u mikrostrukturi utiču na vrednosti odabranih CQA, i kasnije, posledično, na in vitro/in vivo sudbinu aceklofenaka. Iako su lekovi izrađeni u apoteci prevashodno namenjeni za upotrebu odmah ili tokom kraćeg vremenskog perioda, u cilju redukcije troškova pacijenta (posebno kod hronične terapije) značajno je bilo proceniti stabilnost ispitivanih uzoraka tokom dužeg vremenskog perioda, posebno

imajući na umu da je aceklofenak relativno nestabilan lek. Stoga, relevantna ispitivanja izrađenih uzoraka su sprovedena tokom tri meseca čuvanja na sobnoj temperaturi ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

Aktivnosti **treće faze eksperimentalnog rada** usmerene su ka sistematičnoj proceni dermalne raspoloživosti aceklofenaka iz uzoraka formulisanih tokom prve i druge faze istraživanja. Kako je oslobađanje aceklofenaka iz nosača važan korak koji prethodi difuziji u/kroz kožu, prvo je sprovedeno uporedno određivanje *in vitro* profila oslobađanja primenom vertikalnih difuzionih i imerzionih ćelija, u cilju (i) identifikacije adekvatne metode za ovu vrstu ispitivanja kao i (ii) detekcije potencijalnih razlika u *in vitro* brzini oslobađanja aceklofenaka iz razvijenih formulacija. Dalje, kako bi se odredili penetracioni profili i dobio određeni uvid u dermalnu raspoloživost aceklofenaka, cilj ove faze istraživanja između ostalog bio je razvoj detaljnog protokola *tape stripping* metode na koži uha svinje u pogledu odabira: 1) odgovarajuće metode za procenu integriteta kožne barijere, 2) uslova i dužine čuvanja ušiju nakon žrtvovanja svinje, 3) maksimalne dužine kontakta ispitivane formulacije sa kožom, 4) načina vršenja pritiska na adhezivnu traku i 5) postupka ekstrakcije aceklofenaka iz uklonjenih slojeva SC, sa krajnjim ciljem da se pojednostavi protokol *tape stripping* procedure koja se uobičajeno sprovodi na ljudima (pre svega izbegavanje kompleksne dokumentacije neophodne za dobijanje dozvole Etičkog komiteta za ispitivanja na ljudima). Nakon optimizacije protokola, *tape stripping* metoda na koži uha svinje je korišćena sa ciljem da se proceni uticaj stepena disperziteta (nano- vs. mikrostrukturirani sistemi) i stanja leka (rastvoren vs. kristalni oblik aceklofenaka) na dermalnu raspoloživost aceklofenaka pri *infinite* i *finite dose* uslovima. Uporedno je sproveden i *tape stripping* na ljudima kako bi se procenila pogodnost kože uha svinje za sprovođenje komparativnih studija čiji je cilj poređenje penetracije leka u kožu iz Q1/Q2/Q3 neekvivalentnih formulacija. Polazeći od pretpostavke da se kapi nanoemulzija, analogno nanočesticama, mogu u značajnom stepenu akumulirati u folikulima dlake, pažnja je usmerena i ka razvoju metode cijanoakrilatne biopsije kože uha svinje, kako bi se dobio uvid u značaj folikularnog puta transporta u penetraciji leka iz nanoemulzija (sa i bez masiranja kože prilikom aplikacije uzoraka nanoemulzija). Sa druge strane, u cilju: (i) razumevanja fenomena koji su uključeni u penetraciju aceklofenaka u SC iz konvencionalnih

mikrostrukturiranih emulzionih sistema, kao i (ii) procene obima i (iii) brzine isporuke aceklofenaka u kožu iz različitih formulacija, primenjen je koncept za matematičku analizu dobijenih profila koncentracije aceklofenaka u funkciji relativnog položaja u SC-u (fitovanjem u matematičku jednačinu koja opisuje II Fick-ov zakon difuzije, kao i njenim integraljenjem duž ukupne debljine SC), čime je omogućeno izračunavanje odgovarajućih dermofarmakokinetičkih parametara. Na kraju, sprovedeno je in vitro ispitivanje permeacije aceklofenaka primenom Franz-ovih difuzionih ćelija i to (i) kroz toplotom izolovani epidermis kože uha svinje, i (ii) *dermatomed* kožu uha svinje (debljina 1 mm), sa ciljem da se razmotre dobijeni rezultati i proceni moguća korelacija sa podacima dobijenim primenom *tape stripping* metode. Drugim rečima, cilj je bio, između ostalog, da se proceni značaj kombinovanja ovih (dermo)farmakokinetičkih metoda u komparativnoj proceni biološke raspoloživosti i/ili ekvivalentnosti preparata za primenu na koži koji nisu Q1/Q2/Q3 ekvivalentni.

Na kraju, **cilj četvrte faze eksperimentalnog rada** bio je procena čvrstih mikroigala da poboljšaju isporuku aceklofenaka u/kroz kožu iz formulacija nanoemulzija sa zadovoljavajućom fizičko-hemijskom stabilnošću i potvrđenom efikasnošću u isporuci aceklofenaka u/kroz kožu in vitro i in vivo. U tom smislu, nakon razvoja aplikatora i odgovarajuće tehnike aplikacije, sprovedena je procena efikasnosti penetracije u kožu dva tipa čvrstih mikroigala (silikonske ImmuPatch mikrogile vs. AdminPatch<sup>®</sup> 600 mikroigle, obe dužine 500  $\mu\text{m}$ ) 1) vizuelno, u studiji bojenja kože uha svinje metilenskim plavim odmah nakon uklanjanja mikroigala kao i 2) merenjem TEGV kože uha svinje pre aplikacije i odmah nakon uklanjanja mikroigala. Konačno, sprovođenjem in vivo farmakokinetičkih studija na pacovima soja Wistar i određivanjem ukupne količine aceklofenaka deponovane u koži na kraju eksperimenta, cilj je bio da se odrede farmakokinetički profili i proceni da li se primenom nanoemulzija može postići efikasna transdermalna isporuka aceklofenaka, sa i bez tretmana kože čvrstim mikroiglama, kao i da se dobije uvid u značaj sastava ulje–voda međupovršinskog filma na stepen/obim i brzinu isporuke aceklofenaka u kožu i kroz kožu u sistemsku cirkulaciju in vivo.

### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

#### 3.1 Materijali

Za izradu placebo i nanoemulzija sa aceklofenakom (Jinan Jiaquan Chemical Co., Ltd, Jinan, Kina) korišćeni su sledeći ekscipijensi: trigliceridi srednje dužine lanca (MCT) (Saboderm TCC, Sabo S. p. A, Levate, Italija); ricinusovo ulje (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemačka); lecitin iz jajeta (Lipoid E 80) odnosno fosfolipidi iz jajeta koji sadrže 80% fosfatidilholina (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Nemačka); saharoza palmitat P-1670 (SP) sa približno 80% monoestara, 17% diestara i 3% triestara (Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation, Tokio, Japan); saharoza stearat S-970 (SS) sa približno 48% monoestara, 34% diestara, 14% triestara i 4% tetraestara (Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation); polisorbitat 80 i butilhidroksitoluen (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Nemačka); sveže dobijena ultračista voda (voda, visokoprečišćena) (TKA GenPure, TKA Wasseranbereitungssysteme GmbH, Nemačka).

Sa druge strane, za izradu mikrostrukturiranih emulzionih sistema, sa i bez aceklofenaka, korišćeni su i sledeći ekscipijensi: APG emulgator (Sepineo SE<sup>®</sup>68) – cetearil glukozid i cetearil alkohol (Seppic, Pariz, Francuska); polisorbitat 60, cetostearil alkohol, beli vazelin i glicerol (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Nemačka); izopropanol (Brenntag, Beč, Austrija). Sve ostale hemikalije i reagensi korišćeni u ekperimentalnom radu bili su farmakopejskog (Ph. Eur, USP) ili hromatografskog (HPLC) kvaliteta i korišćeni su bez daljeg prečišćavanja.

#### 3.2 Metode i oprema

##### Prva faza eksperimentalnog rada

##### 3.2.1 Ispitivanje rastvorljivosti aceklofenaka

Rastvorljivost aceklofenaka u ultračistoj vodi, odabranim čistim uljima (sojino ulje, izopropil miristat, MCT, ricinusovo ulje), smešama ulja (MCT – ricinusovo ulje u odnosu 1:1, 2:1 i 3:2, m/m), kao i smešama ulja i lecitina iz jajeta (MCT – ricinusovo



ulje – lecitin iz jajeta u odnosu 10:10:0,5, 10:10:1 i 10:10:2, m/m) određena je *shake flask* metodom. Ukratko, aceklofenak je dodat u višku u 5 ml svakog od ispitivanih medijuma, a zatim su dobijene smeše mešane na orbitalnom šejkeru (IKA<sup>®</sup> KS 260 basic; IKA<sup>®</sup> Werke GmbH & Company KG, Staufen, Nemačka) pri brzini 250 rpm, na temperaturi od  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  tokom 48 h radi postizanja ravnoteže. Nakon toga, uzorci su centrifugirani (Centrifuge MPW-56; MPW Med. Instruments, Varšava, Poljska) na 3000 rpm tokom 30 min, kako bi se istaložili kristali nerastvornog aceklofenaka. Alikvot supernatanta je razblažen metanolom, a zatim je koncentracija aceklofenaka određena primenom spektrofotometra Evolution 300 (Thermo Fisher Scientific, SAD) na 274 nm. Kalibraciona kriva aceklofenaka u metanolu je bila linearna u opsegu 10–25  $\mu\text{g/ml}$  ( $r^2=0,9988$ ).

### **3.2.2 Izrada nanostrukturiranih emulzionih sistema**

Sve ispitivane nanoemulzije na bazi saharoznih estara izrađene su metodom tople ( $50^{\circ}\text{C}$ ) HPH metode korišćenjem EmulsiFlex-C3 homogenizatora (Avestin Inc., Otava, Kanada). Sastav ispitivanih uzoraka je predstavljen u tabeli 3.1. Pre homogenizacije, uljana i vodena faza pripremljene su odvojeno. Uljana faza, koja se sastojala od smeše MCT i ricinusovog ulja pri odnosu 1:1 (20% u ukupnoj emulziji), lecitina iz jajeta (1–2%) i butilhidroksitoluena (0,05%), zagrejana je na temperaturu od  $70^{\circ}\text{C}$  uz slabo mešanje na magnetnoj mešalici (RH basic 2 IKAMAG<sup>®</sup> Magnetic Stirrer, IKA<sup>®</sup> Werke GmbH & Company KG) do potpunog rastvaranja lecitina, a zatim je ohlađena na temperaturu izrade nanoemulzija ( $50^{\circ}\text{C}$ ). Vodena faza, koja je sadržala SP i/ili SS, pripremljena je dužim zagrevanjem na temperaturi od  $70^{\circ}\text{C}$  uz mešanje na magnetnoj mešalici, do potpunog rastvaranja odabranih saharoznih estara, a zatim je ohlađena na temperaturu izrade nanoemulzija od  $50^{\circ}\text{C}$ . Pripremljene faze jednakih temperatura su zatim pomešane dodavanjem uljane u vodenu fazu i izrađena je preemulzija mešanjem na rotor-stator homogenizeru (Ultra-Turrax<sup>®</sup> T25 digital, IKA<sup>®</sup> Werke GmbH & Company KG) na 8000 rpm tokom 3 min. Dobijena preemulzija je podvrgnuta dalje homogenizaciji pod visokim pritiskom, uz variranje pritiska (500/800 bar) i broja ciklusa homogenizacije (15/20). Prilikom izrade nanoemulzija sa aceklofenakom, primenjena je identična procedura, s tim što je tek nakon hlađenja uljane faze na

temperaturu od 50°C, dodat aceklofenak kao čista supstanca u finalnoj koncentraciji od 1%, uz mešanje na magnetnoj mešalici.

**Tabela 3.1.** Sastav ispitivanih placebo ( $L_{1-2}S_{0-2}P_{0-2}$ ) i nanoemulzija aceklofenaka ( $L_{1-2}S_{0-2}P_{0-2}A$ ) na bazi saharoznih estara, izrađenih variranjem sastava smeše surfaktanata i procesnih parametara, kao i odgovarajućeg referentnog uzorka kostabilizovanog polisorbatom 80, sa ( $L_2P80_2A$ ) i bez ( $L_2P80_2$ ) aceklofenaka.

Ekscipijensi/lekovita supstanca	$L_{1-2}S_{0-2}P_{0-2}/$	$L_2P80_2/$
	$L_{1-2}S_{0-2}P_{0-2}A^*$	$L_2P80_2A^*$
<i>Uljana faza</i>		
Trigliceridi srednje dužine lanca	10	10
Ricinusovo ulje	10	10
Butilhidroksitoluen	0,05	0,05
Lecitin iz jajeta	1–2	2
Aceklofenak	–/1	–/1
<i>Vodena faza</i>		
Saharoza palmitat P-1670	0–2	/
Saharoza stearat S-970	0–2	/
Polisorbat 80	/	2
Ultračista voda do	100	100

\* Oznake korišćene za ispitivane uzorke ukazuju na kvalitativni i kvantitativni sastav smeše surfaktanata upotrebljenih za stabilizaciju nanoemulzija (npr. L sa indeksom 1–2 znači da je koncentracija lecitina u ispitivanim uzorcima varirala od 1 do 2%; S sa indeksom 0–2 znači da je koncentracija SS u ispitivanim uzorcima varirala od 0 do 2%, P sa indeksom 0–2 znači da je koncentracija SP varirala od 0 do 2%, P80 sa indeksom 2 znači da je koncentracija polisorbata 80 u referentnom uzorku bila 2%, i A označava da je prisutan aceklofenak).

Referentni uzorak, sa i bez aceklofenaka, stabilizovan smešom lecitina iz jajeta (2%) i polisorbata 80 (2%), izrađen je u skladu sa opisanom, ali malo izmenjenom procedurom. Zahvaljujući boljoj rastvorljivosti polisorbata 80 u vodi, vodena faza je pripremljena rastvaranjem polisorbata 80 uz mešanje na magnetnoj mešalici, a zatim je

zagrejana na temperaturu od 50°C. Gruba emulzija, izrađena dodatkom vodene u uljanu fazu i mešanjem na rotor-stator homogenizeru (8000 rpm, 3 min), propuššana je zatim kroz homogenizator pod visokim pritiskom diskontinuiranim postupkom, tokom 10 ciklusa homogenizacije, pri pritisku od 800 bar i temperaturi od 50°C.

Dobijene nanoemulzije čuvane su u dobro zatvorenim staklenim bočicama sa aluminijumskom kapicom, a nakon 24 h je sprovedena njihova sveobuhvatna fizičko-hemijska i biofarmaceutska karakterizacija. Sva merenja su izvedena u triplikatu.

### **3.2.3 Metodologija eksperimentalnog dizajna – kombinovani smeša-proces eksperimentalni dizajn**

U cilju odabira optimalnog sastava formulacije/smeše surfaktanata i uslova izrade nanoemulzija, tokom razvoja formulacije, optimalni plan eksperimenata kreiran je primenom kompjuterski generisanog kombinovanog smeša-proces eksperimentalnog dizajna. U sastav smeše surfaktanata, ulazila su tri emulgatora – lecitin iz jajeta (A), SP (B) i SS (C) – pri čemu je ukupni udeo smeše u nanoemulzijama iznosio 4%, ali se razlikovao udeo navedenih emulgatora u samoj smeši. Naime, na osnovu opsežnih preliminarnih ispitivanja, udeo lecitina iz jajeta variran je u opsegu od 1 do 2%, dok je udeo SP i SS variran između 0 i 2%. Usled postavljenih ograničenja, uticaj svake od komponenti smeše nije testiran samostalno. Zapravo, praćen je uticaj različitih binarnih i ternarnih smeša surfaktanata, koje su uvek u svom sastavu sadržale lecitin iz jajeta.

Pored smeše surfaktanata, praćen je istovremeno i uticaj dve procesne varijable – pritisak homogenizacije (D) i broj ciklusa homogenizacije (E), kao i jedne kategoričke varijable – prisustvo aceklofenaka (E), kao model lekovite supstance. Za razliku od komponenti smeše, svaki od navedenih faktora variran je na dva nivoa, nezavisno jedan od drugog, kao i od sastava smeše surfaktanata.

Kako bi se istovremeno ispitao uticaj smeše surfaktanata i procesnih parametra na odabrane odgovore sistema (zavisno promenljive) i to, veličinu kapi i PI, kombinovani smeša-proces eksperimentalni dizajn kreiran je ukrštanjem trokomponentnog *simplex-centroid* dizajna smeše sa klasičnim  $2^3$  faktorskim dizajnom. U skladu sa primenjenim D-optimalnim algoritmom, generisane su i randomizovano izvedene 52 eksperimentalne probe, uključujući i 5 ponavljanja radi procene eksperimentalne greške. Plan

eksperimenata, kao i vrednosti praćenih odgovora za svaki od eksperimenata predstavljeni su u tabeli 4.1.2.

Dobijeni eksperimentalni podaci uklapani su u odgovarajući model (*Scheffé* tip kvadratnog polinomskog modela za komponente smeše pomnožen sa polinomskim (faktorskim) modelom dvofaktorskih interakcija prvog reda za procesne varijable) čiji opšti oblik je opisan sledećom jednačinom:

$$y(x, z) = \sum_{i=1}^3 \gamma_i^0 x_i + \sum_{i<j}^3 \gamma_{ij}^0 x_i x_j + \sum_{l=1}^3 \left[ \sum_{i=1}^3 \gamma_i^l x_i + \sum_{i<j}^3 \gamma_{ij}^l x_i x_j \right] z_l + \sum_{l<m}^3 \left[ \sum_{i=1}^3 \gamma_i^{lm} x_i + \sum_{i<j}^3 \gamma_{ij}^{lm} x_i x_j \right] z_l z_m \quad (3.1.1)$$

gde je  $y$  praćeni odgovor (zavisna promenljiva);  $x_i$  i  $x_j$  predstavljaju komponente smeše ( $i, j = 1, 2, 3; i < j$ );  $z_l$  i  $z_m$  predstavljaju procesne varijable ( $l, m = 1, 2, 3; l < m$ );  $\gamma_i^0$  i  $\gamma_{ij}^0$  su linearni i nelinearni koeficijenti uz komponente smeše, respektivno;  $\gamma_i^l$ ,  $\gamma_{ij}^l$ ,  $\gamma_i^{lm}$ , i  $\gamma_{ij}^{lm}$  predstavljaju koeficijente pridružene interakcijama smeše surfaktanta i procesnih varijabli (Cornell, 2002).

Dodatno su sprovedene numerička i grafička optimizacija, kako bi se pronašao optimalni sastav smeše surfaktanata kao i vrednosti procesnih parametara koji daju optimalne/željene vrednosti odabranih odgovora (veličina kapi i PI). Obrada rezultata dobijenih na osnovu definisanog plana eksperimenata kao i odgovarajuća statistička analiza (analiza varijanse, ANOVA) dobijenih podataka sprovedene su korišćenjem Design-Expert<sup>®</sup> softverskog paketa (verzija 9.0.1 trial; Stat-Ease Inc., Minesota, SAD). Matematički model koji najbolje opisuje zavisnost između ispitivanih varijabli i praćenih odgovora nanoemulzija određen je na osnovu statistički značajnih članova modela ( $p < 0,05$ ), neznačajnog *lack of fit* ( $p > 0,05$ ), najviših vrednosti koeficijenta determinacije ( $R^2$ ), prilagođenog koeficijenta determinacije (engl., *adjusted R<sup>2</sup>* (Adj  $R^2$ )) kao i najnižih vrednosti standardne devijacije i predviđene rezidualne sume kvadrata (Savić, 2017). U cilju boljeg tumačenja interakcija, kao i lakšeg razumevanja efekata smeše pri promeni nivoa procesnih parametara i odabrane kategoričke varijable (prisustvo/odsustvo aceklofenaka), dobijeni rezultati su predstavljeni i grafički, u vidu

dvodimenzionalnih konturnih dijagrama i trodimenzionalnih dijagrama površine odgovora koji prikazuju ispitivane odgovore (veličina kapi, PI).

### 3.2.4 Određivanje dinamičkog međupovršinskog napona

Kako bi se dobio određeni uvid u lokalizaciju aceklofenaka u razvijenim nanoemulzijama, sprovedeno je merenje dinamičkog međupovršinskog napona između ultračiste vode i uljane faze (smeša MCT i ricinusovog ulja u odnosu 1:1), kao i između ultračiste vode i uljane faze u kojoj je rastvoren aceklofenak u koncentraciji 10 mg/ml. Merenja su vršena u periodu od 1 do 1800 s nakon formiranja kapi, primenom tehnike viseće kapi (engl., *pendant drop technique*) pomoću PAT1 tenziometra (SINTERFACE Technologies, Nemačka). Ova metoda se zasniva na fitovanju eksperimentalno određenih koordinati oblika kapi teorijskim profilom kapi koji je opisan Gauss-Laplace jednačinom (Wollenweber i sar., 2000). Važno je napomenuti da su prilikom merenja, uljane kapi formirane na vrhu kapilare uronjene u kivetu ispunjenu ultračistom vodom. Tokom merenja održavana je konstantna temperatura od 30°C. Svako merenje je ponovljeno tri puta. Vrednost ravnotežnog međupovršinskog napona ( $\gamma_{eq}$ ) određena je ekstrapolacijom sa grafika izmerenog međupovršinskog napona u funkciji vremena.

### 3.2.5 Određivanje veličine kapi ispitivanih nanoemulzija

Analiza veličine kapi svih ispitivanih formulacija nanoemulzija sprovedena je tehnikom dinamičkog rasipanja svetlosti (DLS) (sin., foton korelaciona spektroskopija), korišćenjem uređaja Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Velika Britanija). Ovom tehnikom određeni su hidrodinamički prosečan dijametar kapi (engl., *intensity-weighted mean diameter, Z-average diameter*) i PI, kao mera za raspodelu kapi po veličini. Princip rada ovog uređaja zasniva se na merenju stepena fluktuacije intenziteta rasute svetlosti uzrokovane Braunovim kretanjem kapi, a koji se dalje prevodi u veličinu kapi pomoću Stokes–Einstein jednačine ugrađene u softver uređaja (Malvern Dispersion Technology Software – DTS (Nano), verzija 5.00) (Klang i Valenta, 2011; Savić, 2017). Generalno, DLS tehnika se smatra izuzetno pogodnom za karakterizaciju nanonosaa. Međutim, tokom merenja, problem može da nastane usled nepravilnog oblik čestica i prisustva različitih populacija čestica (Fattal i Vauthier, 2002). Kako bi se postigao

optimalni intenzitet rasipanja svetlosti i smanjio uticaj viskoziteta i gustine nanoemulzija na rezultate merenja (Klang i Valenta, 2011), neposredno pre merenja, svi uzorci nanoemulzija su razblaženi ultračistom vodom (1:1000, v/v). Merenja su sprovedena na temperaturi od 25°C pri uglu od 90°, primenom He–Ne lasera na 633 nm. S obzirom da se primenom DLS metode ne može određivati dijametar čestica većih od 3 μm (merni opseg korišćenog uređaja je od 3 nm do 3 μm), kako bi se detektovalo eventualno prisustvo većih, mikrometarskih kapi, dodatna karakterizacija je sprovedena tehnikom statičkog rasipanja svetlosti (sin., laserska difrakcija (LD)), uz primenu uređaja Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd.) sa softverom Malvern 2000, verzija 5.22. Merenja su vršena na 25°C, primenom ultračiste vode kao medijuma za dispergovanje kapi nanoemulzija. Mie teorija je korišćena za analizu dobijenih podataka. Kao kritični parametri ovog dela karakterizacije nanoemulzija korišćeni su volumenski dijometri kapi (engl., *volume-weighted diameters*) i to  $d(0.5)$ ,  $d(0.9)$ ,  $D[4.3]$  i  $D_{max}$ . Dobijene vrednosti predstavljaju procenat kapi u datoj zapremini uzorka koji poseduje manju veličinu od određene vrednosti. Na primer,  $d(0.9)$  znači da 90% zapremine uzorka ima veličinu kapi manju od  $d(0.9)$  vrednosti, dok  $D_{max}$  znači da sve kapi ispitivane nanoemulzije imaju veličinu manju od  $D_{max}$  vrednosti. Iako se vrednost  $d(0.9)$  smatra osetljivim parametrom za utvrđivanje prisustva većih kapi (Savić, 2017), vrednost  $D_{max}$  je neophodna za detekciju eventualno prisutne bimodalne distribucije kapi po veličini koja se može javiti usled *over-processing-a* (Jumaa i Müller, 1998a).

### **3.2.6 Mikroskopska analiza ispitivanih nanoemulzija**

Svetlosna/polarizaciona mikroskopska analiza sprovedena je korišćenjem Carl Zeiss ApoTome Imager Z1 mikroskopa (Zeiss, Nemačka), integrisanim sa AxioCam ICc1 digitalnom kamerom i AxioVision 4.6 softverskim paketom. Mala količina nerazblaženog uzorka sa vrha, iz sredine i sa dna ispitivanih nanoemulzija postavljena je na mikroskopsku pločicu i odmah posmatrana pod mikroskopom, kako bi se detektovalo eventualno prisustvo većih kapi, agregata kapi i posebno, kristala nerastvornog aceklofenaka. Uzorci su posmatrani pod uveličanjima 100×, 200× i 400×. Kako bi se potvrdili rezultati merenja veličine kapi i dobio dalji uvid u morfološke karakteristike odabranih optimalnih nanoemulzija sprovedena je mikroskopija atomskih sila (AFM) (engl., *atomic force microscopy*) korišćenjem NTEGRA prima mikroskopa

sa skenirajućom sondom, odnosno mikroskopa atomskih sila (NT-MDT, Rusija). Pre merenja, uzorak nanoemulzije je razblažen ultračistom vodom u odnosu 1:500, v/v, a zatim je kap konstantne zapremine (30  $\mu$ l) direktno naneta na mika pločicu dijametra 15 mm i debljine 0,21 mm (Highest Grade V1 Mica Discs, Ted Pella Inc., Kalifornija). Nakon 2 min, višak vode je uklonjen pomoću filter papira, a uzorci osušeni na vazduhu tokom 2 h na sobnoj temperaturi. Merenja su sprovedena na vazduhu, u naizmeničnom kontaktnom modu (engl., *intermittent-contact mode*), pri čemu su korišćene NT-MDT NSGO1 silikonske, N-tipa, antimonom obogaćene, zlatom obložene sonde (gredice) sa sledećim parametrima: konstanta nominalne sile 5,1 N/m, pokretačka frekvencija 156 kHz, i skenirajuća frekvencija 1 Hz. Dobljene mikrografije (slike topografije i „signala greške“) analizirane su korišćenjem Image Analysis 2.2.0 softverskog paketa (NT-MDT, Rusija).

### **3.2.7 Određivanje zeta potencijala**

Zeta potencijal, kao mera za površinsko naelektrisanje kapi, određen je korišćenjem uređaja Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd.). U osnovi je merenje elektroforetske pokretljivosti kapi nanoemulzija u električnom polju, koja je dalje konvertuje u zeta potencijal pomoću Helmholtz–Smoluchowski jednačine, ugrađene u softver uređaja. Kako razblaživanje uzoraka ultračistom vodom može da dovode do fluktuacija u električnoj provodljivosti (Klang i Valenta, 2011), merenja su sprovedena na 25°C, nakon razblaženja (1:500, v/v) sa ultračistom vodom čija električna provodljivost je podešena na 50  $\mu$ S/cm pomoću 0,9% (m/v) rastvora natrijum-hlorida. Takođe, kako prisustvo suprotno naelektrisanih jona može negativno da utiče na fizičku stabilnost naelektrisanih nanokapi (Klang i Valenta, 2011), merenje je sprovedeno neposredno nakon odgovarajućeg razblaženja uzorka.

### **3.2.8 Reološka analiza**

Reološke karakteristike ispitivanih nanoemulzija aceklofenaka i odgovarajućih placebo analizirane su primenom Elite-R rotacionog viskozimetra (Fungilab S.A., Barselona, Španija) podržanog Supervisc softverom (Fungilab S.A.). Merenja su sprovedena pomoću adaptera za tečnosti niskog viskoziteta (LCP), pri opsegu brzina rotiranja od

100 do 200 rpm i temperaturi  $20 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ . Prividni viskozitet, očitani pri maksimalnoj brzini rotiranja, korišćen je dalje za karakterizaciju uzoraka nanoemulzija i procenu njihove stabilnosti.

### **3.2.9 Merenje pH vrednosti i električne provodljivosti**

pH vrednost nanoemulzija merena je na  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pomoću HI 9321 pH metra (Hanna Instruments Inc., Mičigen, SAD), direktnim uranjanjem staklene elektrode pH metra u ispitivane uzorke. Takođe, merenje električne provodljivosti sprovedeno je na  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , uranjanjem elektrode konduktometra sensION<sup>TM</sup>+EC71 (ShangHai Shilu Instruments Co., Ltd., Kina) u ispitivane nanoemulzije.

### **3.2.10 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)**

Kako bi se dobio detaljniji uvid u fizičko stanje aceklofenaka u ispitivanim nanoemulzijama, kao i u eventualno prisutne interakcije aceklofenaka sa ostalim komponentama nanoemulzija izvršena je procena termalnog ponašanja čistog aceklofenaka, optimalnih nanoemulzija aceklofenaka i odgovarajućih placebo primenom DSC metode, uz korišćenje uređaja Mettler DSC 820 (Mettler Toledo GmbH Analytical, Giessen, Nemačka). Ispitivani uzorci (približno 10 mg) precizno su izmereni (analitička vaga XP205 DeltaRange<sup>®</sup> (Mettler Toledo, Nemačka)) u standardnim aluminijumskim lončićima, koji su dalje, odmah nakon merenja, hermetički zatvoreni. Uzorci su potom zagrevani u opsegu od  $25^{\circ}\text{C}$  do  $200^{\circ}\text{C}$ , brzinom  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , pri konstantnom protoku azota (50 ml/min), sa praznim aluminijumskim lončićem kao referentnim. Dodatno, kako bi se sprečio uticaj isparavanja vode na tačnost dobijenih rezultata, DSC termogrami odabranih optimalnih formulacija nanoemulzija snimljeni su i nakon sušenja uzoraka (10  $\mu\text{l}$ ) u aluminijumskim lončićima tokom 24 h na sobnoj temperaturi. Nakon sušenja, precizno je odmerena masa uzoraka u aluminijumskim lončićima, koji su potom hermetički zatvoreni i podvrgnuti prethodno opisanoj eksperimentalnoj proceduri. Odgovarajući termoanalitički parametri (početna (onset) temperatura, temperatura topljenja, maksimum na krivi topljenja ( $T_{\text{peak}}$ ) i entalpija) određeni su korišćenjem Mettler Toledo STARe softvera.



### **3.2.11 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR spektroskopija)**

FTIR spektroskopija je korišćena kao dodatna tehnika za procenu potencijalnih hemijskih interakcija između aceklofenaka i ostalih komponenti nanoemulzija. FTIR spektri razvijenih nanoemulzija aceklofenaka, odgovarajućih placebo, čistog aceklofenaka i ostalih ekscipijenasa korišćenih za izradu nanoemulzija snimljeni su korišćenjem BOMEM Hartmann & Braun MB-Series FTIR spektrofotometra (ABB Bomem Inc., Kanada). Pre analize, 10  $\mu$ l ispitivanih nanoemulzija naneto je na KRS-5 pločicu i osušeno u vakumu, dok je u slučaju čistog aceklofenaka, za pripremu uzoraka korišćena metoda sa kalijum-bromidom (tehnika KBr pastile). FTIR spektri snimljeni su pri talasnim dužinama od 4000 do 400  $\text{cm}^{-1}$ , sa rezolucijom od 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### **3.2.12 Ispitivanje stabilnosti razvijenih nanoemulzija**

U cilju procene fizičko-hemijske stabilnosti, optimalne formulacije nanoemulzija odabrane na osnovu rezultata kombinovanog smeša-proces eksperimentalnog dizajna podvrgnute su proceni preliminarnе stabilnosti tokom tri meseca čuvanja na sobnoj temperaturi ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ). S obzirom na uočene relativno niske pH vrednosti razvijenih nanoemulzija, dodatno je sprovedena karakterizacija i procena preliminarnе stabilnosti tokom šest meseci čuvanja na sobnoj temperaturi ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) i u frižideru ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ) nanoemulzija izrađenih variranjem tipa vodene faze – fosfatni pufer pH 5,8, acetatni pufer pH 4,1 i ultračista voda. Imajući na umu pH zavisnu rastvorljivost aceklofenaka, dodatno je sprovedeno određivanje ulje-voda (ultračista voda, fosfatni pufer pH 5,8, acetatni pufer pH 4,1) particionog koeficijenta. U tu svrhu, 50 mg aceklofenaka rastvoreno je u 10 ml uljane faze nanoemulzija (smeša MCT i ricinusovog ulja u odnosu 1:1). Zatim je dodata jednaka zapremina ultračiste vode, odnosno odgovarajućeg pufera. Uzorci su ostavljeni da se mešaju na sobnoj temperaturi, na orbitalnom *shaker*-u (IKA® KS 260 basic) tokom 24 h radi postizanja ravnoteže, a zatim su preneti u levak za odvajanje. Nakon razdvajanja vodenog i uljanog sloja, u svakom je određena koncentracija aceklofenaka spektrofotometrijski (Evolution 300 spektrofotometar), merenjem apsorbancije na 274 nm. Uporedo sa uzorkom, rađena je i slepa proba, odnosno, uzorak bez dodatog aceklofenaka.

Nanoemulzije aceklofenaka i odgovarajući placebo uzorci zadovoljavajuće preliminarne stabilnosti podvgnuti su dugoročnoj studiji stabilnosti tokom godina čuvanja na sobnoj temperaturi ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) i u frižideru ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Uporedo sa razvijenim nanoemulzijama na bazi saharoznih estara, praćena je i dugoročna stabilnost referentne nanoemulzije stabilizovane smešom lecitina iz jajeta i polisorbata 80. Tokom preliminarne i dugoročne studije stabilnosti sprovedena su merenja veličine kapi, PI, zeta potencijala, viskoziteta, pH vrednosti i električne provodljivosti primenom prethodno opisanih metoda. Eventualno obrazovanje kristala aceklofenaka tokom čuvanja analizirano je primenom polarizacione mikroskopije i DSC metode. Dodatno, sprovedena je analiza hemijske stabilnosti samog aceklofenaka u ispitivanim formulacijama nanoemulzija. Sadržaj aceklofenaka i njegovog glavnog degradacionog produkta, diklofenaka, određen je nakon rastvaranja 100  $\mu\text{l}$  uzorka nanoemulzije u metanolu, primenom UHPLC-MS/MS metode (videti ispod).

### **3.2.13 Preliminarna procena in vivo iritacionog potencijala nanoemulzija**

Imajući na umu da se primenom nanoemulzija mogu redukovati neželjeni efekti inkorporiranog leka (Jumaa i Müller, 2000), preliminarna procena iritacionog potencijala ispitivanih nanoemulzija aceklofenaka sprovedena je in vivo, primenom neinvazivnih biofizičkih merenja u tzv. studiji pod okluzijom. Praćeni su sledeći parametri kože: 1) eritema indeks (EI) primenom uređaja Mexameter<sup>®</sup> MX 18, 2) transepidermalni gubitak vode (TEGV) primenom aparata Tewameter<sup>®</sup> TM 210 i 3) stepen hidratisanosti (vlažnosti) SC (SCH) primenom uređaja Cutometer<sup>®</sup> MPA 580 (svi proizvođača Courage+Khazaka, Keln, Nemačka). Merenja navedenih parametara sprovedena su pre (bazalne vrednosti) i 3 h nakon 24-časovne okluzije kože tretirane ispitivanim uzorcima.

U studiji je učestvovalo osam dobrovoljaca (žene sa  $24,6 \pm 1,3$  godine) bez istorije kožnih bolesti. Svi ispitanici su prvo detaljno upoznati sa protokolom studije, a zatim nakon potpisivanja odgovarajućeg informisanog pristanka, su uključeni u ispitivanje. Najmanje dva dana pre početka studije, kao i tokom njenog trajanja, ispitanici nisu mogli da koriste kozmetičke proizvode (za negu i čišćenje) na definisanim test mestima. Takođe, nisu smeli da konzumiraju kofeinska pića najmanje 3 sata pre i tokom trajanja eksperimenta. Studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, primenom

protokola odobrenog od strane Etičkog komiteta za biomedicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta u Beogradu (odluka broj 110/2, izdata 20.1.2016. godine).

U cilju eliminisanja potencijalnih greški izazvanih faktorima okruženja, pre početka eksperimenta, ispitanici su proveli 30 min u prostoriji u kojoj je vršeno merenje, kako bi se aklimatizovali na kontrolisane atmosferske uslove ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $45 \pm 5\%$  RH). Nakon inicijalnih merenja, test mesta obeležena na unutrašnjoj strani podlaktice svakog ispitanika ( $3 \times 3 \text{ cm}^2$ ) tretirana su ispitivanim formulacijama nanoemulzija u količini  $25 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ . Na svakoj podlaktici ostavljeno je po jedno test-mesto za netretiranu kontrolu pod okluzijom (NCO) i bez okluzije (NC). Nakon aplikacije uzoraka, test mesta su pokrivena silikonskim okluzivnim filmom (Parafilm<sup>®</sup>, SAD) i fiksirana hipoalergijskom adhezivnom trakom (Sensifix<sup>®</sup>, Galenika, Srbija). Merenja navedenih parametara sprovedena su u skladu sa relevantnim vodičima i smernicama (Fullerton i sar., 1996; Plessis i sar., 2013).

### **Druga faza ekperimentalnog rada**

#### **3.2.14 Izrada mikrostrukturiranih emulzionih sistema**

S obzirom da APG emulgatori zahtevaju specifičnu dinamiku zagrevanja i mešanja kako bi se formirali stabilni emulzioni sistemi, ispitivane podloge stabilizovane smešom cetearil glukozida i cetearil alkohola, izrađene su u skladu sa postupkom prethodno razvijenim od strane Savić i sar. (2005b) i primenjenim od strane Pantelić (2013). Masna faza, koja je sadržala MCT, cetostearil alkohol i APG emulgator je zagrejana na  $70^\circ\text{C}$  i dodata vodenoj fazi (ultračista voda) zagrejanom na  $72\text{--}75^\circ\text{C}$ . Odmah po spajanju faza, započeto je mešanje propelerskom laboratorijskom mešalicom (Heidolph RZR2020, Nemačka), precizno definisanom dinamikom – mešanje je započeto na zagrejanom ploči magnetne mešalice (IKA<sup>®</sup> RH basic, Nemačka), 3 min pri brzini od 700 rpm, a zatim 3 min pri 500 rpm. Potom, staklena čaša u kojoj je ispitivani uzorak izrađivan, je sklonjena sa zagrejanog ploče, i nastavljeno je mešanje brzinom od 300 rpm do hlađenja na sobnu temperaturu. Prilikom izrade podloge sa glicerolom, kao korastvaračem i penetracionim inhenserom, glicerol je odmeren pre izrade, sa ultračistom vodom. Sa druge strane, u slučaju izrade podloge sa izopropanolom, ovaj

korastvarač je inkorporiran u podlogu nakon izrade i hlađenja na temperaturu ispod 40°C. Detaljni sastav ispitivanih uzoraka dat je u tabeli 3.2.

**Tabela 3.2.** Sastav ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema izrađenih suspendovanjem aceklofenaka u podloge na bazi alkil poliglukozidog emulgatora (S-BA, S-IpaA, S-GlyA), kao i referentni, nejonski hidrofilni krem (R-A).

<b>Ekscipijensi/lekovita supstanca (%, m/m)</b>	<b>S-BA</b>	<b>S-IpaA</b>	<b>S-GlyA</b>	<b>R-A</b>
Cetearil glukozid i cetearil alkohol	8	8	8	-
Cetostearil alkohol	1	1	1	10
Trigliceridi srednje dužine lanca	10	10	10	-
Izopropil alkohol	-	10	-	-
Glicerol (85%)	-	-	20	10
Polisorbat 60	-	-	-	5
Beli vazelin	-	-	-	25
Aceklofenak	1	1	1	1
Ultračista voda	do 100	100	100	100

Referentna podloga, nejonski hidrofilni krem, pripremljena je prema propisu DAB 2006. Aceklofenak (1%, m/m) je potom pažljivo suspendovan u pripremljene podloge, pod kontrolisanim uslovima, kako bi se minimizirale promene u viskozitetu i veličini kapi, kao i sprečilo inkorporiranje vazduha tokom suspendovanja.

### 3.2.15 Skrining mikrostrukture

Preliminarni uvid u mikrostrukturu ispitivanih uzoraka polučvrste konzistencije dobijen je primenom polarizacionog mikroskopa (Carl Zeiss ApoTome Imager Z1 mikroskop, Zeiss, Nemačka) integrisanim sa AxioCam ICc1 digitalnom kamerom i AxioVision 4.6 softverskim paketom. Mala količina ispitivanih uzoraka uzeta sa različitih mesta u okviru svakog uzorka postavljena je na mikroskopsku pločicu i posmatrana pod polarizacionim mikroskopom sa  $\lambda$  pločicom kako bi se detektovalo prisustvo anizotropnih struktura.

Dublji uvid u mikrostrukturu dobijen je primenom alfa 500R konfokalnog Raman mikroskopa (WiTec GmbH, D-Ulm, Nemačka) opremljenog sa laserom za ekscitaciju talasne dužine 532 nm (snaga: 20 mW), UHTS 300 spektrometrom i DV401-BV CCD kamerom. Zone veličine 50x50  $\mu\text{m}$ , odnosno 75x75  $\mu\text{m}$  mapirane su korišćenjem objektiva 40x (numerički otvor 0,6). Za svaku sliku, snimljena su tri spektra po  $\mu\text{m}$ . Kodirane slike u boji (engl., *color coded images*) dobijene su primenom softvera WiTecProjectPlus 4.1 (WiTec GmbH, D-Ulm, Nemačka), pri čemu na slikama, svaki piksel odgovara jednom Raman spektru. S obzirom da spektar predstavlja otisak prsta (engl., *fingerprint*) hemijske supstance, primenom konfokalne Raman spektroskopije analizirana je distribucija aceklofenaka i ostalih ekscipijenasa u ispitivanim uzorcima. Naime, korišćenjem spektara supstanci korišćenih za izradu ispitivanih uzoraka, izračunata je relativna količina svake supstance u svakoj tački slike. Dodeljivanjem određene boje spektru svake supstance, dobijene su kodirane slike u boji skenirane zone, što je omogućilo praćenje distribucije supstanci u uzorku. Intenzitet boje odgovara relativnoj koncentraciji supstance u posmatranoj tački slike. Dodatno, kako bi se dobile kodirane slike u boji, primenjen je spektar svake supstance korišćene u izradi uzoraka (srednja vrednost 10 snimljenih spektara), kao i spektar smeše ultračiste vode sa izopropanolom i glicerolom. Spektri supstanci koje su inkorporirane u ispitivane uzorke u koncentraciji ispod 8% (cetostearil alkohol u uzorcima na bazi APG emulgatora, kao i polisorbata 80 u referentnom uzorku) nisu predstavljeni na kodiranim slikama u boji, jer je njihov doprinos spektru smeše bio zanemarljiv.

### **3.2.16 Ispitivanje uniformnosti sadržaja aceklofenaka**

Procena vizuelne uniformnosti ispitivanih uzoraka i uniformnosti sadržaja aceklofenaka sprovedena je u skladu sa procedurom opisanom u Američkoj farmakopeji za preparate pakovane u kutiji (USP37-NF32, 2014a). Plastični špric (bez klipa), nakon uklanjanja vrha, je pažljivo uronjen u plastičnu kutiju sa uzorkom do dna i okrenut. Nakon toga, špric sa uzorkom je uklonjen iz kontejnera, a klip je ubačen kako bi se istisnuo uzorak unutar šprica koji je sadržao deo sa vrha, sredine i dna ispitivanog uzorka. Deo uzorka iz svake zone je pažljivo odmeren (200 mg) u erlenmajeru, a zatim je dodat rastvarač za ekstrakciju (metanol). Smeša je dalje homogenizovana, filtrirana i analizirana u pogledu sadržaja aceklofenaka primenom UHPLC-MS/MS metode.

### 3.2.17 Određivanje saturacione koncentracije aceklofenaka u podlogama

Nakon određivanja rastvorljivosti aceklofenaka u vodi, različite (rastuće) količine aceklofenaka su inkorporirane u ispitivane podloge. Dobijeni uzorci čuvani su 7 dana na sobnoj temperaturi (period ekvibracije), a zatim posmatrani pod polarizacionim mikroskopom radi detekcije kristala nerastvornog aceklofenaka (Carl Zeiss ApoTome Imager Z1 mikroskop). Ukoliko nisu uočeni kristali aceklofenaka, posmatrani su uzorci sa većom koncentracijom aceklofenaka, sve dok kristali ne bi bili detektovani. Drugim rečima, prva (najniža) koncentracija aceklofenaka pri kojoj su detektovani kristali, uzeta je kao saturaciona koncentracija (koncentracija zasićenja,  $C_s$ ) za datu podlogu (Pantelić, 2013). Dobijene vrednosti  $C_s$  su dodatno analitički potvrđene primenom UHPLC-MS/MS metode, nakon odgovarajućeg postupka ekstrakcije, čime je dobijen konačni uvid u najvišu koncentraciju aceklofenaka koja može biti rastvorena/solubilizovana specifičnom koloidnom strukturom ispitivane podloge.

### 3.2.18 Reološka merenja

Kontinualna reološka merenja sprovedena su korišćenjem reometra Rheolab MC 120 (Paar Physica, Ostfildern, Nemačka). Sva merenja sprovedena su u triplikatu korišćenjem kupa-ploča mernog sistema (dijametar 50 mm, ugao  $1^\circ$ ), pri debljini uzorka od 0,05 mm, na temperaturi od  $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Tokom kontinualnih reoloških merenja, primenjen je postupak sa kontrolisanom brzinom smicanja od 0 do  $200\text{ s}^{-1}$  i obratno, pri čemu je svaki stupanj trajao 120 s. Prilikom određivanja prinosnog napona, primenjen je postupak sa kontrolisanim naponom smicanja u opsegu 0–100 Pa primenom MCR 501 reometra (Anton Paar GmbH, D-Neuhausen, Nemačka). Pored prinosnog napona, u cilju detaljnije reološke karakterizacije ispitivanih uzoraka, određeni su i tip tečenja, histerezna površina, maksimalni ( $\eta_{\max}$ ) i minimalni ( $\eta_{\min}$ ) prividni viskozitet.

### 3.2.19 Termogravimetrijska analiza

Termogravimetrijska analiza je sprovedena kako bi se dobio uvid u način distribucije vode u ispitivanim uzorcima (*bulk* i vezana voda) primenom uređaja Netzsch STA

409PG (Netzsch, Selb, Nemačka). Mala količina ispitivanih uzoraka (~ 12 mg) je precizno odmerena u otvorenim aluminijumskim lončićima i zagrevana na temperaturi od 30 do 110°C, sa izotermalnim segmentima na početku i kraju svakog merenja. Brzina zagrevanja je postavljena na 5 K/min. Svi uzorci su analizirani u triplikatu.

### **3.2.20 Merenje pH vrednosti i električne provodljivosti**

Merenje pH vrednosti je sprovedeno na  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  primenom HI9321 pH metra (Hanna Instruments Inc., Mičigen, SAD), jednostavnim uranjanjem staklene elektrode pH metra u ispitivane uzorke. Takođe, merenje električne provodljivost, sprovedeno je na  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  direktnim uranjanjem elektrode konduktometra CDM230 (Radiometer, Kopenhagen, Danska) u ispitivane uzorke.

### **3.2.21 Studija stabilnosti**

Kako bi se ispitala stabilnost ispitivanih podloga u prisustvu aceklofenaka kao model lekovite supstance, izrađeni uzorci su čuvani na sobnoj temperaturi ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) tokom tri meseca, a praćeni su sledeći parametri: izgled, pH vrednost, električna provodljivost, reološki parametri, sadržaj aceklofenaka i njegovog glavnog degradacionog proizvoda diklofenaka (nakon odgovarajućeg postupka ekstrakcije) primenom UHPLC-MS/MS metode (videti ispod).

## **III faza eksperimentalnog rada**

### **3.2.22 In vitro ispitivanje oslobađanja aceklofenaka kroz veštačku membranu**

In vitro ispitivanje oslobađanja aceklofenaka iz formulacija razvijenih tokom prve i druge faze eksperimentalnog rada sprovedeno je primenom modifikovanih vertikalnih difuzionih ćelija (Gauer Glas, D-Püttlingen, Nemačka) sa dostupnom površinom za difuziju leka od  $2,01 \text{ cm}^2$  i zapreminom akceptorskog dela ćelije 12 ml. Akceptorski deo svake ćelije je prvo ispunjen receptorskim medijumom, fosfatnim puferom pH 7,4, koji je prethodno podvrgnut sonikaciji u ultrazvučnom kupatilu tokom 30 min (u cilju uklanjanja mehurića vazduha) i zagrejan na temperaturi od  $32^\circ\text{C}$ . Polikarbonatne

membrane (Nuclepore™, Whatman, Maidstone, UK) su pažljivo postavljene između donorske i akceptorske ćelije, vodeći računa da ne dođe do formiranja mehurića vazduha. Važno je istaći da su membrane, pre svakog ispitivanja, aktivirane potapanjem u odabrani akceptorski medijum (fosfatni pufer pH 7,4) tokom 12 h, kako bi se uklonio vazduh unutar pora. Zatim su akceptorski delovi ćelija uronjeni u vodeno kupatilo termostatirano na 32°C u cilju uravnoteženja membrane tokom 30 min, uz konstantno mešanje pomoću magneta (uronjen u akceptorski deo) na 500 obrt/min. Ispitivanje brzine oslobađanja sprovedeno je pod *infinite dose* uslovima – 500 µl uzoraka nanoemulzija, odnosno 0,5 g mikrostrukturiranih emulzionih sistema – je ravnomerno nanešeno na površinu membrane u donorskom delu koji je dalje prekriven okluzivnim Parafilm®-om (Bemis, SAD), kako bi se sprečilo isparavanje vode tokom eksperimenta. Oslobađanje aceklofenaka je praćeno tokom 6 h, uz održavanje konstantne temperature medijuma od  $32,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  i brzine mešanja od 500 obrt/min. U prethodno definisanim intervalima tokom 6 h (0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h), uzorkovani su eluati zapremine 600 µl, pažljivo, pomoću šprica i igle, kako bi se sprečilo formiranje mehurića vazduha. Nakon svakog uzorkovanja, u sistem je dodata ista zapremina, čistog, prethodno zagrejanog i degaziranog medijuma, kako bi se održali sink uslovi. Količina oslobođenog aceklofenaka određena je korišćenjem UHPLC-MS/MS metode (videti ispod). U cilju određivanja brzine oslobađanja aceklofenaka iz ispitivanih uzoraka, kumulativna količina aceklofenaka (µg) oslobođena tokom studije po jedinici površine (cm<sup>2</sup>), predstavljena je u funkciji kvadratnog korena iz vremena. Vrednost brzine oslobađanja određena je kao nagib linearnog dela krive. Ukupna količina oslobođenog aceklofenaka tokom eksperimenta, određena je u poslednjoj vremenskoj tački, na linearnom delu krive.

U drugom delu ove studije, *in vitro* ispitivanje oslobađanja aceklofenaka sprovedeno je primenom imerzionih ćelija (VanKel Enhancer Cell, VanKel Industries Inc., CA, SAD) u kombinaciji sa USP aparaturom 2 za *dissolution test* sa minilopaticama (Erweka DT 600, Nemačka). U cilju procene pogodnosti aparature sa imerzionim ćelijama za detekciju potencijalnih razlika u *in vitro* brzini oslobađanja aceklofenaka iz razvijenih formulacija, postavljeni eksperimentalni uslovi su bili identični (koliko je moguće) uslovima korišćenim u sistemu sa vertikalnim difuzionim ćelijama. Ispitivani uzorci su precizno izmereni (2 g) u rezervoaru svake imerzione ćelije, a zatim je preko



postavljena polikarbonatna membrana, prethodno aktivirana potapanjem u akceptorski medijum (fosfatni pufer pH 7,4) tokom 12 h. Sastavljene ćelije uronjene su u 300 ml fosfatnog pufera pH=7,4 kao akceptorskog medijuma. Tokom eksperimenta, temperatura je održavana na  $32,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , a brzina rotiranja lopatica na 50 rpm. U prethodno definisanim vremenskim tačkama tokom 6 h, uzorkovani su eluati zapremine 5 ml, i odmah zamenjeni svežim, prethodno zagrejanim receptorskim medijumom. Količina aceklofenaka oslobođena tokom vremena određena je spektrofotometrijski, primenom spektrofotometra Evolution 300 (Thermo Fisher Scientific).

### **3.2.23 In vitro ispitivanje permeacije aceklofenaka kroz kožu uha svinje**

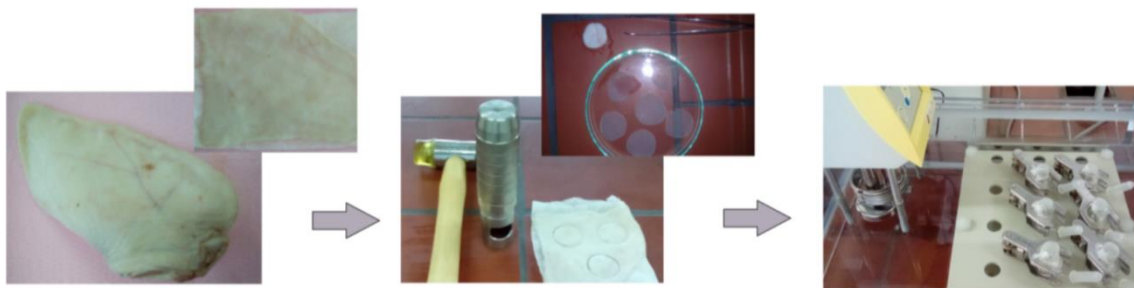
#### **3.2.23.1 Priprema kože uha svinje**

U zavisnosti od tipa razvijenih emulzionih sistema, in vitro ispitivanje permeacije aceklofenaka praćeno je kroz *dermatomed* kožu uha svinje ili toplotom izolovani epidermis. U tu svrhu, sveže uši svinje, dobijene iz lokalne mesare neposredno nakon žrtvovanja (pre tretiranja vrelom vodom), oprane su pod mlazom hladne tekuće vode i koža, sa spoljašnjeg dela ušne školjke, je pažljivo uklonjena pomoću skalpela. Dobijena koža pune debljine je potom očišćena izotoničnim rastvorom natrijum-hlorida (0,9%, m/v), osušena pomoću pamučne maramice, uvijena u aluminijumsku foliju i čuvana u zamrzivaču na  $-20^{\circ}\text{C}$  (ne duže od mesec dana). Prilikom pripreme *dermatomed* kože, na dan eksperimenta, nakon odmrzavanja na sobnoj temperaturi, dlake su pažljivo skraćene pomoću električnog trimera (0,5 mm), a zatim je primenom dermatoma (Dermatom GA 630; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Nemačka) izolovana koža debljine 1 mm. Zatim su isečeni komadi kože u obliku diska prečnika 25 mm, specijalno dizajniranim uređajem za tu svrhu. Prilikom pripreme toplotom izolovanog epidermisa, na dan eksperimenta, pripremljeni komadi kože u obliku diska prečnika 25 mm uronjeni su u prečišćenu vodu zagrejanu na  $60^{\circ}\text{C}$  tokom 90 s, a zatim je epidermis pažljivo odvojen od dermisa pomoću pincete. Izolovani epidermis je zatim pregledan na eventualno prisutna fizička oštećenja pomoću lupe, prenešen u Petri šolju sa fosfatnim puferom pH 7,4 i ostavljen da hidratiše tokom 1 h.

### 3.2.23.2 Protokol za in vitro ispitivanje permeacije aceklofenaka

Pre početka eksperimenta, ivice donorskog i akceptorskog dela Franz-ove difuzione ćelije (Gauer Glas, D-Püttlingen) su pažljivo namazane mašću za podmazivanje (Glisseal<sup>®</sup> HV, Borer Chemie, Švajcarska), kako bi se sprečio eventualni ulazak vode u ćeliju tokom eksperimenta. Potom, akceptorski deo svake ćelije je ispunjen odabranim receptorskim medijumom (fosfatni pufer pH 7,4) koji je prethodno podvrgnut sonikaciji u ultrazvučnom kupatilu tokom 30 min (u cilju uklanjanja mehurića vazduha) i zagrejan na temperaturi od 32°C. Odabrana membrana (toplotom izolovani epidermis ili *dermatomed* koža uha svinje) je postavljena pažljivo, pomoću pincete sa ravnim vrhom, između donorskog i akceptorskog dela, sa SC-om okrenutim ka donorskom delu. Akceptorski delovi ćelija su potom uronjeni u vodeno kupatilo termostatirano na 32°C u cilju uravnoteženja membrane, uz konstantno mešanje pomoću magneta (uronjen u akceptorski deo) na 500 obrt/min. Nakon 30 min, na membranu je pažljivo nanet ispitivani uzorak (500 µl uzoraka nanoemulzije ili 0,5 g krema), a zatim je donorski deo dalje prekriven okluzivnim Parafilm<sup>®</sup>-om. Permeacija aceklofenaka iz ispitivanih uzoraka je praćena tokom 30 h (45 h), uz održavanje konstantne temperature od 32°C i brzine mešanja od 500 obrt/min. U prethodno definisanim intervalima, uzorkovani su eluati zapremine 600 µl, pomoću šprica i igle. Nakon svakog uzorkovanja, u sistem je dodata ista zapremina, čistog, prethodno zagrejanog i degaziranog medijum, kako bi se održali *sink* uslovi. Koncentracija aceklofenaka u eluatima dobijenim ispitivanjem permeacije aceklofenaka kroz *dermatomed* kožu uha svinje sprovedeno je primenom HPLC metode (ispitivanje je sprovedeno na Institutu za farmaceutsku tehnologiju Eberhard-Karls Univerziteta u Tibingenu, u Nemačkoj). Ukratko, HPLC analiza dobijenih eluata sprovedena je korišćenjem Dionex HPLC sistema (Dionex Co., SAD). Hromatografsko razdvajanje sprovedeno je primenom Nucleosil 100-5 C18 kolone 250/4,6 (Macherey-Nagel, Nemačka) u kombinaciji sa HPLC prekolonom EC 4/3 Universal RP (Macherey-Nagel) na 30°C. Mobilnu fazu činile su faza A (ultračista voda sa 10% acetonitrila i 0,1% trifluorosirćetne kiseline) i faza B (acetonitril sa 0,1% trifluorosirćetne kiseline) u sledećem gradijentu koncentracije: 0 min, 40 %B; 8 min, 100% B; 11 min, 100 % B; 12 min, 40% B; 17 min, 40% B. Brzina protoka je podešena na 1 ml/min, a UV apsorbanacija je merena na 275 nm. Sa druge strane, koncentracija aceklofenaka u eluatima dobijenim ispitivanjem permeacije aceklofenaka kroz toplotom

izolovani epidermis kože uha svinje određena je primenom UHPLC-MS/MS metode (videti ispod).



**Slika 3.1.** Šematski prikaz protokola razvijenog za in vitro ispitivanje permeacije aceklofenaka primenom toplotom izolovanog epidermisa kože uha svinje kao membrane

### 3.2.23.3 Prikaz izračunavanja in vitro profila permeacije

Prilikom in vitro ispitivanja permeacije aceklofenaka, rezultati dobijeni primenom odgovarajućih analitičkih metoda, predstavljaju koncentraciju aceklofenaka ( $\mu\text{g}$  aceklofenaka po ml), te su dalje korigovani zapreminom medijuma u akceptorskom delu Franz-ove ćelije i zapreminom medijuma koja je uzorkovana u definisanim vremenskim tačkama tokom eksperimenta, a zatim podeljeni površinom za difuziju kako bi se konačno izrazili u obliku kumulativne količine leka koja je permeirala po jedinici površine  $Q$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ):

$$Q_1 = \frac{C_1 * V_c}{P} \quad (3.3.1)$$

$$Q_2 = \frac{(C_2 * V_c + C_1 * V_u)}{P} \quad (3.3.2)$$

$$Q_3 = \frac{(C_3 * V_c + C_1 * V_u + C_2 * V_u)}{P} \quad (3.3.3)$$

gde je  $Q_1$ ,  $Q_2$ ,  $Q_3$ , itd. količina aceklofenaka koja je permeirala po jedinici površine membrane u vremenu  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$ , itd.;

$c_1, c_2, c_3, \text{ itd.}$  – koncentracija aceklofenaka ( $\mu\text{g}$  aceklofenaka po ml) u eluatima uzorkovanim u odgovarajućim vremenskim tačkama ( $t_1, t_2, t_3, \text{ itd.}$ )

$V_c$  – zapremina akceptorskog dela Franz-ove difuzione ćelije (12 ml);

$V_u$  – zapremina akceptorskog medijuma koja je uzorkovana u vremenu  $t_1, t_2, t_3, \text{ itd.}$  (600  $\mu\text{l}$ );

$P$  – površina za difuziju Franz-ove difuzione ćelije (2,01  $\text{cm}^2$ ).

U cilju procene efikasnosti isporuke aceklofenaka kroz kožu iz različitih formulacija, obrađeni rezultati su grafički prikazani kao zavisnost kumulativne količine aceklofenaka ( $Q_i$ ) koja permeira kroz jedinicu površine membrane od vremena ispitivanja ( $t_i$ ), čime su generisani odgovarajući permeacioni profili. Kako bi se u potpunosti okarakterisao proces permeacije aceklofenaka kroz *dermatomed* kožu uha svinje, odnosno, kroz toplotom izolovani epidermis, dodatno su izračunate i vrednosti odgovarajućih parametara: ukupna količina leka koja je permeirala kroz membranu na kraju eksperimenta ( $Q_{30h}$ , odnosno  $Q_{45h}$ ), stacionarni/ravnotežni fluks (engl., *steady-state* fluks) ( $J_{ss}$ ) i koeficijent permeacije ( $K_p$ ). Stacionarni fluks ( $J_{ss}$ ) aceklofenaka kroz kožu određen je iz nagiba linearnog dela grafika koji pokazuje zavisnost kumulativne količine leka koja je permeirala kroz jedinicu površine membrane od vremena uzorkovanja za svaku ispitivanu formulaciju, odnosno svaku korišćenu difuzionu ćeliju (Selzer i sar., 2013). Linearni deo krive je određen linearnom regresionom analizom poslednjih nekoliko tačaka u ravnotežnoj fazi. Dalje, koeficijent permeacije ( $K_p$ ) je jednostavno izračunat (Selzer i sar., 2013):

$$K_p = \frac{J_{ss}}{C_0} \quad (3.3.4)$$

gde je  $J_{ss}$  stacionarni fluks leka kroz kožu ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ ), a  $C_0$  inicijalna koncentracija leka (aceklofenaka) u formulaciji ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ).

### 3.2.24 Procena dermalne raspoloživosti aceklofenaka in vitro

Imajući na umu da lekovi primenjeni na koži moraju da penetriraju kroz SC i/ili folikule dlake da bi ostvarili svoje delovanje u dubljim slojevima kože ili ušli u cirkulaciju, procena stepena i brzine distribucije lekovite supstance kroz različite slojeve korneocita (*tape stripping* metoda) i/ili folikule dlake (metoda cijanoakrilatne biopsije kože) odgovarajućeg modela humane kože, može pružiti adekvatne informacije o dermalnoj raspoloživosti lekova. U tom smislu, koža dorzalne strane svinjskih ušiju je prepoznata kao pogodna zamena za humanu kožu in vivo, pre svega zbog sličnosti sa humanom kožom u pogledu morfoloških karakteristika i permeabilnosti. Međutim, trenutno nema jasno definisanog protokola za procenu dermalne raspoloživosti leka *tape stripping* metodom i cijanoakrilatnom biopsijom kože in vitro, uključujući i pripremu kože uha svinje, te je značajan deo ove doktorske disertacije usmeren ka razvoju i optimizaciji protokola za sprovođenje ovih metoda.

#### 3.2.24.1 Protokol za pripremu kože uha svinje

U cilju očuvanja integriteta kožne barijere, uši svinja (približno 4-6 meseci starosti) su uklonjene neposredno nakon žrtvovanja (pre izlaganja svinje vreloj vodi) i pažljivo oprane pod mlazom hladne tekuće vode. Nakon toga, uši su pažljivo očišćene izotoničnim (0,9%) rastvorom natrijum-hlorida pomoću pamučnih tupfera, osušene pomoću meke i suve pamučne tkanine, pažljivo uvijene u aluminijumsku foliju i čuvane na temperaturi od  $-20^{\circ}\text{C}$ . Za razliku od protokola za in vitro ispitivanje permeacije, koža je ostajala na hrskavici tokom čuvanja i tokom eksperimenta.

Na dan eksperimenta, nakon odmrzavanja na sobnoj temperaturi, uši su osušene pomoću suve pamučne tkanine, a zatim su dlake pažljivo uklonjene pomoću električnog trimera (0,5 mm). U cilju identifikacije delova uha sa potencijalno narušenom barijernom funkcijom kože, kao i određivanja trenutka pogodnog za otpočinjanje eksperimenta, sprovedeno je merenje vrednosti TEGV neinvazivnom sondom uređaja Tewameter<sup>®</sup> (~ 1 min je neophodan za stabilizaciju vrednosti ovog parametra tokom merenja). Vrednost TEGV od 10 do 20  $\text{g m}^{-2}\text{h}^{-1}$  se smatra pogodnom za otpočinjanje eksperimenta (Klang i sar., 2012b). Po dostizanju ove vrednosti, uši su fiksirane za

stiroporsku ploču pomoću špenadli, čime su bile spremne za nanošenje ispitivanih uzoraka.

Međutim, treba naglasiti da su literaturni podaci o mogućnosti primene merenja TEGV kože uha svinje u proceni integriteta barijerne funkcije prilično kontraverzni, kao i podaci o efektima zamrzavanja/odmrzavanja kože. Stoga, u cilju definisanja optimalnih uslova, sprovedena su odgovarajuća preliminarna ispitivanja u cilju definisanja optimalne metode za procenu integriteta kožne barijere, uslova i dužine čuvanja svinjskih ušiju pre početka eksperimenta, maksimalne dužine trajanja eksperimenta, pritiska koji se vrši na adhezivnu traku tokom *tape stripping*-a (roler vs. teg identične mase, 300g) i protokola ekstrakcije aceklofenaka iz adhezivnih traka. Detaljan opis preliminarne studije, sa dobijenim rezultatima predstavljen je u delu 4.3.2.1.

### **3.2.24.2 In vitro *tape stripping***

Na središnjem delu dorzalne strane uha, uz primenu plastičnog šablona, naneti su ispitivani uzorci i ravnomerno aplikovani po predviđenoj površini kože, pri čemu je tretirana površina kože bila veća od površine adhezivnih traka. Količina ispitivanih uzoraka je varirala od eksperimentalnog protokola: 1) *infinite dose* uslovi – aplikovano je 50 µl uzorka nanoemulzije po cm<sup>2</sup> površine kože, pomoću gaze, 2) *finite dose* uslovi – aplikovano je 10 µL uzorka nanoemulzije po cm<sup>2</sup>, odnosno 10 mg uzorka mikrostrukturiranih emulzionih sistema po cm<sup>2</sup> površine kože. Dalje, u zavisnosti od eksperimentalnog protokola, neposredno nakon aplikacije uzoraka sprovedeno je i masiranje tretiranog mesta pomoću pritiska prsta (~2N) u trajanju od 3 min, kako bi se imitiralo fiziološko kretanje dlaka i eventualno podstaklo preuzimanje nanokapi u folikule dlake. S obzirom da isparljive komponente formulacije mogu da dovedu do lažno visokih vrednosti TEGV i time neadekvatne korelacije između TEGV i debljine uklonjenog SC, na svakom uhu je ostavljeno po jedno netretirano mesto, koje je služilo za merenje TEGV, i dalje, za izračunavanje ukupne debljine SC.

Ispitivani uzorci su ostavljeni u kontaktu sa kožom tokom 1–2 h, a zatim je višak uzoraka pažljivo uklonjen sa kože pamučnim tupferima. Sa svakog test-mesta, sukcesivno je naneto i uklonjeno 12-15 adhezivnih traka (D-squame<sup>®</sup> adhezivne trake (CuDerm, SAD)), sa precizno definisanom površinom (3,8 cm<sup>2</sup>). Broj traka neophodan za uklanjanje aceklofenaka koji je penetrirao u SC određen je eksperimentalno,

merenjem vrednosti TEGV i/ili količine aceklofenaka ekstrahovane iz svake uklonjene trake (limit kvantifikacije). S obzirom da je površina kože tretirana uzorkom bila veća od površine adhezivne trake, markerom je obeleženo mesto na kome je postavljena prva traka, kako bi se obezbedilo uklanjanje konstantne površine SC. Na svaku nanetu traku izvršen je konstantan pritisak pomoću rolera u trajanju od 10 sekundi. Masa svake pojedinačne trake je izmerena pre i posle primene na analitičkoj vagi (Sartorius BP210D, Sartorius, Nemačka), kako bi se dobili podaci o masi uklonjenih korneocita. Tokom odmeravanja i primene, adhezivnim trakama je manipulirano pažljivo, pomoću pincete, kako se adheziv ne bi kontaminirao korneocitima istraživača.

Opisana procedura je korišćena i za uklanjanje 12–15 slojeva SC na netretiranom mestu, pri čemu je dodatno vršeno merenje TEGV nakon uklanjanja 4, 8, 12, i/ili 15. trake, u cilju izračunavanja ukupne debljine SC, i poređenja rezultata dobijenih na različitim ušima (smanjenje uticaja inter- i intraindividualnih varijacija).

Svaka adhezivna traka sa uklonjenim slojevima SC, prethodno tretiranih ispitivanim formulacijama je prenetu pincetom u kivetu za centrifugu i dodato je po 5 ml etanola 70% (v/v) kao rastvarača za ekstrakciju. Pripremljene kivete su najpre podvrgnute sonikaciji tokom 15 min, a zatim se centrifugiraju 5 min pri 4000 obrt/min (Pantelić, 2013). Dobijeni eluati su potom filtrirani kroz najlonski membranski filter (dijametar pora 0,22  $\mu\text{m}$ ) i preneti u staklene epruvete sa zatvaračem do analize primenom UHPLC-MS/MS metode.

Rezultati dobijeni opisanom UHPLC-MS/MS metodom predstavljaju koncentraciju aceklofenaka ( $\mu\text{g}$  aceklofenaka po ml eluata), te su dalje korigovani zapreminom primenjenog rastvarača za ekstrakciju (5 ml etanola) i podeljeni površinom primenjene adhezivne trake ( $3,8 \text{ cm}^2$ ) kako bi se konačno izrazili u obliku kumulativne količine leka koja penetrira po jedinici površine  $Q$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Obradeni rezultati su grafički prikazani kao zavisnost kumulativne količine leka koja penetrira po jedinici površine kože od relativne (standardizovane) debljine uklonjenog sloja SC ( $x/L$ ). Pored toga, dobijeni rezultati su predstavljeni i kao ukupna količina leka koji penetrira u SC iz određene formulacije (dobijen sabiranjem količine leka ekstrahovanog iz svake pojedinačne adhezivne trake). Na ovaj način je bilo moguće dobiti uvid u količinu leka koja je penetrirala u SC iz ispitivanih uzoraka.

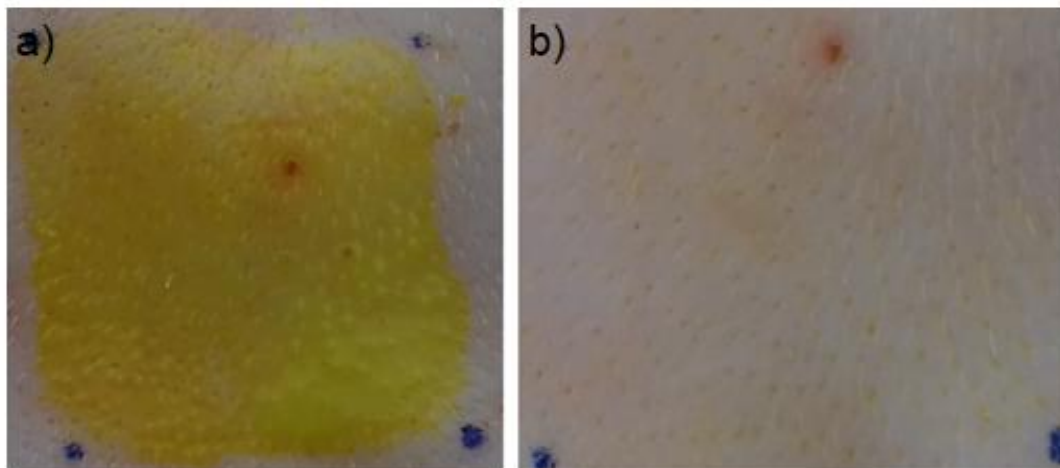
### 3.2.24.3 In vitro cijanoakrilatna biopsija površine kože

Kako folikuli dlake potencijalno mogu biti važan put u penetraciji lekovitih supstanci u/kroz kožu iz nosača sa nanostrukturom, posebna pažnja posvećena je razvoju protokola za sprovođenje cijanoakrilatne biopsije kože, u cilju procene količine aceklofenaka koja penetrira u folikule dlake iz razvijenih nanoemulzija. U tom smislu, bilo je potrebno odrediti količinu cijanoakrilatnog lepka (UHU GmbH, Nemačka) koja se nanosi na test-mesto, način i mesto njegovog nanošenja, vreme potrebno za polimerizaciju cijanoakrilatnog lepka, kao i tip rastvarača za ekstrakciju aceklofenaka. Ispitivanjem je utvrđeno da je optimalno naneti jednu kap cijanoakrilatnog lepka u centar ispitivanog područja, potom pažljivo postaviti adhezivnu traku i blago pritiskati rolerom (tokom 10 s), a zatim ostaviti 10 minuta da lepak polimerizuje, i jednim, brzim pokretom pomoću pincete ukloniti adhezivnu traku, u smeru suprotnom od smeru rasta dlake. Iako se u literaturi mogu pronaći podaci da se kao rastvarač za ekstrakciju može koristiti etanol (Patzelt i sar., 2008), tokom eksperimenta uočeno je da jedino acetonitril može rastvoriti polimerizovani lepak bez pojave precipitata tokom čuvanja.

Kako bi se potvrdilo da se primenom razvijenog protokola cijanoakrilatne biopsije kože, efikasno uklanja sadržaj folikula dlake, sprovedena je studija bojenja folikula dlake nanoemulzijom kurkumina. Nanoemulzija kurkumina izrađena je primenom prethodno opisanog protokola (3.2.2 *Izrada nanostruktuiranih emulzionih sistema*), pri čemu je kurkumin (0,06%) rastvoren u uljanoj fazi koja se sastojala od lecitina (2%), ricinusovog ulja (10%) i MCT (10%), a kao koemulgator (rastvoren u vodenoj fazi) korišćen je polisorbata 80 (2%). Polazeći od pretpostavke da se kapi nanoemulzija mogu u značajnom stepenu akumulirati u folikulima dlaka, nanoemulzija kurkumina je naneta na kožu uha svinje u količini  $10 \mu\text{L}/\text{cm}^2$  (nakon pripreme uha svinje primenom prethodno opisanog protokola (3.2.25.1. *Protokol za pripremu kože uha svinje*)). Nakon 1 h, višak formulacije je pažljivo uklonjen pamučnim tupferima, a zatim je SC uklonjen primenom 15 adhezivnih traka, pri čemu je na svaku adhezivnu traku izvršen konstantan pritisak pomoću rolera u trajanju od 10 sekundi. Tretirano mesto je posmatrano, pre i nakon cijanoakrilatne biopsije kože, pri čemu je bilo moguće jasno uočiti žuto obojene (od nanokapi sa kurkuminom) folikule dlake pre cijanoakrilatne biopsije kože, dok nakon 2 cijanoakrilatne biopsije kože žutu boju nije bilo moguće



detektovati vizuelno, kao ni pod trinokularnim mikroskopom SZM-168-TL (Motic, Španija), što potvrđuje da je uklonjen sadržaj folikula dlake (slika 3.2).



**Slika 3.2.** (a) Koža uha svinje tretirana nanoemulzijom kurkumina i (b) kože uha svinje neposredno nakon uklanjanja *stratum corneum*-a, pre cijanoakrilatne biopsije kože

Na osnovu navedenog, prilikom procene isporuke aceklofenaka iz ispitivanih nanoemulzija u folikule dlake, po uklanjanju SC primenom adhezivnih traka, sprovedene su po dve cijanoakrilatne biopsije površine kože na svakom test mestu, primenom opisanog protokola. Nakon cijanoakrilatne biopsije kože, svaka adhezivna traka je prenetu u kivetu za centrifugu i dodato je 5 ml acetonitrila kao rastvarača za ekstrakciju. Pripremljene kivete su najpre podvrgnute sonikaciji tokom 15 min, a zatim centrifugiranju tokom 15 min pri 4000 obrt/min. Dobijeni eluati su potom filtrirani kroz najlonski membranski filter (dijametar pora 0,22  $\mu\text{m}$ ) i preneti u staklene epruvete sa zatvaračem, za čuvanje do analize primenom UHPLC-MS/MS metode.

Rezultati dobijeni primenom UHPLC-MS/MS metode predstavljaju koncentraciju aceklofenaka ( $\mu\text{g}$  aceklofenaka po ml eluata) i dalje su korigovani zapreminom primenjenog rastvarača (5 ml acetonitrila) i podeljeni površinom primenjene adhezivne trake ( $3,8 \text{ cm}^2$ ) kako bi se konačno izrazili u obliku kumulativne količine leka koja penetrira u folikule dlake po jedinici površine kože ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

### 3.2.25 Procena dermalne raspoloživosti aceklofenaka in vivo

Procena pogodnosti kože uha svinje za detekciju potencijalnih razlika u dermalnoj raspoloživosti aceklofenaka iz različitih formulacija nanoemulzija sprovedena je kroz poređenje (i odgovarajuću statističku analizu) sa penetracionim profilima aceklofenaka dobijenih in vivo, na humanim dobrovoljcima, primenom *tape stripping* metode. Takođe, in vivo *tape stripping* sproveden pod *infinite dose* uslovima, omogućio je da se parametarski okarakterise penetracija aceklofenaka u SC iz konvencionalnih (mikrostrukturiranih) emulzionih sistema.

#### 3.2.25.1 In vivo *tape stripping*

Pre početka studije, s obzirom da se radi o ispitivanju na ljudima, dobijena je saglasnost Etičkog komiteta Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u skladu sa Helsinškom deklaracijom (odluka broj 110/3, izdata 20.1.2016. godine). Nakon potpisivanja informisanog pristanka, 4 zdrava dobrovoljca (žene 23-27 godina), bez istorije kožnih bolesti uključena su u studiju. Ispitivane formulacije su uniformno aplikovane na obeležena mesta na unutrašnjoj strani svake podlaktice. Ispitivanje je sprovedeno pod *infinite dose* uslovima – 50 µl uzoraka nanoemulzija (pomoću gaze), odnosno 50 mg uzoraka polučvrste konzistencije po cm<sup>2</sup> površine kože (preko uzoraka postavljen je okluzivan Parafilm<sup>TM</sup>). Nakon isteka predviđenog vremena (30 min-2 h), ostatak ispitivanih formulacija je pažljivo uklonjen sa kože, pamučnim tupferima, bez upotrebe organskih rastvarača. Slično kao prilikom sprovođenja *tape stripping* metode na koži uha svinje, 12–15 D-squame<sup>®</sup> (CuDerm) adhezivnih traka je korišćeno za uklanjanje slojeva SC, nakon što su podvrgnute pritisku na bazi opruge (140 g/cm<sup>2</sup>) tokom 10 s (Pantelić, 2013). U cilju izračunavanja ukupne debljine SC, opisana procedura je korišćena za uklanjanje 12-15 slojeva SC na netretiranom mestu, sa merenjem TEGV nakon 4, 8, 12 i 15. uklonjene trake. Nakon merenja adhezivnih traka, primenjen je protokol za ekstrakciju, identičan protokolu korišćenom za ekstrakciju iz adhezivnih traka uklonjenih sa kože uha svinje, a koji je prethodno razvijen od Pantelić (2013). Svakako treba istaći da je, u cilju procene pogodnosti primene prethodno razvijenog protokola za ekstrakciju aceklofenaka iz adhezivnih traka, dodatno sprovedena validacija procesa ekstrakcije, tretiranjem adhezivnih traka sa uklonjenim

slojem SC na netretiranom mestu na koži dobrovoljaca rastvorom aceklofenaka poznate koncentracije u etanolu (70%, V/V). Nakon isparavanja rastvarača, sproveden je prethodno opisani postupak ekstrakcije i određen *recovery* aceklofenaka. Vrednost dobijenog *recovery*-ja je iznosila  $95,76 \pm 3,91\%$  (n=3), što je u skladu sa literaturnim preporukama za vrednosti *recovery*-ja u opsegu 85–115% odnosno 90–110% (Melero i sar., 2011; OECD 2004; Selzer i sar., 2013)

### 3.2.25.2 Matematička analiza profila koncentracije aceklofenaka u SC

Imajući na umu gustinu SC ( $1 \text{ g/cm}^2$ ), masa SC uklonjena svakom adhezivnom trakom, jednostavno je prevedena u zapreminu uklonjenog SC, kako bi se količina aceklofenaka ekstrahovana iz svake pojedinačne trake izrazila kao molarna koncentracija leka u SC (jedinica: mM) (Herkenne i sar., 2007). Kako bi se odredili dermofarmakokinetički parametri, profili koncentracije aceklofenaka u SC (tj., koncentracija aceklofenaka u zavisnosti od relativnog položaja u SC ( $x/L$ )) u funkciji vremena izlaganja formulaciji (tj., vremena koje je ispitivana formulacija provela u kontaktu sa kožom) ( $t$ ) fitovani su u matematičku jednačinu koja opisuje II Fick-ov zakon difuzije:

$$C_x = KC_v \left[ 1 - \frac{x}{L} - \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n} \sin \left( n\pi \frac{x}{L} \right) \exp \left( -\frac{D}{L^2} n^2 \pi^2 t \right) \right] \quad (3.3.5)$$

Pretpostavljeno je: 1) da se SC ponaša kao homogena barijera za transport/difuziju aceklofenaka u kožu, 2) da SC inicijalno ( $t=0$ ) ne sadrži aceklofenak, 3) da se tokom celog perioda tretmana ( $t$ ), koncentracija aceklofenaka u uzorku ( $C_v$ ) aplikovanom na koži zanemarljivo smanjuje (*infinite dose* uslovi), 4) kao i da vijabilni epidermis obezbeđuje perfektne *sink* uslove za aceklofenak koji je permeirao kroz SC (Herkenne i sar., 2007; Russell i Guy, 2009). Tako, fitovanjem eksperimentalno dobijenih podataka u jednačinu 3.3.5, određene su vrednosti SC-nosač particionog koeficijenta aceklofenaka ( $K$ ) i karakterističnog difuzionog parametra ( $D/L^2$ ). Parametar ( $D/L^2$ ) predstavlja konstantu brzine prvog reda (jedinica  $\text{h}^{-1}$ ), i opisuje brzinu difuzije aceklofenak kroz SC.  $K$  je termodinamički parametar koji ukazuje na afinitet aceklofenaka za SC u odnosu na nosač, te tako direktno utiče na obim isporuke aceklofenaka u SC (Herkenne i sar., 2007; Russell i Guy, 2009). Na osnovu vrednosti ova dva parametra kao i ukupne

debljine SC (L), jednostavno je izračunat koeficijent permeabilnosti (K<sub>p</sub>) aceklofenaka kroz SC:

$$K_p = KL \frac{D}{L^2} = K \frac{D}{L} \quad (3.3.6)$$

Uzimajući u obzir vrednosti izračunatih parametara K i D/L<sup>2</sup>, integraljenjem jednačine 3.3.5 (x/L=0 do x/L=1), određena je površina ispod krive koja predstavlja zavisnost koncentracije aceklofenaka u SC u funkciji relativne debljine SC (engl., *area under the curve*, AUC), i predstavlja parametar koja omogućava poređenje relativne biološke raspoloživosti aceklofenaka iz ispitivanih formulacija (Herkenne i sar., 2007; Russell i Guy, 2009):

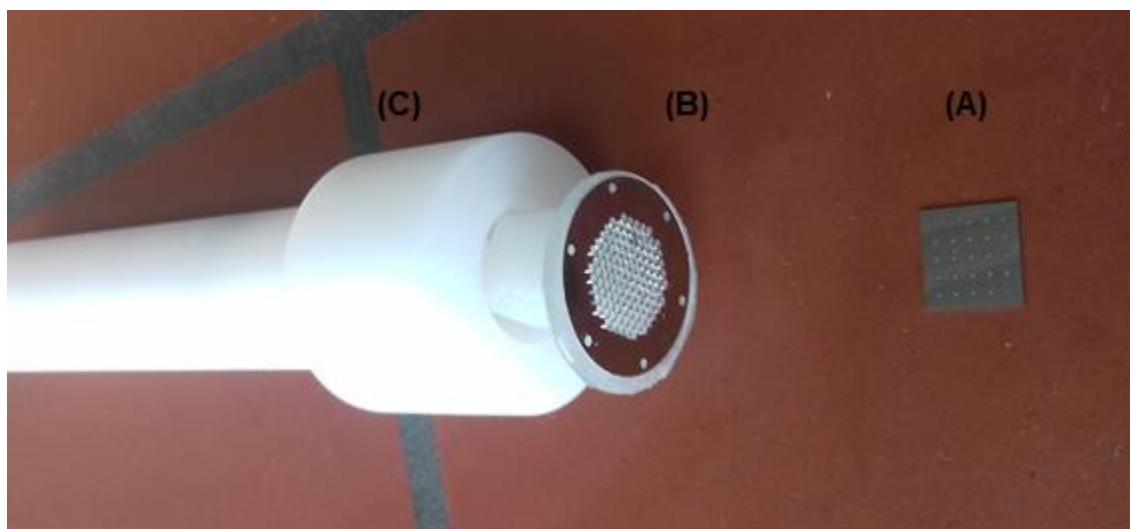
$$AUC = \int_0^1 C_x d\left(\frac{x}{L}\right) = KC_v \left[ \frac{1}{2} - \frac{4}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left(-\frac{D}{L^2} (2n+1)^2 \pi^2 t\right) \right] \quad (3.3.7)$$

#### Četvrta faza eksperimentalnog rada

##### **3.2.26 Procena efikasnosti penetracije mikroigala u kožu**

Kako bi se procenilo da li se primenom čvrstih mikroigala, kao fizičkih inhensera, može efikasno narušiti integritet kožne barijere, i posledično, poboljšati isporuka aceklofenaka u/kroz kožu iz razvijenih nanoemulzija, inicijalno su odabrana dva tipa čvrstih mikroigala uobičajeno korišćenih u literaturi: 1) silikonske mikroigle (Immupatch, Tyndall institut, Irska) i komercijalno dostupne mikroigle od čelika (AdminPatch<sup>®</sup> 600, AdminMed, USA), iste dužine (500 μm), ali različitog oblika, gustine, rastojanja između pojedinačnih mikroigala i slično. Preliminarna procena sposobnosti mikroigala da naruše integritet kožne barijere formiranjem mikropora prvobitno je sprovedena merenjem TEGV (Tewameter<sup>®</sup> TM 210) kože uha svinje. Naime, nakon pripreme kože uha svinje primenom prethodno opisanog protokola (3.2.25.1. *Protokol za pripremu kože uha svinje*) i dostizanja vrednosti TEGV pogodnih za otpočinjanje eksperimenta, odabrane mikroigle su insertovane u kožu tokom 1 min

primenom specijalno dizajniranog aplikatora na bazi opruge (slika 3.3) čime je obezbeđena uniformna sila aplikovanja od približno 2 N. Merenje TEGV je sprovedeno odmah nakon uklanjanja mikroigala iz kože, kao i u unapred definisanim vremenskim intervalima tokom 2 h.



**Slika 3.3.** A) Silikonske mikroigle (Immupatch, Tyndall institut, Irska), B) mikroigle od čelika (AdminPatch<sup>®</sup> 600, AdminMed, USA) i C) specijalno dizajniran aplikator za primenu mikroigala u kožu

Dalje, kako bi se potvrdilo formiranje mikropora u koži prilikom aplikacije mikroigala, sprovedena je studija bojenja kože metilenskim plavim (engl., *dye-binding study*). Nakon pripreme kože uha svinje i fiksiranja na striroporsku ploču (3.2.25.1. *Protokol za pripremu kože uha svinje*), mikroigle su fiksirane za aplikator pomoću duple adhezivne trake i aplikovane u kožu. Nakon 1 min, mikroigle su uklonjene iz kože, a na tretirano mesto je nanet 1 ml 1% rastvora metilenskog plavog. Nakon 5 min, višak rastvora metilenskog plavog je pažljivo uklonjen pamučnim tupferima, a zatim je tretirano mesto pažljivo očišćeno pomoću tupfera natopljenog razblaženim etanolom (70%, V/V). Obojena koža je potom posmatrana pod trinokularnim mikroskopom SZM-168-TL (Motic), pri različitim uveličanjima.

### 3.2.27 In vivo ispitivanje farmakokinetike aceklofenaka iz odabranih formulacija nanoemulzija, sa i bez predtretmana kože mikroiglama

Ispitivanje farmakokinetike aceklofenaka nakon primene na kožu pacova odabranih formulacija nanoemulzija, sa i bez predtretmana kože odabranim čvrstim mikroiglama od čelika (AdminPatch® 600), sprovedeno je prema protokolu odobrenom od strane Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama, Univerziteta u Beogradu–Farmaceutskog fakulteta, a u skladu sa EU Direktivom 2010/63/EU (rešenje broj 323-07-09231/2016-05/1, izdato 14.10.2015. godine). Eksperimenti su sprovedeni na zdravim albino pacovima *Wistar* soja (farma Vojnomedicinske akademije, Srbija). Pacovi (telesne mase 200–300 g) su odgajani u standardnim kavezima od pleksiglasa, u dnevno/noćnom ciklusu od 12 h, pod kontrolisanim laboratorijskim uslovima: temperatura ( $22 \pm 1$  °C), relativna vlažnost (40–70%) i svetlost (120 lx). Životinjama su hrana i česmenska voda bile dostupne *ad libitum*.

U zavisnosti od tretmana kože, pacovi su podeljeni u 5 grupa (u svakoj grupi po 3 životinje): grupe 1 i 2 – nanoemulzija sa SP kao koemulgatorom (L<sub>2</sub>P<sub>2</sub>A), sa i bez predtretmana kože čvrstim mikroiglama, grupe 3 i 4 – nanoemulzija sa polisorbitom 80 (L<sub>2</sub>P80<sub>2</sub>A) kao koemulgatorom, sa i bez predtretmana kože čvrstim mikroiglama, grupa 5 – rastvor aceklofenaka i.v. (25 % etanola (96 % V/V) i 75 % fosfatnog pufera, pH 7,4).

Ukratko, na dan eksperimenta, životinje su podvrgnute kratkotrajnoj anesteziji primenom intraperitonealne injekcije ketamina (10% Ketamidol, Richter Pharma Ag, Wels, Austrija), nakon čega su dlake pažljivo uklonjene sa gornjeg dela leđa. Zatim, kako bi se sprečilo curenje ispitivanih formulacija sa mesta primene, na pripremljeni deo leđa, primenom cijanoakrilatnog lepka, fiksiran je plastični prsten površine 2,01 cm<sup>2</sup>. Ispitivane formulacije (500 µl) su nanete u fiksirane rezervoare, koji su potom zatvoreni silikonskim filmom (Parafilm™) kako bi se sprečila evaporacija vode (slika 3.4). U grupama tretiranim sa mikroiglama (grupe 2 i 4), neposredno pre fiksiranja plastičnog prstena, mikroigle su insertovane u kožu primenom specijalno dizajniranog aplikatora (slika 3.4), čime je obezbeđena konstantna sila tokom aplikacije. Nakon 1 min, mikroigle su uklonjene iz kože, a na tretirani deo kože je naneta ispitivana formulacija. Konačno, u grupi 5, rastvor aceklofenaka je primenjen i.v., u repnu venu, primenom infuzione pumpe (Stoelting Co., Wood Dale, SAD).



**Slika 3.4.** (a) Predtretman kože leđa pacova *Wistar* soja AdminPatch® 600 mikroiglama i (b) aplikacija ispitivanih uzoraka nanoemulzija, pomoću specijalno dizajniranih plastičnih prstenova

U prethodno definisanim vremenskim intervalima tokom 24 h (30 min, 1h, 3h, 6h, 24h), životinjama je izvađena krv iz repne vene ( $\leq 200 \mu\text{l}$ ), a zatim su sakupljeni uzorci krvi centrifugirani na 3000 rpm tokom 15 min korišćenjem Eppendorf MiniSpin® plus centrifuge (Westbury, NY, SAD) kako bi se dobila plazma. Nakon toga, aceklofenak i njegov metabolit diklofenak su ekstrahovani iz plazme, primenom protokola nedavno opisanog od strane Todosijević (2017). Ukratko, 100  $\mu\text{l}$  plazme, 25  $\mu\text{l}$  metanola i 200  $\mu\text{l}$  acetonitrila su izmešani na vorteks mešalici tokom 60 s. Smeša metanola i visokoprečišćene vode u odnosu 80:20 (v/v) dodata je potom do postizanja ukupne zapremine od 1 ml. Nakon mešanja na vorteks mešalici tokom 60 s, dobijeni rastvor je podvrgnut centrifugiranju pri 10000 rpm tokom 10 min. Priprema rastvora za konstrukciju kalibracione krive sprovedena je mešanjem 5  $\mu\text{l}$  rastvora radnog standarda (koncentracije aceklofenaka i diklofenaka od 1, 2, 5, 10, 20, 30 i 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  u metanolu) sa 95  $\mu\text{l}$  plazme, nakon čega je smeša podvrgnuta opisanom protokolu ekstrakcije. Po završetku ekstrakcije, supernatant je izdvojen, a koncentracija aceklofenaka i diklofenaka određena primenom UHPLC–MS/MS metode.

Na kraju eksperimenta, u cilju određivanja ukupne količine aceklofenaka i diklofenaka deponovane u koži, pacovi su žrtvovani i.p. injekcijom ketamina. Višak ispitivanih formulacija je pažljivo uklonjen, nakon čega je koža pune debljine tretirana ispitivanim uzorcima, izolovana sa svake životinje. Dalje, nakon usitnjavanja, sitni komadići kože su dodati u 5 mL metanola i mešani na orbitalnom šejkeru (IKA® KS 260 basic) pri

brzini od 250 rpm tokom 24 h na sobnoj temperaturi. Zatim je dobijena smeša centrifugirana (Centrifuge MPW-5) na 3000 rpm tokom 30 min , i dobijeni supernatant podvrgnut određivanju sadržaja aceklofenaka i diklofenaka primenom UHPLC–MS/MS metode.

Neprostorna farmakokinetička analiza je izvedena pomoću *PK Functions* dodatka za Microsoft Excel softverski paket (Usansky, Desai and Tang-Liu, Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA; <http://www.boomer.org/pkin/soft.html>). Iz dobijenih profila koncentracija aceklofenaka u plazmi, izračunati su sledeći farmakokinetički parametri: maksimalna koncentracija ( $C_{max}$ ), vreme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije ( $T_{max}$ ), površina ispod krive koncentracija–vreme od nultog vremena do poslednje vremenske tačke ( $AUC_{0-24h}$ ). Absolutna biološka raspoloživost aceklofenaka nakon transdermalne primene ispitivanih nanoemulzija, sa i bez predtretmana kože čvrstim mikroiglama, određena je u odnosu na intravenski rastvor, primenom sledeće jednačine:  $F_{abs} = AUC_{0-24h}$  nanoemulzija/ $AUC_{0-24h}$  i.v rastvor.

### 3.2.28 UHPLC-MS/MS

Određivanje koncentracije aceklofenaka u eluatima dobijenim tokom studije rastvorljivosti, praćenja hemijske stabilnosti aceklofenaka u razvijenim nanoemulzijama, in vitro ispitivanja brzine oslobađanja/permeacije aceklofenaka, in vitro cijanoakrilatne biopsije kože, in vitro/in vivo *tape stripping*-a, kao i in vivo farmakokinetičke studije, sprovedeno je korišćenjem UHPLC sistema sa MS detektorom – UHPLC Accela, opremljen sistemom za automatsko uzorkovanje, termostatom kolone i kvaternom pumpom (Thermo Fisher Scientific, SAD) i TSQ Quantum Access MAX trostruki kvadropolski maseni analizator sa elektrosprej izvorom jonizacije sa zagrevanjem (HESI) (Thermo Fisher Scientific, SAD). Razdvajanje je izvedeno na XTerra® MS C18 koloni (2,1×150 mm, 3,5 µm, Waters Corporation, Milford, Masačusets) na 25°C. Kao mobilna faza korišćena je smeša acetonitrila i 0,1% vodenog rastvora mravlje kiseline (75:25, v/v), sa brzinom protoka od 0,3 mL/min, a vreme trajanja analize bilo je 4,5 min. Parametri HESI izvora optimizovani su injektovanjem (20 µL/min) rastvora aceklofenaka u odgovarajućem rastvaraču



korišćenom za svaku od studija, pri protoku mobilne faze 300  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Hromatogrami aceklofenaka snimani su praćenjem odabrane jonske tranzicije (engl., *selected-reaction monitoring* - SRM) u pozitivnom modu. Optimizovani parametri HESI izvora su: napon spreja 5000 V; temperatura grejača jonske probe 400  $^{\circ}\text{C}$ ; direktan (linearni) protok azota kroz jonsku probu 30 jedinica; pomoćni (kružni) protok azota kroz jonsku probu 45 jedinica; temperatura kapilare 300  $^{\circ}\text{C}$ ; širina pika 0,7 na prvom kvadropolu; širina jonskog snopa  $m/z$  0,02; vreme skeniranja 200 ms. Xcalibur softver v 2.1.0.1139 (Thermo Fisher Scientific, SAD) korišćen je za prikupljanje i obradu podataka.

Masena spektrometrija je korišćena za detekciju specifičnih jona u cilju identifikacije analita. Skeniranjem celog MS spektra utvrđeno je da je dominantni jon  $[\text{M} + \text{H}]^{+}$  za aceklofenak  $m/z$  353,8. Za praćenje aceklofenaka odabrane su optimalne jonske tranzicije  $m/z$  353,8 $\rightarrow$ 213,9 (pri kolizionoj energiji 33 V) i  $m/z$  353,8 $\rightarrow$ 249 (pri kolizionoj energiji 6V). Dodatno, u zavisnosti od dizajna studije, pored aceklofenaka, u određenom broju eluata, sprovedeno je i određivanje sadržaja diklofenaka. Ponovo, skeniranjem celog spektra utvrđeno je da je dominantni jon  $[\text{M} + \text{H}]^{+}$  za diklofenak  $m/z$  296,0, a odabrana optimalna jonska tranzicija  $m/z$  214,0 (pri kolizionoj energiji 32V).

### 3.2.29 Statistička analiza

Statistička analiza rezultata fizičko-hemijske karakterizacije i studija stabilnosti svih ispitivanih uzoraka, prikazanih kao srednja vrednost parametra  $\pm$  standardna devijacija (SD), izvršena je primenom Student t-testa (za dve grupe podataka) ili jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) (za više od dve grupe podataka) uz *post hoc* analizu primenom Tukey's HSD testa. Takođe, rezultati biofarmaceutske karakterizacije, preliminarne procene iritacionog potencijala, *in vitro/in vivo* procene dermalne raspoloživosti kao i *in vivo* farmakokinetičke studije su analizirani, kada je to bilo moguće, primenom Student t-testa (za dve grupe podataka), odnosno, primenom jednofaktorske ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test (za više od dve grupe podataka). Kada preduslovi za parametarsku statističku analizu nisu bili ispunjeni, tj. kada varijanse nisu bile homogene i podaci nisu pratili normalnu distribuciju (nisu mogli ni da se transformišu u normalno distribuirane podatke), korišćen je neparametarski Kruskal–Wallis test, u kombinaciji sa Mann–Whitney U testom za međusobna

poređenja između grupa. Ispitivanje normalnosti dobijenih podataka sprovedeno je primenom Shapiro–Wilk testa. Statistička analiza dobijenih podataka je izvršena primenom PASW Statistics verzija 18.0 (SPSS Inc., Čikago, SAD). Statistička značajnost u svim testovima je postavljena na  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1 Rezultati i diskusija prve faze eksperimentalnog rada

#### 4.1.1 Razvoj formulacije nanoemulzija aceklofenaka – preformulaciona i formulaciona ispitivanja

Aceklofenak je relativno nov lek iz grupe NSAIL, koji poseduje analgetsko, antipiretičko i antiinflamatorno delovanje. Trenutno, na tržištu su dominantni oralni oblici aceklofenaka, namenjeni prevashodno za lečenje različitih bolesti/povreda skeletno-mišićnog sistema. Iako se aceklofenak smatra efikasnijim i bezbednijim u odnosu na većinu predstavnika grupe NSAIL, hronična oralna primena može da dovede do pojave prethodno opisanih, ozbiljnih GIT neželjenih efekata, koji su posledica inhibicije sinteze PG. Dodatno, oralnu primenu aceklofenaka karakteriše kratko biološko poluvreme eliminacije, varijabilna brzina apsorpcije u GIT-u kao i intenzivan metabolizam prvog prolaza u jetri, te se javlja sve veće interesovanje za razvojem farmaceutskih preparata za primenu na koži (Dasgupta i sar., 2013; Raza i sar., 2014). Imajući na umu dodatno niz specifičnih fizičko-hemijskih osobina aceklofenaka (npr. niska rastvorljivost u vodi, loša hemijska stabilnost, i prilično velika lipofilnost) koje se generalno smatraju problematičnim sa aspekta formulacije preparata za primenu na koži (Sharma i sar., 2016), u ovoj doktorskoj disertaciji predložen je razvoj biokompatibilnih nanoemulzija baziranih na surfaktantima prirodnog porekla.

Kako bi se uspešno iskoristile prednosti nanoemulzija kao nosača, preduslov je da aceklofenak, u željenoj koncentraciji, bude rastvoren u uljanoj fazi nanoemulzija (Savić, 2017). Stoga, prvi korak u dizajniranju formulacije nanoemulzija bio je odabir odgovarajuće uljane faze nanoemulzija. Kao što je prethodno opisano, rastvorljivost aceklofenaka u uljima različite polarnosti je određena *shake flask* metodom. Međutim, važno je naglasiti da se u literaturi navodi mogućnost upotrebe različitih organskih rastvarača (metanol, hloroform, dihlormetan-acetonitril (20:80, v/v)) za rastvaranje supernatanta dobijenog tokom studije rastvorljivosti. Stoga, prvo su sprovedena odgovarajuća preliminarna ispitivanja u cilju procene pogodnosti primene navedenih rastvarača za rastvaranje dobijenog, uljanog supernatanta. Dobijeni rezultati su potvrdili da nema razlike između ispitivanih rastvarača, odnosno, metanol kao najjeftiniji i

najjednostavniji rastvarač za praktični rad je pogodan za ispitivanje rastvorljivosti aceklofenaka u različitim uljima.

Najveća rastvorljivost aceklofenaka dobijena je u smeši MCT i ricinusovog ulja pri masenom odnosu 1:1 (m/m) ( $19,65 \pm 1,13$  mg/ml, tabela 4.1.1), te je ova smeša odabrana kao uljana faza za razvoj nanoemulzija. Štaviše, smeša MCT i ricinusovog ulja je poželjna kao uljana faza nanoemulzija, ne samo zbog najbolje rastvorljivosti aceklofenaka, već i zbog nižeg viskoziteta (u poređenju sa čistim ricinusovim uljem), kao i slobodnih masnih kiselina prisutnih u ricinusovom ulju, koje mogu da deluju kao kosurfaktanti i dodatni stabilizatori uljanih kapi (Jumaa i Müller, 1998a; 2001).

**Tabela 4.1.1.** Rastvorljivost aceklofenaka u ultračistoj vodi, različitim uljima i smešama ulja i lecitina iz jajeta

<b>Ekscipijensi</b>	<b>Rastvorljivost (mg/ml)</b>
Ultra čista voda	$0,005 \pm 0,001$
Izopropilmiristat	$3,60 \pm 0,46$
Sojino ulje	$1,72 \pm 0,21$
MCT	$6,10 \pm 1,15$
Ricinusovo ulje	$16,49 \pm 1,70$
MCT-ricinusovo ulje (1:1)	$19,65 \pm 1,13$
MCT-ricinusovo ulje (2:1)	$14,01 \pm 0,95$
MCT-ricinusovo ulje (3:2)	$16,19 \pm 1,52$
MCT-ricinusovo ulje-LE80 (10:10:0.5)	$28,11 \pm 1,46$
MCT-ricinusovo ulje-LE80 (10:10:1)	$52,79 \pm 1,07$
MCT-ricinusovo uljeil-LE80 (10:10:2)	$54,94 \pm 1,69$

LE80 – lecitin iz jajeta

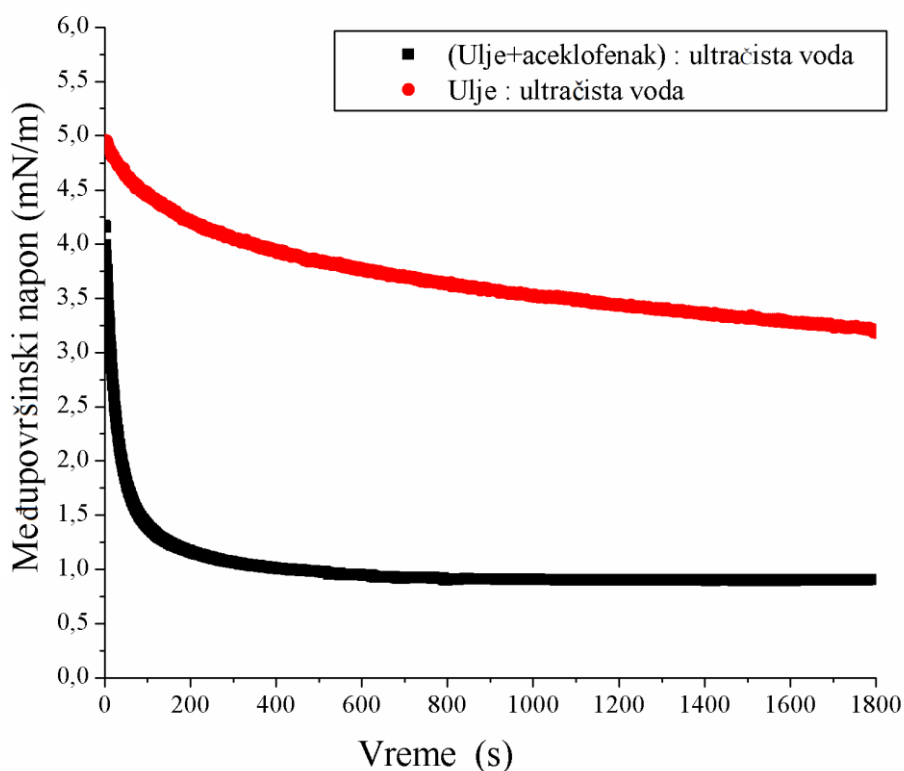
Međutim, rezultati studije rastvorljivosti pokazali su da je količina aceklofenaka koja se može rastvoriti u uljanoj fazi nanoemulzija (uobičajeno 20% *m/m*) tokom konvencionalnog *de novo* postupka izrade nedovoljna da se postigne željena koncentracija aceklofenaka u nanoemulziji (1%), te su dalje ispitivane različite strategije predložene za rešavanje problema ograničene rastvorljivosti lekovitih supstanci u nanoemulzijama (metod povišene temperature i dodatak solubilizatora). Jednostavno zagrevanje uljane faze na 50°C, nije dovelo do rastvaranja željene količine

aceklofenaka (50 mg aceklofenaka po ml uljane faze). Posledično, sprovedeno je ispitivanje rastvorljivosti u smešama odabrane uljane faze i lecitina, kao najčešće korišćenog solubilizatora u formulacijama nanoemulzija. Kao što se može videti u tabeli 4.1.1, prisustvo lecitina u minimalnoj koncentraciji od 1% ukupne nanoemulzije bilo je potrebno za inkorporiranje željene količine aceklofenaka i sprečavanje njegove precipitacije tokom čuvanja. Kako je poznato da prisustvo lecitina u višku može da podstakne destabilizaciju nanoemulzija (Klang i Valenta, 2011), koncentracije lecitina u opsegu 1–2% odabrane su za dalji razvoj nanoemulzija (nije uočena značajna razlika između rastvorljivosti aceklofenaka u smešama MCT-ricinusovo ulje-LE80 pri odnosu 10:10:1 i odnosu 10:10:2).

Međutim, važno je istaći da nije bilo moguće izraditi fizički stabilne nanoemulzije aceklofenaka korišćenjem lecitina kao jedinog emulgatora (vrlo brzo je uočeno razdvajanje faza), te je bilo neophodno uključiti dodatne surfaktante za postizanje odgovarajuće fizičko-hemijske stabilnosti. Kao što je već naglašeno, iako tradicionalni polietoksilovani nejonski surfaktanti pokazuju dobru funkcionalnost u kostabilizaciji nanoemulzija (Baspinar i sar., 2010; Hoeller i sar., 2009), njihova primena može dovesti do neželjenih reakcija na koži pod određenim uslovima, posebno kod osetljivih osoba (Bergh i sar., 1997;1998). Stoga, kako bi se obezbedila odgovarajuća biokompatibilnost i podnošljivost nanoemulzija, saharozni estri (SP i SS) su odabrani kao dodatni stabilizatori nanoemulzija. Pored povoljnog dermatološkog profila, pretpostavka je bila da bi sinergistički efekat između SP i SS, prvobitno uočen od strane Sultani i sar. (2003), mogao da doprinese formiranju nanoemulzija sa poboljšanom dugoročnom fizičkom stabilnošću. Takođe, saharozni estri, kao predstavnici nove generacije blagih penetracionih inženjera, potencijalno mogu da doprinesu poboljšanju penetracije aceklofenaka iz razvijenih nanoemulzija u/kroz kožu (Nava-Arzaluz i sar., 2015). Imajući na umu temperaturnu i koncentracionu zavisnost gelirajućih osobina odabranih saharoznih estara (Klang i sar., 2011b; Szűts i sar., 2010), prvobitno je sprovedena preliminarna studija kako bi se odredile maksimalne koncentracije koje omogućavaju izradu nanoemulzija primenom standardnog protokola. Uočeno je da gelirajući efekat oba saharozna estra pri koncentracijama  $\leq 2\%$  ima neznatan uticaj na postupak izrade nanoemulzija. Kao rezultat, u cilju razvoja nanoemulzija optimalnih osobina, udeo

lecitina iz jajeta postavljen je u opsegu od 1 do 2%, a udeo SP i SS je variran između 0 i 2%.

Analiziranjem hemijske strukture aceklofenaka, razumno je pretpostaviti da aceklofenak, kao i većina drugih lekova iz grupe NSAIL, poseduje amfilnu strukturu i posledično međupovršinsku aktivnost. Stoga, sprovedeno je merenje dinamičkog međupovršinskog napona između ultračiste vode i uljane faze (smeša MCT i ricinusovog ulja u odnosu 1:1), kao i između ultračiste vode i uljane faze u kojoj je rastvoren aceklofenak u koncentraciji 10 mg/ml, primenom tehnike viseće kapi (slika 4.1.1). Vrednosti izračunatog ravnotežnog međupovršinskog napona između uljane faze i vode, sa i bez prisustva aceklofenaka iznosile su  $0,89 \pm 0,23$  mN/m i  $2,62 \pm 0,48$  mN/m, respektivno, što jasno ukazuje da aceklofenak smanjuje međupovršinski napon, akumulirajući se u međusloju.



**Slika 4.1.1.** Dinamički međupovršinski napon u funkciji vremena, između uljane faze (smeša triglicerida srednje dužine lanca i ricinusovog ulja u odnosu 1:1) i ultračiste vode, sa 10 mg/ml aceklofenaka (crna linija) i bez prisustva aceklofenaka (crvena linija)

Konačno, imajući na umu da kvalitet nanoemulzija zavisi ne samo od sastava formulacije, već i od uslova izrade, tokom razvoja formulacije nanoemulzija aceklofenaka, cilj je bio simultano identifikovati sastav smeše surfaktanata koji zajedno sa odgovarajućim procesnim parametrima rezultuje nanoemulzijama aceklofenaka sa željenim karakteristikama. U tu svrhu korišćen je kombinovani/ukršteni smeša-proces eksperimentalni dizajn o čemu će više biti reči u narednom delu. Kao kritični procesni parametri koji mogu u značajnom procentu da utiču na karakteristike nanoemulzija identifikovani su pritisak i broj ciklusa homogenizacije. Posledično, praćen je uticaj dva pritiska homogenizacije (500 i 800 bar) koji se uobičajeno primenjuju u industrijskim uslovima za proizvodnju nanoemulzija, kako bi se imitirali uslovi izrade nanoemulzija u industriji (koliko je moguće) i smanjio na minimum rizik od kontaminacije metalima koja se može javiti kao posledica habanja metalnih delova homogenizatora, pri primeni većih pritisaka homogenizacije (npr. 1500 bar) (Müller i sar., 2012). Istovremeno, praćen je i uticaj dva različita broja ciklusa homogenizacije (15 i 20) na CQA nanoemulzija. Ove vrednosti odabrane su na osnovu rezultata preliminarne studije, kojom je utvrđeno da je minimalno 15 ciklusa potrebno da bi se dobila homogena distribucija kapi po veličini, a maksimum 20 kako bi se sprečio *over-processing* i porast veličine kapi. Uočen *over-processing* pri povećanju broja ciklusa homogenizacije je verovatno posledica porasta broja sudara kapi i rekoalescencije nanokapi, usled nedovoljne koncentracije surfaktanata potrebne za oblaganje novonastalih površina (Klang i Valenta, 2011).

**Tabela 4.1.2.** Ukršteni D-optimalni dizajn matriks i vrednosti praćenih odgovora (veličina kapi (nm) (Z-ave), polidisperzni indeks (PI))

Smeša (%)			Lek	Procesni parametri							
LE80	SS	SP		500 bar, 15 ciklusa		500 bar, 20 ciklusa		800 bar, 15 ciklusa		800 bar, 20 ciklusa	
				Z-ave	PI	Z-ave	PI	Z-ave	PI	Z-ave	PI
2	2	0	ne	197,0±1,7	0,115±0,022	189,8±2,3	0,123±0,020	195,6±1,9	0,113±0,027	187,6±1,8	0,115±0,034
2	2	0	da	280,0±3,3	0,184±0,023	269,2±2,7	0,149±0,019	215,6±0,5	0,135±0,009	200,5±1,1	0,113±0,032
2	0	2	ne	225,7±2,1	0,144±0,020	215,0±0,8	0,131±0,037	194,4±2,9	0,134±0,006	182,6±2,7	0,117±0,022
2	0	2	da	193,4±2,6	0,114±0,029	182,3±2,1	0,112±0,013	185,7±1,5	0,112±0,016	178,8±3,8	0,104±0,017
1	2	1	ne	217,5±0,3	0,147±0,002	206,8±4,4	0,136±0,027	206,9±2,4	0,141±0,003	194,1±1,6	0,128±0,008
1	2	1	da	222,6±3,1	0,183±0,023	213,0±1,3	0,157±0,013	195,4±1,9	0,147±0,009	187,7±1,0	0,124±0,013
1	1	2	ne	218,2±2,4	0,149±0,021	206,4±4,8	0,141±0,017	191,8±1,8	0,144±0,031	182,0±2,7	0,133±0,017
1	1	2	da	215,0±1,3	0,125±0,012	201,5±3,9	0,131±0,033	188,4±0,2	0,129±0,027	180,5±3,0	0,120±0,037
2	1	1	ne	232,5±3,6	0,132±0,016	225,6±2,4	0,128±0,023	199,0±2,9	0,124±0,026	190,2±1,9	0,126±0,026
2	1	1	da	221,0±3,8	0,165±0,037	218,0±3,4	0,162±0,028	207,9±1,1	0,156±0,019	203,1±0,9	0,159±0,021
1,5	2	0,5	ne	–	–	202,0±3,8	0,109±0,033	–	–	180,2±3,0	0,109±0,005
						205,0±2,9	0,105±0,029			182,2±3,2	0,111±0,002
1,5	2	0,5	da	252,0±2,9	0,175±0,020	240,7±3,9	0,152±0,007	224,0±2,1	0,149±0,022	–	–
								221,2±1,1	0,146±0,011		
1,5	0,5	2	ne	220,7±2,8	0,163±0,021	–	–	–	–	192,6±2,9	0,113±0,018 <sup>a</sup>
				225,0±2,5	0,169±0,019						
1,5	0,5	2	da	–	–	–	–	–	–	181,2±0,8	0,110±0,006
										186,1±3,0	0,109±0,002

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (n = 3).

<sup>a</sup> Formulacija je dodatno pripremljena kao placebo za odabranu optimalnu formulaciju L<sub>1,5</sub>S<sub>0,5</sub>P<sub>2</sub>A



#### 4.1.2 Kombinovani smeša-proces eksperimentalni dizajn

Primena sveobuhvatnog smeša-proces eksperimentalnog dizajna omogućila je da se: 1) istovremeno analiziraju efekti komponenti smeše surfaktanata (lecitin iz jajeta, SP i SS), procesnih faktora (pritisak i broj ciklusa homogenizacije) i prisustva/odsustva aceklofenaka na karakteristike nanoemulzija, 2) izračunaju kompleksne interakcije između ispitivanih varijabli, kao i 3) optimizuje sastav formulacije primenom dizajna smeše, i istovremeno, uslovi izrade primenom faktorijalnog dizajna. Interesantno je naglasiti da je, tokom poslednje dve decenije, intenzivno ispitivana mogućnost primene metodologije eksperimentalnog dizajna (posebno, faktorijalnog i dizajna smeše), u razvoju nanoemulzija. Među prvima, Jumaa i sar. (1998b, 1999) koristili su *simplex lattice design* kako bi procenili uticaj binarnih/ternarnih smeša različitih ulja i emulgatora na fizičko-hemijske karakteristike nanoemulzija, pri čemu nije razmatran uticaj procesnih parametara i njihovih kombinacija. Nedavno, primenom generalnog faktorskog dizajna ispitivan je uticaj tipa koemulgatora, vrste vodene faze i tipa HPH metode (hladni/topli postupak) na karakteristike i stabilnost placebo nanoemulzija (Savić, 2017). Međutim, za razliku od do sada sprovedenih ispitivanja, cilj ove studije je bio da se proceni efekat smeše surfaktanata i kako oni interaguju sa odabranim procesnim parametrima, u prisustvu/odsustvu aceklofenaka kao model lekovite supstance. Drugim rečima, ovo je prva studija u literaturi u kojoj je korišćen kombinovani smeša-proces eksperimentalni dizajn u razvoju nanoemulzija.

U skladu sa šemom generisanom primenom D-optimalnog dizajna, izrađene su 52 formulacije nanoemulzija i izmereni odgovarajući parametri od interesa (veličina kapi i PI) (tabela 4.1.2). Kao što se može videti u tabeli 4.1.2, određene tačke u dizajnu su ponovljene kako bi se procenila eksperimentalna greška i *lack of fit*, odnosno, pogodnost odabranog modela. Eksperimentalni podaci su uklapani u različite modele, kako bi se pronašao model koji je značajan za praćene odgovore (veličinu kapi i PI). Na osnovu dobijenih rezultata odabran je kvadratni model za smešu, kombinovan sa modelom dvofaktorskih interakcija za proces, za oba praćena odgovora. Drugim rečima, na osnovu dobijenih F vrednosti za svaki od modela ( $p < 0,0001$ ) i neznačajnog *lack of fit* ( $p > 0,05$ ), utvrđeno je da su predloženi modeli značajni i za komponente smeše i procesne faktore. Za svaku zavisnu varijablu (veličinu kapi i PI) izračunati su efekti ispitivanih faktora i njihovih interakcija, a statistička značajnost je proverena ANOVA testom. Vrednosti koeficijenata modela za veličinu kapi i PI dati su u tabeli 4.1.3.

**Tabela 4.1.3.** Vrednosti koeficijena modela za veličinu kapi (*Z-ave*) i polidisperzni indeks (*PI*), sa standardnim greškama (*S.E.*)

Odgovor	Srednja vrednost	D	E	F	DE	DF	EF	S.E.	
<b>Z-ave</b>	<b>A</b>	172,36	-4,71*	23,54*	-41,96*	29,51*	-24,69*	7,86	7,13
	<b>B</b>	194,74	-9,36*	-5,06*	-9,69*	0,39	6,56*	0,56	0,60
	<b>C</b>	216,91	-17,09*	-5,14*	24,41*	-0,64	-16,19*	-1,34*	0,60
	<b>AB</b>	57,70*	-21,05	-58,45*	96,80*	-56,00*	37,85*	-16,75	14,28
	<b>AC</b>	43,45*	5,70	-57,20*	31,80	-57,85*	67,15*	-9,95	13,82
	<b>BC</b>	25,35*	4,45	8,65*	-28,10*	-1,35	39,70*	5,50	2,93
<b>PI</b>	<b>A</b>	0,130	-0,049*	0,094*	0,043*	0,026	0,014	-0,096*	0,013
	<b>B</b>	0,120	-0,004*	-0,005*	-0,010*	-0,001	0,002	0,003*	0,001
	<b>C</b>	0,130	-0,012*	-0,006*	0,014*	0,001	-0,009*	-0,008*	0,001
	<b>AB</b>	0,027	0,096*	-0,190*	-0,096*	-0,058	-0,029	0,200*	0,027
	<b>AC</b>	0,053	0,080*	-0,210*	-0,086*	-0,053	-0,037	0,200*	0,026
	<b>BC</b>	0,072*	0,021*	0,021*	0,058*	0,007	0,014*	0,013*	0,005

\*Statistički značajno pri  $p < 0,05$ . Linearne komponente smeše su bile statistički značajne.

Očekivano, potpuni ukršteni modeli sadržali su nekoliko članova čiji koeficijenti nisu bili statistički značajni ( $p > 0,05$ ). Stoga, faktori i interakcije čiji efekat na praćene odgovore nije bio statistički značajan eliminisani su *backward* metodom (izuzev onih koji su bili neophodni za održavanje hijerarhije), te su tako formirani redukovani regresioni modeli za ispitivane parametre nanoemulzija. Dobijene finalne jednačine odgovora u pogledu U-pseudokomponenta i kodiranih vrednosti faktora date su u produžetku (4.1.1–4.1.2):

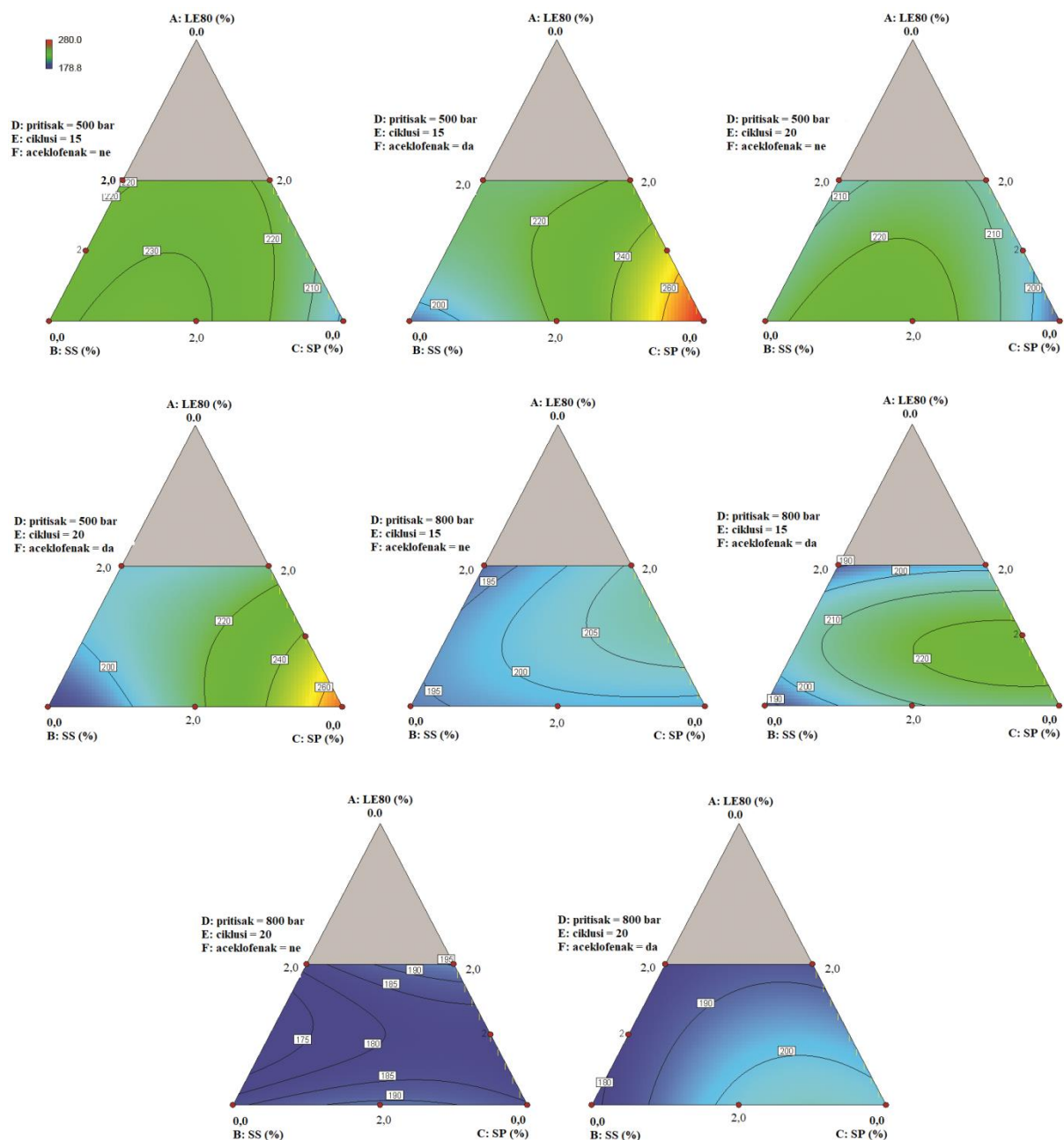
$$\begin{aligned}
 Z - ave(nm) = & 168.30A + 194.70B + 216.95C + 65.59AB + 51.82AC - 7.87AD + 26.45AE \\
 & - 38.20AF + 25.35BC - 9.32BD - 5.02BE - 9.65BF - 17.13CD - 5.18CE + 24.37CF - \\
 & 14.49ABD - 64.03ABE + 89.51ABF + 11.78ACD - 63.26ACE + 24.03ACF + \\
 & 32.89ADE - 21.83ADF + 4.45BCD + 8.65BCE - 28.10BCF + 0.23BDE + 6.52BDF - \\
 & 0.71CDE - 16.15CDF - 62.77ABDE + 31.89ABDF - 64.14ACDE + 61.67ACDF + \\
 & 39.70BCDF
 \end{aligned} \tag{4.1.1}$$

$$\begin{aligned}
 PI = & 0.150A + 0.120B + 0.130C - 0.0002AB + 0.027AC - 0.038AD + 0.084AE \\
 & + 0.030AF + 0.072BC - 0.004BD - 0.005BE - 0.011BF - 0.012CD - 0.006CE + \\
 & 0.015CF + 0.074ABD - 0.170ABE - 0.071ABF + 0.059ACD - 0.190ACE - \\
 & 0.059ACF - 0.0004ADE + 0.001ADF - 0.081AEF + 0.021BCD + 0.021BCE + \\
 & 0.058BCF - 0.001BDE + 0.002BDF + 0.002BEF - 0.009CDF - 0.008CEF - \\
 & 0.008ABDE + 0.160ABEF - 0.008ACDF + 0.170ACEF + 0.015BCDF + 0.013BCEF
 \end{aligned} \tag{4.1.2}$$

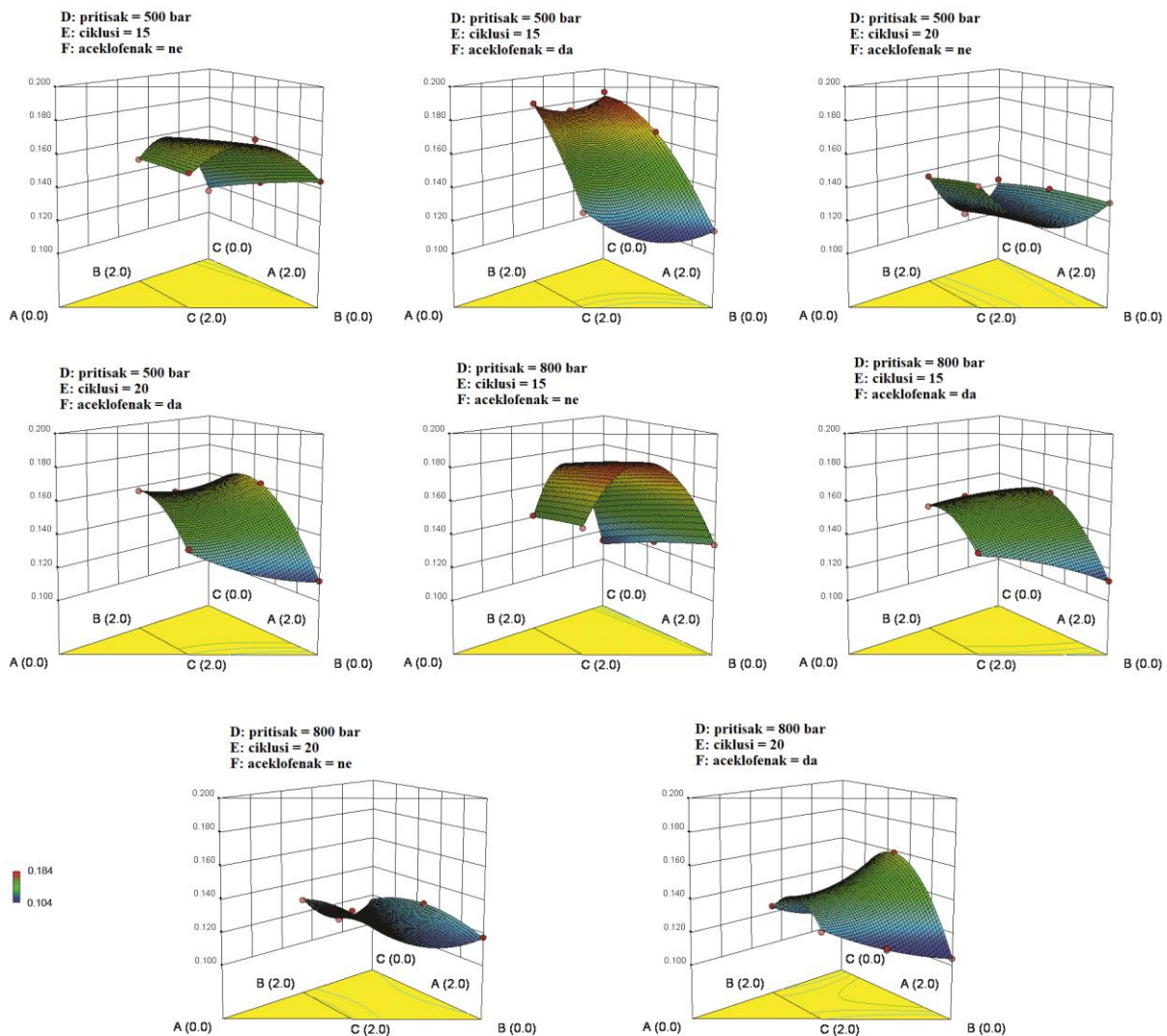
Primenom ANOVA-e potvrđeno je da su generisani kombinovani modeli za oba praćena odgovora (veličinu kapi i PI) statistički značajni ( $p < 0,0001$ ) sa neznačajnim *lack of fit* ( $p > 0,1$ ). Oba modela su imala visoke vrednosti koeficijenta determinacije ( $R^2$ ), prilagođenog koeficijenta determinacije, kao i adekvatne vrednosti preciznosti (0,9975, 0,9926, 65,025 za veličinu kapi, i 0,9925, 0,9726, 26,073 za PI, respektivno), što ukazuje da su oba odgovora dobro opisana predloženim modelima.

Kao što se može videti iz jednačina 4.1.1. i 4.1.2., dobijeni modeli su prilično kompleksni, te nije bilo jednostavno interpretirati efekte smeše i procesnih varijabli, kao i njihovih interakcija na praćene odgovore. Značajne vrednosti koeficijenata ispred interakcija AD, AE, AF, BD, BE, BF, CD, CE, i CF (tabela 4.1.3), ukazuju da procesne varijable, kao i prisustvo model lekovite supstance (kategorička varijabla), utiču, na određeni način, na efekte komponenti smeše. Na primer, negativni koeficijenti ispred BD i CD interakcija ukazuju da povećanje udela SS (B) ili SP (C) u smeši, zajedno sa povećanjem pritiska homogenizacije (D) dovodi do smanjenja veličine kapi i PI. Dalje, značajna vrednost koeficijenta ispred ABDF ukazuje na prisustvo interakcije između pritiska homogenizacije i prisustva leka u pogledu veličine kapi nanoemulzija stabilizovanih smešom LE80 i SS. Jedna od mogućih interpretacija uočene interakcije mogla bi da bude da su razlike u prosečnoj veličini kapi nanoemulzija stabilizovanih smešom LE80/SS pri ispitivanim pritiscima homogenizacije (500 bar i 800 bar) značajno veće za nanoemulzije sa aceklofenakom, u odnosu na formulacije bez aceklofenaka. Preciznije, za nanoemulzije izrađene smešom LE80/SS, efekat prisustva aceklofenaka je značajno različit pri različitim vrednostima pritiska homogenizacije. Slično bi se mogao objasniti i efekat ostalih značajnih faktora i njihovih interakcija (tabela 4.1.3) na vrednosti praćenih parametara.

Usled prilično komplikovanog tumačenja vrednosti koeficijenata, fitovani prediktivni modeli za veličinu kapi i PI (jednačine 4.1.1 i 4.1.2) su dalje korišćeni za generisanje različitih konturnih dijagrama i dijagrama površine odgovora (slika 4.1.2. i 4.1.3), kako bi se olakšala interpretacija uticaja procesnih varijabli i prisustva/odsustva aceklofenaka na osobine smeše surfaktanata. Poređenjem dobijenih dijagrama može se jasno uočiti da su, usled značajnih interakcija između sastava smeše surfaktanata i ostalih faktora, dobijeni grafici značajno različiti u zavisnosti od nivoa ispitivanih procesnih varijabli i prisustva/odsustva aceklofenaka.



**Slika 4.1.2.** Konturni dijagrami koji prikazuju veličinu kapi nanoemulzija (nm) u funkciji osam različitih kombinacija ispitivanih procesnih varijabli (pritisak i broj ciklusa homogenizacije) i kategoričke varijable (prisustvo/odsustvo aceklofenaka)



**Slika 4.1.3.** Dijagrami površine odgovora koji prikazuju polidisperzni indeks nanoemulzija u funkciji osam različitih kombinacija ispitivanih procesnih varijabli (pritisak i broj ciklusa homogenizacije) i kategoričke varijable (prisustvo/odsustvo aceklofenaka)

Nakon detaljne analize efekata ispitivanih varijabli, sprovedena je njihova istovremena optimizacija (primenom numeričke i grafičke metode) u cilju odabira smeša-proces kombinacije koja omogućava izradu nanoemulzija aceklofenaka prihvatljivih/željenih karakteristika. Tokom procesa numeričke optimizacije, postavljeni su željeni ciljevi (ograničenja) za svaki od ispitivanih faktora i praćenih odgovora. Polazeći od pretpostavke da monodisperzne nanoemulzije sa veoma malom veličinom kapi poseduju bolju dugoročnu fizičku stabilnost i omogućavaju poboljšanu penetraciju inkorporirane lekovite supstance u kožu (Choi i sar., 2011; Klang i sar., 2015; Nam i sar., 2012), tokom procesa optimizacije postavljeni su sledeći kriterijumi: minimalna veličina kapi (sa donjom i gornjom granicom

160 i 200 nm, respektivno), PI u opsegu od 0,09–0,13. Radi pojašnjenja postavljenih limita, važno je naglasiti da se u literaturi vrednost PI manja od 0,15 (Jumaa i Müller, 2001), odnosno manja od 0,2 (Baspinar i sar., 2010), koristi za opisivanje sistema sa uskom distribucijom kapi po veličini. Na osnovu dobijenih rezultata (tabela 4.1.2), sve ispitivane nanoemulzije mogu se opisati kao sistemi sa uskom distribucijom kapi po veličini. Ipak, tokom numeričke optimizacije, postavljen je strožiji kriterijum za PI (približno 0,1, odnosno, u opsegu 0,09–0,13), kako bi se isključile formulacije sa eventualno širom distribucijom kapi po veličini.

Svi ciljevi za odabrane odgovore sistema kombinovani su u opštu funkciju poželjnih odgovora (engl., *overall desirability function*), a zatim je izračunata vrednost globalnog optimuma (engl., *global desirability value*), u opsegu od nula do jedan, tj., od najmanje do najpoželjnije vrednosti u ispitivanom eksperimentalnom području, odnosno utvrđena je kombinacija faktora koja daje najbolji globalni optimum. U tabeli 4.1.4. predstavljeni su optimalni odnosi komponenti smeše surfaktanata dobijeni pri različitim procesnim uslovima, predviđene vrednosti za veličinu kapi i PI, kao i poželjnost rešenja. Kao što se može i videti iz dobijenih rezultata, optimalne nanoemulzije aceklofenaka su se razlikovale u zavisnosti od procesnih parametara (tabela 4.1.4)

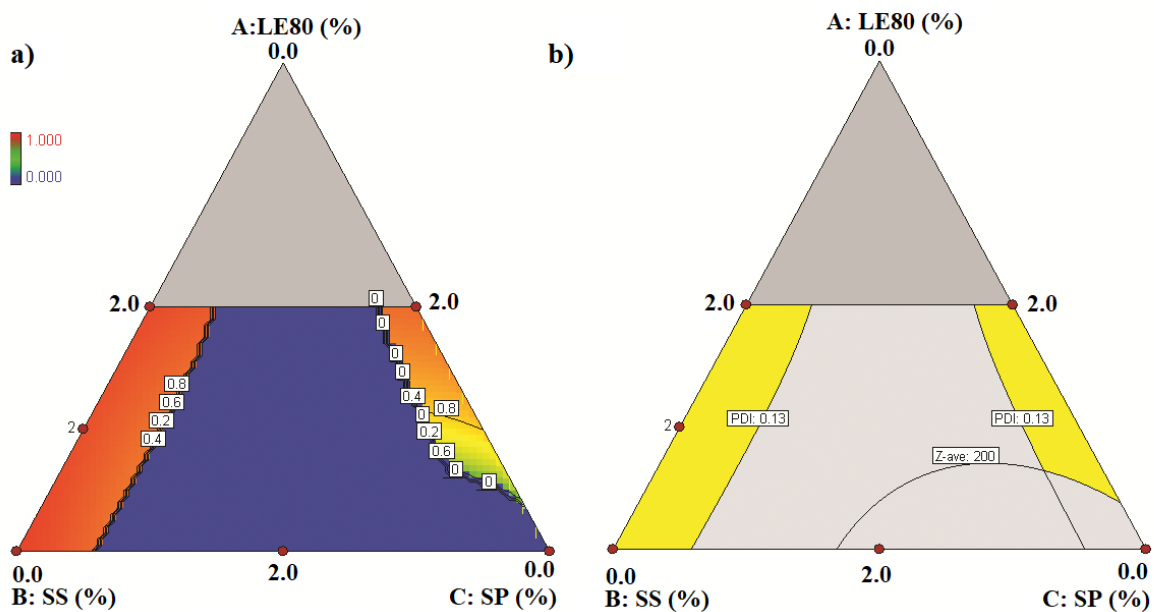
**Tabela 4.1.4.** Rešenja dobijena numeričkom optimizacijom za kombinovani smeša-proces eksperimentalni dizajn (nanoemulzije sa aceklofenakom)

LE80 (%)	SS (%)	SP (%)	Pritisak (bar)	Broj ciklusa	Z-ave (nm)	PI	Poželjnost
2	0	2	800	20	177,5	0,104	0,944 <sup>a</sup>
1	1	2	800	20	180,0	0,120	0,933 <sup>b</sup>
1	2	1	800	20	186,4	0,125	0,898 <sup>c</sup>
2	0	2	800	15	187,0	0,111	0,893
1	1	2	800	15	188,9	0,128	0,880
2	0	2	500	20	182,6	0,111	0,920
2	0	2	500	15	193,1	0,115	0,839

<sup>a, b, c</sup> L<sub>2</sub>P<sub>2</sub>A, L<sub>1</sub>S<sub>1</sub>P<sub>2</sub>A, L<sub>1</sub>S<sub>2</sub>P<sub>1</sub>A – oznake odabranih optimalnih formulacija nanoemulzija ukazuju na njihov kvalitativni i kvantitativni sastav

Grafički prikaz funkcije poželjnih odgovora (engl., *desirability plot*) i preklapanje grafika kontura (engl., *overlay* dijagram) za nanoemulzije aceklofenaka izrađene pri pritisku homogenizacije od 800 bar i 20 ciklusa homogenizacije, a koji omogućava određivanje oblasti

u okviru koje su svi razmatrani odgovori sistema prihvatljivi/željeni, predstavljeni su na slici 4.1.4. Neosenčeni „optimalni“ delovi na grafiku preklapanja predstavljaju smeše koje omogućavaju dobijanje nanoemulzija sa prihvatljivim vrednostima veličine kapi i PI (u skladu sa definisanim optimalnim kriterijumima), dok osenčeni delovi predstavljaju regione koji ne zadovoljavaju postavljene kriterijume. Stoga, grafičkom optimizacijom identifikovane su poželjne vrednosti procesnih i kategoričkih varijabli, zajedno sa odgovarajućom kombinacijom komponenti smeše.



**Slika 4.1.4.** Grafički prikaz funkcije poželjnih odgovora (a) i preklapanje grafika kontura (b) za nanoemulzije aceklofenaka pri definisanim vrednostima procesnih parametara (800 bar, 20 ciklusa)

Međutim, grafici predstavljeni na slici 4.1.4. jasno pokazuju da pored numeričkih rešenja predstavljenih u tabeli 4.1.4, postoje i druge formulacije nanoemulzija koje zadovoljavaju postavljene zahteve. Na primer, nanoemulzija aceklofenaka stabilizovana smešom sa 1,5% lecitina, 0,5% SS i 2% SP (u daljem tekstu označena kao  $L_{1,5}S_{0,5}P_2A$ ) nije među predloženim rešenjima, iako je vrednost veličine kapi 181,7 nm i PI 0,111, sa visokom vrednošću indeksa poželjnosti (engl., *desirability index*) (0,9253). Stoga, sveobuhvatno, na osnovu rezultata numeričke i grafičke optimizacije, nanoemulzije aceklofenaka sa najvećim indeksom poželjnosti i najmanjom veličinom kapi, označene kao  $L_2P_2A$ ,  $L_1S_1P_2A$ ,  $L_1S_2P_1A$ , i  $L_{1,5}S_{0,5}P_2A$  su odabrane kao optimalne formulacije i dalje podvrgnute sveobuhvatnoj fizičko-hemijskoj karakterizaciji, proceni stabilnosti i in vivo performansi (iritacioni potencijal i

efikasnost isporuke aceklofenaka u/kroz kožu). Dodatno, sprovedena su uporedna ispitivanja odgovarajućih placebo formulacija ( $L_2P_2$ ,  $L_1S_1P_2$ ,  $L_1S_2P_1$ , i  $L_{1,5}S_{0,5}P_2$ ) kako bi se ispitao uticaj samog aceklofenaka na fizičko-hemijske karakteristike i stabilnost nanoemulzija.

Konačno, kako bi se potvrdila validnost optimalnih parametara i izračunatih predviđenih odgovora, odabrana je jedna od optimalnih nanoemulzija aceklofenaka ( $LE_{80} = 2\%$ ,  $SP = 2\%$ , pritisak homogenizacije = 800 bar, broj ciklusa homogenizacije = 20) sa najvećom vrednošću indeksa poželjnosti (0,944). Prvo su izrađene tri serije ove formulacije, a zatim su eksperimentalno dobijene vrednosti za veličinu kapi i PI upoređene sa predviđenim vrednostima ovih parametara. Interesantno, eksperimentalne vrednosti ( $Z\text{-ave} = 179,2 \pm 3,1$ ;  $PI = 0,111 \pm 0,012$ ) bile su u potpunosti u skladu sa predviđenim vrednostima praćenih parametara ( $Z\text{-ave} = 177,5$ ,  $PI = 0,104$ ; tabela 4.1.4), što ukazuje da se razvijeni kombinovani smeša-proces eksperimentalni dizajn može uspešno koristiti za procenu i optimizaciju sastava formulacije i uslova izrade/proizvodnje nanoemulzija.

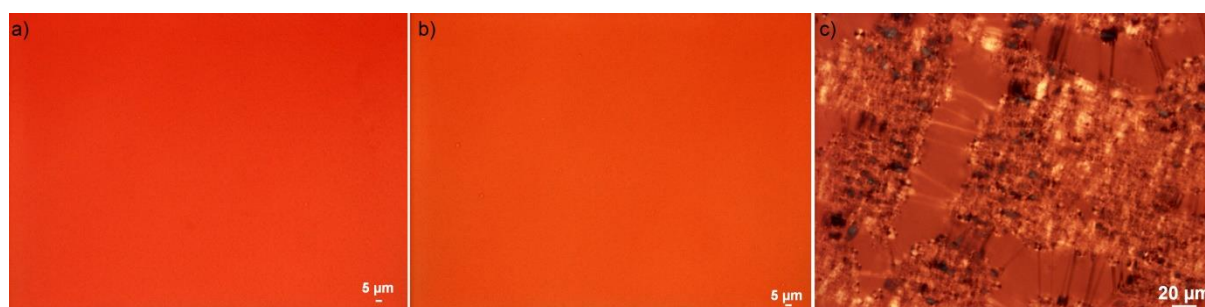
### **4.3.3 Fizičko-hemijska karakterizacija odabranih optimalnih nanoemulzija**

Nakon odabira optimalnih nanoemulzija, sprovedena je sveobuhvatna fizičko-hemijska karakterizacija kako bi se procenila stabilnost i otkrile potencijalno prisutne lek-nosač interakcije koje mogu uticati na performanse razvijenih nanoemulzija (efikasnost isporuke aceklofenaka u/kroz kožu i bezbednosni profil). Tako, analiziranjem veličine kapi (tabela 4.1.2), može se uočiti da je dodatak aceklofenaka doveo do određenog (više ili manje izraženog) smanjenja veličine kapi svih optimalnih formulacija u odnosu na odgovarajuće placebo uzorke. Ovo zapažanje potvrđuje da aceklofenak, na neki način, učestvuje u mikrostrukturi ispitivanih nanoemulzija. Imajući na umu rezultate studije rastvorljivosti i merenja međupovršinskog napona, logično je pretpostaviti da je u optimalnim nanoemulzijama, značajna količina aceklofenaka lokalizovana u ulje-voda međusloju, sa karboksilnom grupom orjentisanom ka vodenoj fazi nanoemulzija. Međutim, važno je primetiti da inkorporiranje aceklofenaka nije dovelo do smanjenja veličine kapi svih formulacija izrađenih prema ukrštenom D-optimalnom dizajnu matriksu (tabela 4.1.2), što dalje implicira da lokalizacija aceklofenaka u nanoemulzijama zavisi od karakteristika međupovršinskog filma, tj., sastava smeše surfaktanata upotrebljenih za stabilizaciju i procesnih parametara (Baspinar i sar., 2010).

Iako se DLS smatra metodom izbora za određivanje veličine kapi, treba imati na umu da se ovom tehnikom ne može detektovati eventualno prisutna mala frakcija većih uljanih kapi u



prisustvu velikih količina nanokapi izrazito male veličine (Müller i sar., 2012; Savić, 2017). Kako bi se detektovao, odnosno, kvantifikovao sadržaj većih kapi predlaže se primena dodatnih metoda za karakterizaciju, kao što su svetlosna (polarizaciona) mikroskopija, LD, *Coulter*-ov brojač i druge. Svaka od navedenih metoda poseduje određene nedostatke, te se preporučuje dodatna kombinovana primena minimum dve različite metode kako bi se dobio najpotpuniji uvid u unutrašnju strukturu nanoemulzija (Müller i sar., 2012). Na primer, svetlosna (polarizaciona) mikroskopija se ne može koristiti za određivanje veličine kapi nanoemulzija, jer je veličina nanokapi ispod limita detekcije, čak i pri uveličanju 1000 $\times$ . Međutim, kapi dijametra 1  $\mu\text{m}$  i veće, prisustvo agregata i kristala nerastvornog leka se može jednostavno detektovati ovom tehnikom. Glavna prednost primene svetlosne mikroskopije je u tome što se nanoemulzije ne razblažuju pre analize, te je povećana verovatnoća da se detektuju eventualno prisutne veće kapi (Müller i sar., 2012).



**Slika 4.1.5.** Svetlosne mikrografije odabranih nanoemulzija aceklofenaka na bazi saharoznih estara (a)  $L_2P_2A$  i (b)  $L_{1,5}S_{0,5}P_2A$  u nativnom stanju i nakon 2h sušenja na predmetnom staklu (c)  $L_2P_2A$ , pri uveličanju 400 $\times$

Na slici 4.1.5 predstavljeni su primeri svetlosnih mikrografija odabranih nanoemulzija na bazi saharoznih estara, na kojima se može videti svega par kapi sa veličinom u mikrometarskom opsegu, pri čemu nisu vidljivi agregati kao ni kristali nerastvornog aceklofenaka. Interesantno, nisu uočene značajne razlike između ispitivanih formulacija, što ukazuje na zadovoljavajući kvalitet svih optimalnih nanoemulzija. Dodatne informacije o razvijenim nanoemulzijama dobijene su posmatranjem ponašanja promena u strukturi nakon nanošenja na mikroskopsku pločicu. Interesantno, vrlo brzo nakon aplikacije, kap svih ispitivanih nanoemulzija je započinjala geliranje, što je donekle bilo i očekivano, s obzirom da je gelirajući efekat oba saharozna estra korišćena za izradu nanoemulzija dobro opisan u literaturi. Na slici 4.1.5 predstavljen je mikroskopski izgled filma formiranog na predmetnom staklu nakon 2h sušenja na sobnoj temperaturi. Sličnu pojavu uočili su Klang i sar. (2011b)

posmatranjem pod mikroskopom nanoemulzije izrađene sa 5% SS kao jedinog stabilizatora. Autori su zaključili da formirana, uređena strukturna mreža poseduje određene karakteristike slabe tečnokristalne, i posebno lamelarne gel mreže.

S obzirom da se primenom svetlosne mikroskopije može detektovati prisustvo većih kapi, ali ne i tačna veličina, kako bi se dobile preciznije informacije o eventualno prisutnim većim kapima, LD je korišćena kao dodatna metoda za određivanje veličine kapi. Iako je LD generalno brza i praktična metoda, kao glavni nedostatak navodi se određivanje relativne raspodele veličina kapi, a ne ukupnog broja čestica u svakoj klasi veličine po zapremini (Müller i sar., 2012). Vrednost  $d(0,5)$  dijametara svih ispitivanih nanoemulzija aceklofenaka, kao i odgovarajućih placebo bila je u opsegu od 170 nm do 240 nm (tabela 4.1.5), što potvrđuje da su rezultati dobijeni primenom LD u skladu sa rezultatima dobijenim primenom DLS metode. Takođe, odsustvo većih kapi (iznad 1  $\mu\text{m}$ ) garantovano je vrednostima  $D_{\text{max}}$ , koji su bile manje od 420 nm, za sve ispitivane formulacije. Drugim rečima, sve kapi ispitivanih nanoemulzija posedovale su veličinu kapi ispod  $D_{\text{max}}$  vrednosti (tabela 4.1.5).

Kako bi se upotpunile informacije o veličini/raspodeli veličina kapi, i dobio dodatni uvid u oblik i morfološke karakteristike površine kapi, sprovedena je AFM analiza, kao dodatni korak u sveobuhvatnoj karakterizaciji odabranih, optimalnih nanoemulzija. Prvo, tokom pripreme uzoraka za AFM analizu uočeno je da sve nanoemulzije na bazi saharoznih estara geliraju odmah nakon nanošenja na mika pločicu, što je bilo u skladu sa nalazima dobijenim primenom svetlosnog/polarizacionog mikroskopa. Usled izraženog gelirajućeg efekta nerazblaženih uzoraka nanoemulzija sušenih na sobnoj temperaturi na vazduhu ili u eksikatoru tokom 12 h nije bilo moguće dobiti odgovarajuće mikrografije primenom navedenog AFM mikroskopa. Sušenje u vakuumu nerazblaženih uzoraka rezultovalo je formiranjem struktura nalik na planarne slojeve i terase (slika 4.1.6), koje ukazuju na eventualno prisustvo tečnokristalne, posebno lamelarne gel faze. Značaj ovog nalaza je pre svega u činjenici da se ove strukture mogu potencijalno formirati i na koži nakon aplikacije uzoraka, a što može dalje da utiče na efikasnost isporuke aceklofenaka u/kroz kožu.

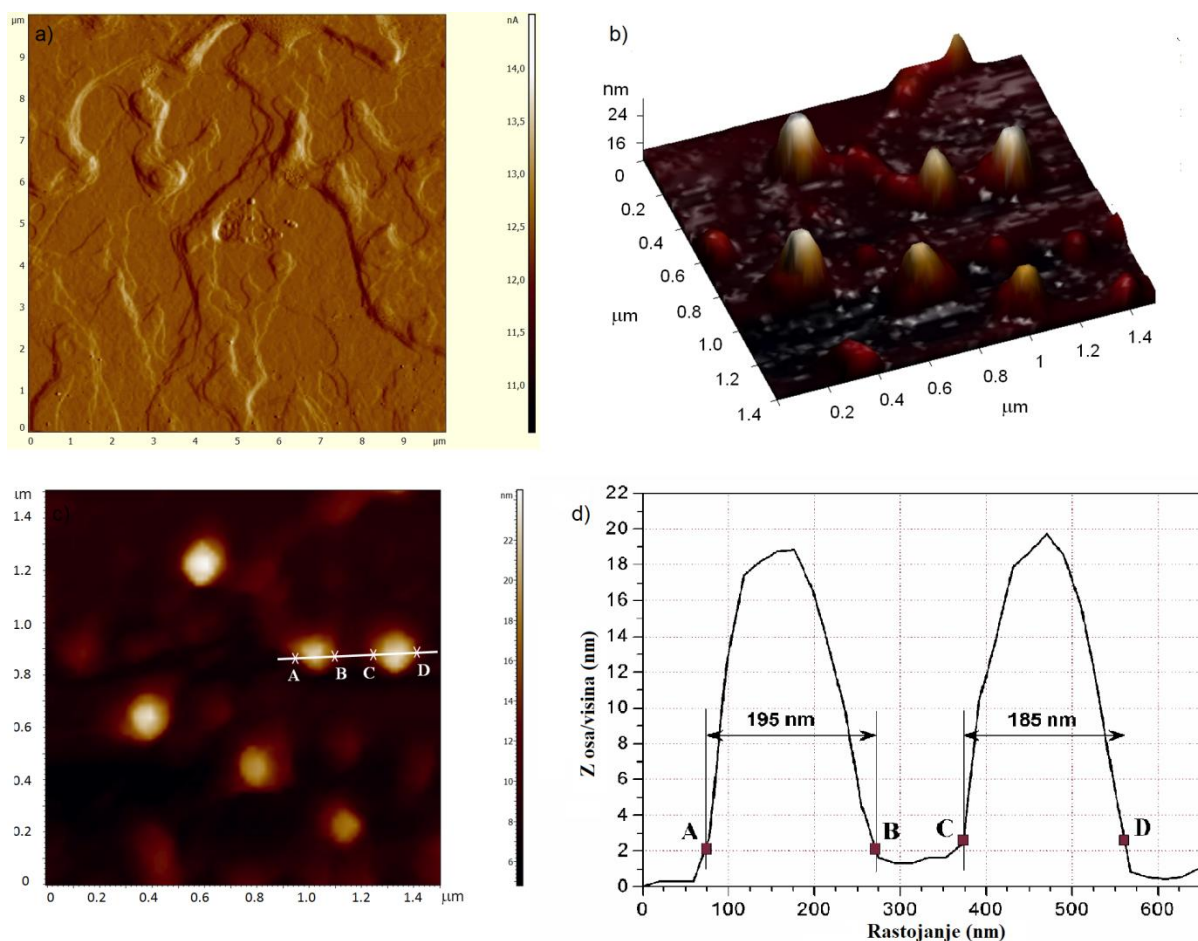
**Tabela 4.1.5.** LD dijametri, zeta potencijal (ZP), pH, električna provodljivost i viskozitet optimalnih nanoemulzija aceklofenaka i odgovarajućih placebo uzoraka nakon izrade nanoemulzija i nakon tri meseca čuvanja na sobnoj temperaturi ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) (srednja vrednost  $\pm$  SD,  $n = 3$ )

Uzorci	d (0.5) ( $\mu\text{m}$ )*	d(0.9) ( $\mu\text{m}$ )*	D[4.3] ( $\mu\text{m}$ )*	Dmax ( $\mu\text{m}$ )*	ZP (mV)	pH vrednost	Elektična provodljivost ( $\mu\text{S/cm}$ )	Viskozitet (mPa s)
<b>Jedan dan nakon izrade</b>								
L <sub>2</sub> P <sub>2</sub>	0,184	0,249	0,188	0,32	-40,1 $\pm$ 1,8	4,98 $\pm$ 0	406,3 $\pm$ 4,0	2,60 $\pm$ 0,05
L <sub>2</sub> P <sub>2</sub> A	0,189	0,264	0,193	0,36	-40,7 $\pm$ 0,8	3,28 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	448,1 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	3,03 $\pm$ 0,18
L <sub>1</sub> S <sub>1</sub> P <sub>2</sub>	0,171	0,228	0,174	0,29	-43,7 $\pm$ 1,6	5,75 $\pm$ 0,02	278,7 $\pm$ 8,0	3,46 $\pm$ 0,11
L <sub>1</sub> S <sub>1</sub> P <sub>2</sub> A	0,187	0,273	0,192	0,36	-44,5 $\pm$ 0,8	3,82 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	311,3 $\pm$ 2,5 <sup>a</sup>	3,91 $\pm$ 0,25
L <sub>1,5</sub> S <sub>0,5</sub> P <sub>2</sub>	0,204	0,293	0,208	0,36	-39,3 $\pm$ 0,5	5,43 $\pm$ 0,05	342,3 $\pm$ 1,5	2,89 $\pm$ 0,03
L <sub>1,5</sub> S <sub>0,5</sub> P <sub>2</sub> A	0,197	0,283	0,201	0,36	-39,2 $\pm$ 1,5	3,44 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	374,7 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	3,60 $\pm$ 0,23
L <sub>1</sub> S <sub>2</sub> P <sub>1</sub>	0,232	0,318	0,236	0,42	-51,1 $\pm$ 0,8	5,96 $\pm$ 0,02	338,0 $\pm$ 1,0	3,71 $\pm$ 0,09
L <sub>1</sub> S <sub>2</sub> P <sub>1</sub> A	0,242	0,323	0,244	0,42	-43,2 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	4,19 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	363,0 $\pm$ 3,6 <sup>a</sup>	4,40 $\pm$ 0,12
<b>Nakon tri meseca čuvanja na sobnoj temperaturi</b>								
L <sub>2</sub> P <sub>2</sub>	0,189	0,257	0,193	0,33	-42,6 $\pm$ 0,7	4,51 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	442,3 $\pm$ 3,1 <sup>b</sup>	2,78 $\pm$ 0,15
L <sub>2</sub> P <sub>2</sub> A	0,222	0,295	0,229	0,36	-43,4 $\pm$ 2,2	3,04 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	481,0 $\pm$ 7,0 <sup>b</sup>	3,05 $\pm$ 0,22
L <sub>1</sub> S <sub>1</sub> P <sub>2</sub>	0,190	0,275	0,194	0,36	-47,7 $\pm$ 1,1	5,31 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	324,0 $\pm$ 2,6 <sup>b</sup>	3,37 $\pm$ 0,15
L <sub>1</sub> S <sub>1</sub> P <sub>2</sub> A	0,232	0,318	0,235	0,42	-44,2 $\pm$ 2,1	3,41 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	358,3 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>	3,88 $\pm$ 0,23
L <sub>1,5</sub> S <sub>0,5</sub> P <sub>2</sub>	0,218	0,305	0,221	0,42	-40,1 $\pm$ 0,8	5,28 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	362,3 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>	2,85 $\pm$ 0,07
L <sub>1,5</sub> S <sub>0,5</sub> P <sub>2</sub> A	0,218	0,310	0,219	0,42	-41,7 $\pm$ 1,5	3,22 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	408,0 $\pm$ 4,4 <sup>b</sup>	3,52 $\pm$ 0,18
L <sub>1</sub> S <sub>2</sub> P <sub>1</sub>	0,253	0,325	0,675	0,88	-46,2 $\pm$ 1,5	5,63 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	385,0 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>	3,82 $\pm$ 0,13
L <sub>1</sub> S <sub>2</sub> P <sub>1</sub> A	0,289	1,036	0,680	1,62	-27,9 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	3,65 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	520,2 $\pm$ 3,1 <sup>b</sup>	8,14 $\pm$ 0,52

\* Variranje vrednosti LD dijametara dobijenih iz tri uzastopna merenja je bilo manje od 2%, te nisu predstavljene SD.

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa odgovarajućom placebo formulacijom

<sup>b</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa vrednostima dobijenim jedan dan nakon izrade



**Slika 4.1.6.** AFM slike odabrane formulacije nanoemulzije aceklofenaka ( $L_{1,5}S_{0,5}P_2A$ ): (a) „signal greške“ snimljen na površini  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  uzorka sušenog u vakumu, bez razblaživanja, (b) 3D i (c) 2D topografija  $1,4 \times 1,4 \mu\text{m}^2$  površine razblaženog uzorka, (d) „profili visine“ dve reprezentativne nanoemulzione kapi.

Sa druge strane, kako bi se dobile slike individualnih nanokapi, tokom pripreme uzoraka, bilo je neophodno primeniti veće razblaženje (1:500, v/v) i specifičnu tehniku pripreme (uklanjanje vodene faze filter papirom). Trodimenzionalne (3D) i dvodimenzionalne (2D) slike topografije odabrane formulacije nanoemulzije sa aceklofenakom ( $L_{1,5}S_{0,5}P_2A$ ) snimljene na površini  $1,4 \times 1,4 \mu\text{m}^2$ , kao i profili visine dve reprezentativne nanokapi predstavljeni su na slici 4.1.6. Dobijene AFM mikrografije jasno ukazuju na homogenu distribuciju sfernih nanokapi sa srednjim dijametrom približno 180–200 nm, što je u skladu sa rezultatima dobijenim primenom DLS i LD tehnika. Takođe, AFM analiza je potvrdila odsustvo većih kapi, agregata i kristala nerastvornog aceklofenaka.

Imajući na umu da je površinsko naelektrisanje jedan od ključnih faktora u obezbeđivanju 1) zadovoljavajuće stabilnosti nanoemulzija tokom čuvanja, kao i 2) efikasne isporuke leka u/kroz kožu (Klang i sar., 2015), sprovedeno je merenje zeta potencijala svih odabranih optimalnih formulacija nanoemulzija, kao i odgovarajućih placebo uzoraka. Međutim, s obzirom da zeta potencijal, i posledično, stabilnost nanoemulzionih sistema, u značajnom stepenu zavise od pH vrednosti (usled pH zavisne jonizacije određenih fosfolipida) (Benita i Levy, 1993), oba navedena parametra je neophodno istovremeno posmatrati. Kao što se može videti u tabeli 4.1.5, zeta potencijal ispitivanih uzoraka je bio u opsegu – 39 do –52mV, što ukazuje na relativno veliko površinsko naelektrisanje i posledično, zadovoljavajuću fizičko-hemijsku stabilnost. U slučaju optimalnih nanoemulzija koje su sadržale maksimalni ispitivani sadržaj SP (2%) u smeši upotrebljenoj za stabilizaciju, dodatak aceklofenaka nije uticao na površinsko naelektrisanje nanokapi, uprkos uočenih niskih pH vrednosti ovih uzoraka (tabela 4.1.5).

Suprotno, efekat inkorporiranja aceklofenaka u nanoemulziju sa maksimalnim ispitivanim sadržajem SS (2%) je bio mnogo izraženiji, odnosno, rezultovao je značajnim smanjenjem vrednosti negativnog zeta potencijala ( $p < 0,05$ ) u poređenju sa odgovarajućim placebo uzorkom. Dodatno, treba primetiti da je zeta potencijal svih nanoemulzija (placebo i aktivnih), koje su sadržale 2% SP bio manji od zeta potencijala uzoraka sa 2% SS u smeši (tabela 4.1.5.). Uočena razlika se može potencijalno objasniti sternim (zaštitnim) efektom hidrofilnih monoestara saharoze, koji su prisutni u značajno većem procentu u uzorcima stabilizovanim sa 2% SP u smeši. Prema specifikaciji proizvođača, SP P-1670 sadrži približno 80% monoestara, dok SS S-970 sadrži približno 48% monoestara. Stoga, može se pretpostaviti da se lanci masnih kiselina monoestara saharoze insertuju u fosfolipidni sloj na površini kapi, dok njihova saharozna grupa ostaje na površini kapi (bliže vodenoj fazi) i na taj način štiti negativno naelektrisanje koje potiče od fosfolipida. Sa druge strane, u uzorku sa većim sadržajem SS u odnosu na SP, di, tri i viši estri saharoze, kao lipofilniji (prisutni u većoj količini u SS), verovatno su dublje uronjeni u fosfolipidni sloj na površini kapi. Posledično, usled izostajanja zaštitnog efekta koji potiče od hidrofilnih monoestara saharoze, dolazi do izražaja uticaj niskih pH vrednosti na površinsko naelektrisanje (tabela 4.1.6). Naime, odgovarajuća placebo nanoemulzija je posedovala značajno veći zeta potencijal u odnosu na formulaciju sa aceklofenakom, usled viših pH vrednosti.

Merenje pH vrednosti potvrdilo je da su sve ispitivane formulacije u opsegu prihvatljivom za dermalnu aplikaciju (tabela 4.1.5). pH vrednosti placebo nanoemulzija bile su u opsegu 4,98–5,96, u zavisnosti od udela SS u smeši upotrebljenoj za stabilizaciju nanoemulzija (postepeno

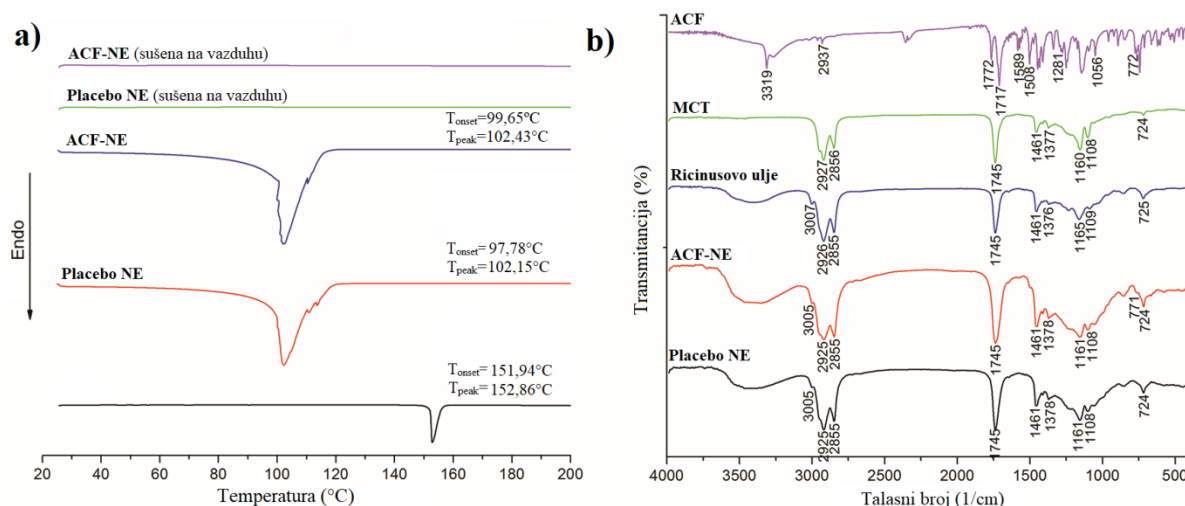
povećanje koncentracije SS u smeši, praćeno je postepenim povećanjem pH vrednosti). Dodatak aceklofenaka uslovio je značajan pad pH vrednosti svih ispitivanih formulacija (3,28–4,19), što potvrđuje pretpostavku da je aceklofenak, kao slaba kiselina (pKa 4,7) predominantno lokalizovan u ulje-voda međusloju, sa karboksilnom grupom orjentisanom ka vodenoj fazi. Dodatno, kao što se može videti u tabeli 4.1.5, vrednosti električne provodljivosti nanoemulzija aceklofenaka su bile značajno veće od odgovarajućih placebo. Uočene razlike su verovatno posledica značajno veće koncentracije slobodnih H<sup>+</sup> jona u nanoemulzijama aceklofenaka, koji potiču od jonizacije aceklofenaka na ulje-voda međupovršini. Takođe, kako je prethodno pokazano da je uvek određena (mala) količina lekovite supstance rastvorena u vodenoj fazi nanoemulzija (Kupetz i Bunjes, 2014), uočene više vrednosti električne provodljivosti i niže pH vrednosti nanoemulzija aceklofenaka u odnosu na odgovarajuće placebo uzorke, mogle bi se pripisati i maloj količini slobodnog aceklofenaka prisutnog u vodenoj fazi nanoemulzija.

Kako bi se u potpunosti okarakterisali odabrani sistemi i pratila stabilnost, dodatno su sprovedena i reološka merenja. Kao što je i bilo očekivano, vrednost viskoziteta se nije značajno menjala u čitavom rasponu brzine smicanja, što ukazuje na Njutnovski tip tečenja. Takođe, nisu uočene značajne razlike u viskozitetu odabranih optimalnih nanoemulzija aceklofenaka u odnosu na odgovarajuće placebo uzorke (tabela 4.1.5), i kretale su se u opsegu 2,6 – 4,4 mPas, što ukazuje na mogućnost primene razvijenih nanoemulzija u obliku spreja. Iako je dobro poznato da odabrani saharozni estri mogu da povećaju viskozitet sistema, uočen nizak viskozitet ukazuje na zanemarljivu ulogu saharoznih estara u viskozitetu ispitivanih nanoemulzija. Dobijeni rezultati nisu iznenađujući, jer je pokazano da reološke karakteristike sistema na bazi saharoznih estara zavise od različitih faktora kao što su temperatura, koncentracija, prisustvo kosurfaktanata ili ulja, kao i način pripreme uzoraka (posebno način mešanja masne i vodene faze) (Szűts i sar., 2010).

#### **4.1.4 Lek–nosač interakcije**

Kako bi se dobio detaljan uvid u efekat inkorporiranja aceklofenaka na strukturalna svojstva nanoemulzija, kao i u eventualno prisutne interakcije aceklofenaka sa ostalim komponentama formulacija, sprovedena je termalna analiza ispitivanih uzoraka, primenom DSC tehnike (Savić, 2017). Iako nije dizajnirana za procenu stanja leka u nanonosau (ograničena osetljivost), DSC tehnika se vrlo često koristi za detekciju eventualno prisutnih kristala nerastvornog leka. Naime, smatra se da je pojava endotermne tranzicije vodene disperzije

siguran indikator prisustva leka u kristalnom stanju (Bunjes i Unruh, 2007). Posledično, DSC termogrami čistog aceklofenaka, odabranih optimalnih nanoemulzija aceklofenaka i odgovarajućih placebo (pre i nakon sušenja na vazduhu), predstavljeni su na slici 4.1.7.



**Slika 4.1.7.** (a) DSC termogrami čistog aceklofenaka (ACF), odabrane nanoemulzije aceklofenaka ( $L_{1,5}S_{0,5}P_2A$  – ACF-NE) i odgovarajućeg placebo (placebo-NE) snimljeni pre i nakon sušenja na vazduhu, (b) FTIR spektri čistog aceklofenaka, triglicerida srednje dužine lanca (MCT), ricinusovog ulja, odabrane formulacije nanoemulzija sa ( $L_{1,5}S_{0,5}P_2A$  – ACF-NE) i bez ( $L_{1,5}S_{0,5}P_2$  – placebo NE) aceklofenaka.

DSC termogram čistog aceklofenaka pokazuje oštar, endotermni pik na 152,86°C, što odgovara temperaturi topljenja aceklofenaka u kristalnom obliku. Na DSC termogramima nativnih nanoemulzija aceklofenaka i odgovarajućih placebo može se uočiti širok endotermni pik na približno 100°C, koji potiče od isparavanja vode. Međutim, treba imati na umu da prisustvo velikog pika od vode u DSC termogramima može da maskira druge termalne promene u uzorku, te se odsustvo pika koji potiče od topljenja aceklofenaka ne može uzeti kao sigurni dokaz za odsustvo kristala leka (Bunjes i Unruh, 2007, Savić, 2017). Otuda, u slučaju lekovitih supstanci koje se tope na temperaturi iznad 100°C (kao što je aceklofenak), kako bi se izbegao negativan uticaj isparavanja vode tokom zagrevanja, smatra se da je sušenje uzoraka neposredno pre snimanja DSC termograma jedina alternativa. Imajući na umu da postupak sušenja značajno može da utiče na karakteristike sistema (kristali leka se mogu formirati tokom sušenja, posebno sušenja smrzavanjem) (Bunjes i Unruh, 2007), ispitivani uzorci nanoemulzija su sušeni na vazduhu tokom 24h na sobnoj temperaturi. Dodatno, pored eliminacije negativnog uticaja isparavanja vode na dobijene rezultate, cilj

sušenja na vazduhu je bio i dobijanje određenog uvida u ponašanje razvijenih uzoraka tokom aplikacije na koži. Interesantno, nisu uočene termalne tranzicije na dobijenim DSC termogramima (slika 4.1.7). Nezavisno od tehnike pripreme uzoraka za DSC analizu, pik karakterističan za topljenje aceklofenaka nije detektovan na termogramu nanoemulzija aceklofenaka, što ukazuje da je aceklofenak verovatno molekularno dispergovan, odnosno, rastvoren u uljanoj fazi nanoemulzija.

Kako bi se upotpunili nalazi dobijeni primenom DSC metode, i dobio detaljniji uvid u eventualno prisutne hemijske interakcije aceklofenaka sa drugim komponentama nanoemulzija, primenjena je FTIR spektroskopija. FTIR spektri čistog aceklofenaka, MCT, ricinusovog ulja, kao i odabrane formulacije nanoemulzija, sa i bez aceklofenaka, predstavljeni su na slici 4.1.7. Na FTIR spektru aceklofenaka uočavaju se sledeći karakteristični pikovi na:  $3319\text{ cm}^{-1}$  (vibracije ljuľljanja sekundarne N–H veze),  $3028\text{ cm}^{-1}$  (vibracije istezanja aromatićne C–H veze),  $2937\text{ cm}^{-1}$  (vibracije istezanja alifatićne C–H veze),  $1772\text{ cm}^{-1}$  (vibracije istezanja C=O veze karboksilne grupe),  $1717\text{ cm}^{-1}$  (vibracije istezanja C=O veze),  $1281\text{ cm}^{-1}$  (vibracije O–H savijanja u ravni),  $1589\text{ cm}^{-1}$ ,  $1508\text{ cm}^{-1}$ ,  $1056\text{ cm}^{-1}$ ,  $585\text{ cm}^{-1}$  (vibracije C–C–C savijanja u ravni), i  $772\text{ cm}^{-1}$  (vibracije istezanja C–Cl) (Jana i sar., 2014; Suresh i sar., 2014; Todosijević, 2017). U spektru nanoemulzija, karakteristićne FTIR vibracione veze na  $3005\text{ cm}^{-1}$  (C=C istezanje),  $2925\text{ cm}^{-1}$  i  $2855\text{ cm}^{-1}$  (asimetrićno i simetrićno istezanje C–H veza u metil i metilenskim grupama),  $1745\text{ cm}^{-1}$  (C=O istezanje),  $1461\text{ cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub> savijanje),  $1378\text{ cm}^{-1}$  (CH<sub>3</sub> simetrićno savijanje),  $1161\text{ cm}^{-1}$  (istezanje C–O veze estarske grupe),  $1108\text{ cm}^{-1}$  (C–O–C istezanje),  $724\text{ cm}^{-1}$  (ljuľljanje CH<sub>2</sub> lanca van ravni), prevashodno potiću od MCT i ricinusovog ulja. Kao što se mođe videti na slici 4.1.7, karakteristićne vibracione trake uočene na FTIR spektru placebo nanoemulzija, pojavljuju se na skoro potpuno identićnim talasnim dućinama u spektru nanoemulzija sa aceklofenakom. Dodatno, u FTIR spektru nanoemulzije sa aceklofenakom, većina karakteristićnih pikova aceklofenaka je preklapljena pikovima MCT i ricinusovog ulja, izuzev slabog pika na  $771\text{ cm}^{-1}$ , koji se mođe pripisati istezanju C–Cl veze. Takođe, nije uočena pojava novih ili pomeranje postojećih pikova, što bi potencijalno moglo da ukađe na degradaciju leka ili formiranje novih veza. Stoga, jasno je da rezultati dobijeni FTIR spektroskopijom potvrđuju odsustvo znaćajnih hemijskih interakcija aceklofenaka i ekscipijenasa u odabranim, optimalnim nanoemulzijama.



#### 4.1.5 Preliminarna studija stabilnosti

Stabilnost nanoemulzija zavisi od brojnih faktora kao što su sastav formulacije (vrsta i koncentracija ulja i emulgatora), primenjeni procesni parametri (temperatura, pritisak, broj ciklusa homogenizacije), karakteristike lekovite supstance (posebno značajno u slučaju slabo kiselih i nestabilnih lekova kakav je aceklofenak) kao i uslovi čuvanja (temperatura, svetlost, dostupnost kiseoniku) (Klang i Valenta, 2011; Savić, 2017). U cilju definisanja optimalnih formulacija nanoemulzija kao obećavajućih nosača za (trans)dermalnu isporuku aceklofenaka, formulacije odabrane na osnovu rezultata kombinovanog smeša-proces eksperimentalnog dizajna podvrgnute su preliminarnoj studiji stabilnosti praćenjem promena vrednosti odgovarajućih fizičko-hemijskih parametara tokom tri meseca čuvanja na  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Generalno, potencijalne promene u strukturi razvijenih nanoemulzija usled *Ostwald*-ovog sazrevanja, koalescencije i/ili separacije faza pod dejstvom gravitacije manifestuju se promenom veličine i/ili distribucije kapi po veličini, pojavom *creaming*-a ili separacije faza (McClements, 2012).

Stoga, smatra se da jednostavna procena organoleptičkog izgleda nanoemulzija može da da određeni uvid u stabilnost nanoemulzija (Klang i Valenta, 2011). Nakon tri meseca čuvanja, sve nanoemulzije odabrane primenom eksperimentalnog dizajna zadržale su svoje inicijalne karakteristike – bile su tečne, mlečno-bele boje, sa plavičastim odsjajem i nisu uočeni znaci razdvajanja faza tokom vizuelne inspekcije. DSC termogrami dobijeni analizom uzoraka nakon tri meseca čuvanja u potpunosti su bili identični onim snimljenim neposredno nakon izrade nanoemulzija (slika 4.1.7), odnosno, nije detektovan pik koji bi se mogao pripisati temperaturi topljenja aceklofenaka u kristalnom obliku. S obzirom na ograničenu osetljivost DSC metode, dodatno je sprovedena analiza ispitivanih uzoraka primenom polarizacione mikroskopije, pri čemu nisu uočeni kristali nerastvornog aceklofenaka, što potvrđuje odsustvo kristalizacije u periodu od tri meseca.

Veličina kapi placebo i nanoemulzija aceklofenaka koje su sadržale 2% SP u smeši upotrebljenoj za stabilizaciju nije se značajno promenila tokom čuvanja (tabela 4.1.6). Dmax vrednosti dobijene primenom LD bile su manje od 420 nm (tabela 4.1.5), što ukazuje na odsustvo kapi u mikrometarskom opsegu. Takođe, vrednosti PI ovih formulacija ostale su  $\leq 0,15$ , što potvrđuje odsustvo značajne agregacije ili koalescencije u ovim sistema tokom tri meseca (tabela 4.1.5). Sa druge strane, u slučaju formulacije nanoemulzije aceklofenaka sa 2% SS u smeši upotrebljenoj za stabilizaciju, uočeno je statistički značajno povećanje veličine

kapi ( $p < 0,05$ ), kao i prisustvo kapi većih od 1  $\mu\text{m}$ . Dodatno, vrednost PI je takođe značajno promenjena, što ukazuje na promenjenu stabilnost ove formulacije tokom čuvanja.

**Tabela 4.1.6.** Veličina kapi i polidisperzni indeks (PI) odabranih, optimalnih nanoemulzija aceklofenaka, kao i odgovarajućih placebo uzoraka nakon tri meseca čuvanja na  $25 \pm 2^\circ\text{C}$

Formulacija	Veličina kapi (nm)	PI
L <sub>2</sub> P <sub>2</sub>	185,6±3,1	0,118±0,025
L <sub>2</sub> P <sub>2</sub> A	183,1±1,2	0,109±0,026
L <sub>1</sub> S <sub>1</sub> P <sub>2</sub>	187,4±1,5	0,151±0,020
L <sub>1</sub> S <sub>1</sub> P <sub>2</sub> A	184,7±1,9	0,138±0,010
L <sub>1,5</sub> S <sub>0,5</sub> P <sub>2</sub>	192,9±2,1	0,095±0,018
L <sub>1,5</sub> S <sub>0,5</sub> P <sub>2</sub> A	185,9±1,9	0,123±0,014
L <sub>1</sub> S <sub>2</sub> P <sub>1</sub>	196,7±2,9	0,147±0,036
L <sub>1</sub> S <sub>2</sub> P <sub>1</sub> A	251,5±4,1 <sup>a</sup>	0,204±0,028 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa vrednostima dobijenim nakon izrade (tabela 4.1.2)

Usled relativno niske pH vrednosti razvijenih nanoemulzija, bilo je očekivano da će se zeta potencijal svih ispitivanih nanoemulzija aceklofenaka smanjiti tokom čuvanja, kao posledica smanjene jonizacije određenih funkcionalnih grupa fosfolipida na površini kapi (Zimmermann i Müller, 2001). Međutim, opisani efekat uočen je samo u slučaju L<sub>1</sub>S<sub>2</sub>P<sub>1</sub>A formulacije (tabela 4.1.5), verovatno usled odsustva sternog stabilišućeg efekta hidrofилnih saharoznih estara. Suprotno, tokom tri meseca čuvanja, došlo je do blagog povećanja ZP svih ostalih formulacija (bez statističke značajnosti), verovatno kao posledica hidrolitičke i/ili oksidativne degradacije ulja i fosfolipida (Baspinar i sar., 2010; Klang i Valenta, 2011). U isto vreme, detektovan je pad pH vrednosti svih ispitivanih formulacija, što potvrđuje prethodnu pretpostavku. Uočene promene ukazuju na potrebu za promenom antioksidansa i/ili uslova čuvanja.

Interesantno, vrednost električne provodljivosti svih ispitivanih formulacija nanoemulzija se značajno ( $p < 0,05$ ) povećala tokom tri meseca čuvanja na sobnoj temperaturi (tabela 4.1.5). Međutim, promena ovog parametra, posmatrana nezavisno od ostalih parametara, ne može biti siguran indikator nestabilnosti nanoemulzija, s obzirom da nije uočena korelacija između povećanja vrednosti električne provodljivosti i nestabilnosti emulzionih sistema (Bernardi i sar., 2011). Imajući na umu da su flokulacija i koalescencija uljanih kapi uobičajeno praćene porastom viskoziteta (Hippalgaonkar i sar., 2010), reološke studije su sprovedene kako bi se dobio dodatni uvid u stabilnost ispitivanih nanoemulzija. Viskozitet svih formulacija ostao je

u opsegu 2,8–4,2 mPas, sa izuzetkom L<sub>1</sub>S<sub>2</sub>P<sub>1</sub>A (8,14 mPas) formulacije, koja je takođe pokazala značajno povećanje vrednosti ovog parametra (u skladu sa uočenim povećanjem veličine kapi).

Konačno, pored analize opisanih fizičko-hemijskih parametara samog nanoemulzionog nosača, tokom procene stabilnosti, neophodno je proceniti i stabilnost same lekovite supstance u nosaču, posebno u slučaju relativno nestabilnih lekovitih supstanci, kao što je aceklofenak. Imajući na umu da aceklofenak podleže značajnoj hidrolitičkoj degradaciji u kiseloj, alkalnoj i neutralnoj sredini, kao i pri izlaganju svetlosti (u obliku rastvora) do diklofenaka, kao glavnog degradacionog proizvoda (Bhinge i sar., 2008), praćen je sadržaj aceklofenaka i diklofenaka u razvijenim nanoemulzijama tokom tri meseca čuvanja na  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Prosečni sadržaj aceklofenaka u ispitivanim nanoemulzijama nakon tri meseca čuvanja bio je oko 97% (sadržaj diklofenaka bio je manji od 3%), što potvrđuje da se inkorporiranjem lekovitih supstanci osetljivih na hidrolizu u uljano jezgro i/ili međupovršinski fosfolipidni sloj može očuvati hemijska stabilnost (Baspinar i sar., 2010; Hippalgaonkar i sar., 2010).

U zaključku, iako je nanoemulzija izrađena sa 2% SS u smeši inicijalno posedovala željenu veličinu kapi, nakon tri meseca došlo je od značajnih promena u vrednostima posmatranih parametara, verovatno kao posledica redukcije naelektrisanja na površini u kiseloj sredini, smanjenja elektrostatičkih odbojnih sila između kapi, i posledično njihove koalescencije. Sa druge strane, uprkos malim pH vrednostima, nepromenjena veličina kapi i zeta potencijal nanoemulzija sa 2% SP u smeši ukazuju na obećavajuću dugoročnu fizičko-hemijsku stabilnost. Ovaj fenomen se može objasniti većim sadržajem hidrofilnog surfaktanta u smeši upotrebljenoj za stabilizaciju (HLB vrednost SP~ 16) i njegovoj sposobnosti da štiti negativno naelektrisanje na površini kapi. Posledično, nanoemulzija aceklofenaka sa 2% SS u smeši isključena je iz daljih ispitivanja. Ostale formulacije odabrane na osnovu rezultata eksperimentalnog dizajna podvrgnute su detaljnoj proceni dugoročne fizičko-hemijske stabilnosti (1 godina), pri različitim uslovima čuvanja (sobna temperatura  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  i frižider  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Dodatno, u cilju poređenja, paralelno sa nanoemulzijama kostabilizovanim saharoznim estrima, sveobuhvatno su okarakterisane placebo (L<sub>2</sub>P80<sub>2</sub>) i nanoemulzije aceklofenaka (L<sub>2</sub>P80<sub>2</sub>A) stabilizovane smešom lecitina i polisorbata 80 (kombinacija emulgatora najčešće korišćena u literaturi za izradu klasičnih nanoemulzija) (referentni uzorak).

#### **4.1.5.1 Preliminarna studija stabilnosti nanoemulzija izrađenih variranjem tipa vodene faze**

Kako se smatra da uočene relativno niske pH vrednosti razvijenih formulacija nisu pogodne za dugoročnu stabilnost, dodatno su izrađene nanoemulzije stabilizovane smešom lecitina iz jajeta (2%) i SP (2%) variranjem tipa vodene faze. Imajući na umu pH zavisnu rastvorljivost aceklofenaka, kao i njegovu pKa vrednost (4,7) (Raza i sar., 2014), jasno je da neutralne pH vrednosti – poželjne za postizanje optimalnog naelektrisanja na površini kapi, kao i za minimalnu hidrolizu fosfolipida, saharoznih estara i triglicerida ulja – mogu da indukuju jonizaciju aceklofenaka, posledično praćenu povećanom rastvorljivošću u vodenoj fazi nanoemulzija (Mughtar i sar., 1997). Stoga, u preliminarnoj studiji ispitan je uticaj tri tipa različitih vrsta vodene faze – fosfatni pufer pH 5,8, acetatni pufer pH 4,1 i ultračista voda – na fizičko-hemijske karakteristike i stabilnost placebo i nanoemulzija aceklofenaka, inicijalno, nakon izrade i nakon šest meseci čuvanja na sobnoj temperaturi i u frižideru (tabela 4.1.7).

Za razliku od nanoemulzija sa aceklofenakom, placebo nanoemulzije bilo je moguće izraditi samo sa ultračistom vodom kao vodenom fazom. Uočeno razdvajanje faza odmah nakon izrade placebo nanoemulzija sa fosfatnim ili acetatnim puferom, ukazalo je na potencijalno značajnu ulogu aceklofenaka u stabilizaciji ispitivanih nanoemulzija. Dalje, iako su sve ispitivane formulacije posedovale kapi nanoveličina neposredno nakon izrade, uočene su određene statistički značajne razlike u vrednostima ovog parametra među ispitivanim formulacijama. Najmanja veličina kapi (praćena najmanjom vrednošću PI) uočena je kod formulacije izrađene sa fosfatnim puferom (pH 5,8) kao vodenom fazom, a najveća kod formulacije sa acetatnim puferom (pH 4,1) (tabela 4.1.7). Vrednosti PI svih ispitivanih formulacija bile su značajno manje od 0,2 (tabela 4.1.7), što ukazuje na usku distribuciju kapi po veličini, i time potencijalno na dobru dugoročnu stabilnost i otpornost sistema na Ostwald-ovo sazrevanje (Klang i sar., 2010; Klang i Valenta, 2011). Zeta potencijal ispitivanih nanoemulzija je bio u opsegu od  $-34,5$  do  $-38,4$  mV, pri čemu je statistički značajno veća vrednost uočena kod formulacije sa fosfatnim puferom pH 5,8 u odnosu na preostale dve formulacije. Sumiranjem svih dobijenih rezultata može se zaključiti da je aceklofenak, zahvaljujući svojim amfifilnim osobinama, u značajnom stepenu, u jonizovanom obliku, lokalizovan na ulje-voda međupovršini (sa karboksilnom grupom orjentisanom ka vodenoj fazi nanoemulzija). Otuda, aceklofenak doprinosi smanjenju međupovršinskog napona između uljane i vodene faze, olakšava proces emulgovanja tokom homogenizacije, i dodatno doprinosi negativnom naelektrisanju na površini kapi (poboljšana stabilnost nanoemulzija).

Međutim, treba primetiti da uticaj aceklofenaka na praćene parametre direktno zavisi od pH vrednosti vodene faze (pri višim pH vrednostima (5,8), aceklofenak je u većem stepenu prisutan u jonizovanom obliku na međupovršini, što za posledicu ima najmanju vrednost veličine kapi i PI, kao i najveću apsolutnu vrednost zeta potencijala).

Interesantno, dodatak aceklofenaka uslovio je drastične promene pH vrednosti i električne provodljivosti formulacije izrađene sa fosfatnim puferom kao vodenom fazom (pH 5,8), što se ne može pripisati samo prisustvu H<sup>+</sup> jona koji potiču od jonizacije aceklofenaka u međusloju, već izvesnije, samom aceklofenaku, koji je u određenom procentu prisutan rastvoren u vodenoj fazi ove nanoemulzije. Kako određivanje tačnog udela aceklofenaka u vodenoj fazi nanoemulzija zahteva primenu sofisticirane opreme (npr. ultracentrifuga), potvrda navedene pretpostavke dobijena je indirektno određivanjem ulje-voda particionog koeficijenta aceklofenaka. Kao što je i bilo očekivano, vrednost particionog koeficijenta je direktno zavisila od tipa vodene faze. Najniži particioni koeficijent dobijen je primenom pufera pH 5,8 ( $1,26 \pm 0,01$ ), dok se vrednosti dobijene korišćenjem ultračiste vode ( $2,28 \pm 0,02$ ) i pufera pH 4,1 ( $2,47 \pm 0,02$ ) nisu značajno razlikovale. Otuda, može se zaključiti da je aceklofenak u većem stepenu prisutan u vodenoj fazi nanoemulzije izrađene primenom pufera pH 5,8 u odnosu na ostale ispitivane formulacije.

Nakon šest meseci čuvanja na sobnoj temperaturi, kod svih ispitivanih uzoraka mogli su se primetiti određeni znaci fizičko-hemijske nestabilnosti – u slučaju nanoemulzije izrađene sa ultračistom vodom kao vodenom fazom uočene su značajne promene vrednosti posmatranih parametara, dok je u slučaju nanoemulzija izrađenih primenom fosfatnog/acetatnog pufera uočeno razdvajanje faza, ireverzibilno pri mućkanju. Sa druge strane, čuvanje u frižideru usporilo je destabilizacione mehanizme u nanoemulzijama izrađenim primenom fosfatnog/acetatnog pufera, ali su ipak detektovane određene promene u vrednostima praćenih parametara koje ukazuju na narušenu fizičko-hemijsku stabilnost (tabela 4.1.7). Interesantno, čuvanjem u frižideru nanoemulzija izrađenih primenom ultračiste vode kao vodene faze, nisu uočene statistički značajne vrednosti posmatranih parametara, što ukazuje na zadovoljavajuću preliminarnu fizičko-hemijsku stabilnost ove formulacije tokom šest meseci čuvanja. Drugim rečima, na osnovu rezultata ove studije može se zaključiti da je ultračista voda, vodena faza izbora za izradu nanoemulzija aceklofenaka.

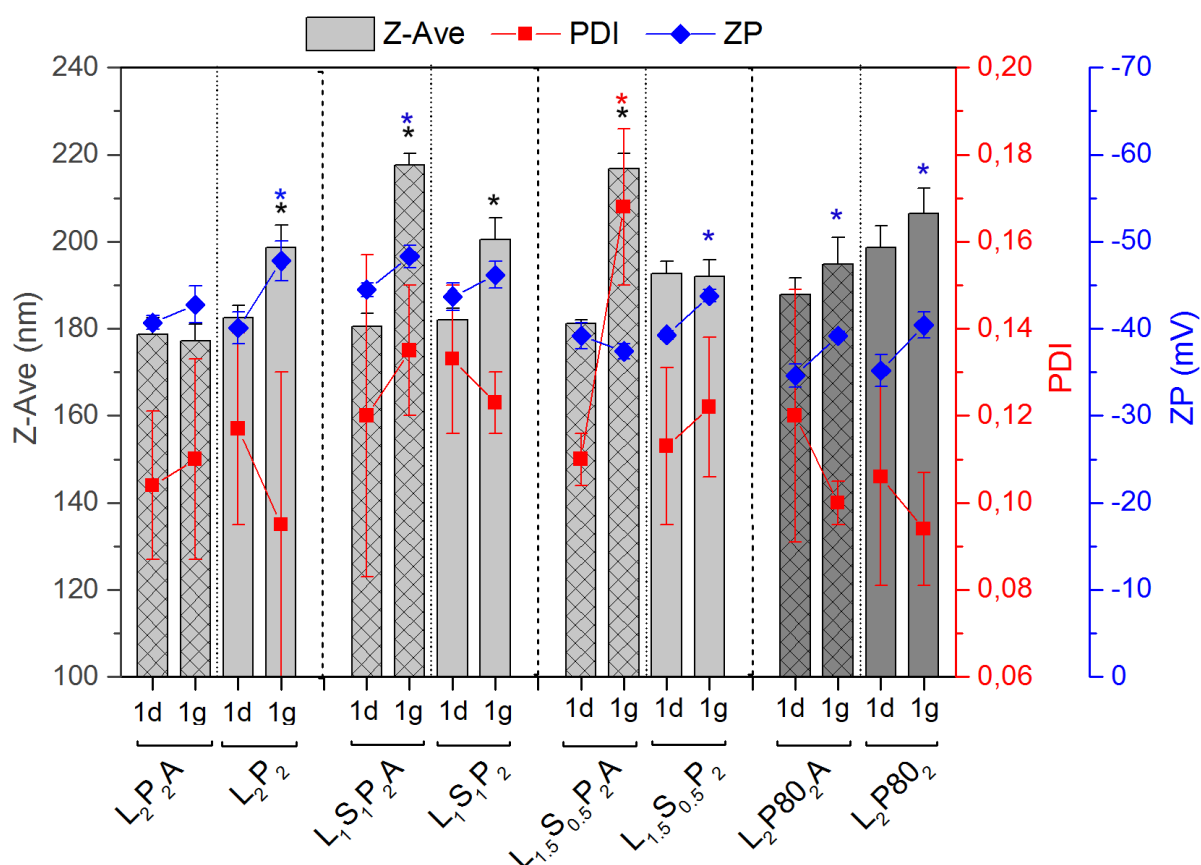
**Tabela 4.1.7.** Uticaj tipa vodene faze na fizičko-hemijske karakteristike i stabilnost nanoemulzija aceklofenaka baziranih na prirodnim surfaktantima. Merenja reprezentativnih parametara su sprovedena inicijalno (jedan dan nakon izrade) i nakon šest meseci čuvanja na sobnoj temperaturi ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) i u frižideru ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ )

Parametri	Tip vodene faze								
	Ultračista voda			Fosfatni pufer pH 5,8			Acetatni pufer pH 4,1		
	Nakon izrade	6 meseci ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ )	6 meseci ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ )	Nakon izrade	6 meseci ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ )	6 meseci ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ )	Nakon izrade	6 meseci ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ )	6 meseci ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ )
Z-ave (nm)*	173,6±0,9	265,5±0,7	176,3±1,8	147,6±4,4		273,3±2,7	170,6±1,2		223,5±0,6
PI*	0,085±0,049	0,081±0,028	0,048±0,043	0,039±0,034		0,150±0,011	0,105±0,017		0,136±0,019
ZP (mV)*	-34,6±1,6	-41,7±1,9	-40,9±0,5	-38,4±0,7	Razdvajanje faza	-37,7±2,2	-35,7±1,8	Razdvajanje faza	-37,3±1,47
pH	3,50±0,02	3,32±0,01	3,61±0,02	4,16±0,01		4,02±0,02	4,12±0,01		3,98±0,03
EP	0,449±0,001	0,382±0,002	0,472±0,003	3,57±0,02		3,36±0,03	0,942±0,004		868,67±1,15
(mS/cm)*	/	0,263±0,001	0,069±0,001	/		0,389±0,002	/		0,282±0,000
d (0.1) (µm)	/	0,459±0,001	0,139±0,000	/	0,803±0,001	/	0,535±0,000		
d (0.5) (µm)	/	0,762±0,002	0,270±0,001	/	1,710±0,019	/	0,810±0,000		

Z-ave – veličina kapi, PI – polidisperzni indeks, ZP – zeta potencijal, EP – električna provodljivost

#### 4.1.6 Dugoročna studija stabilnosti

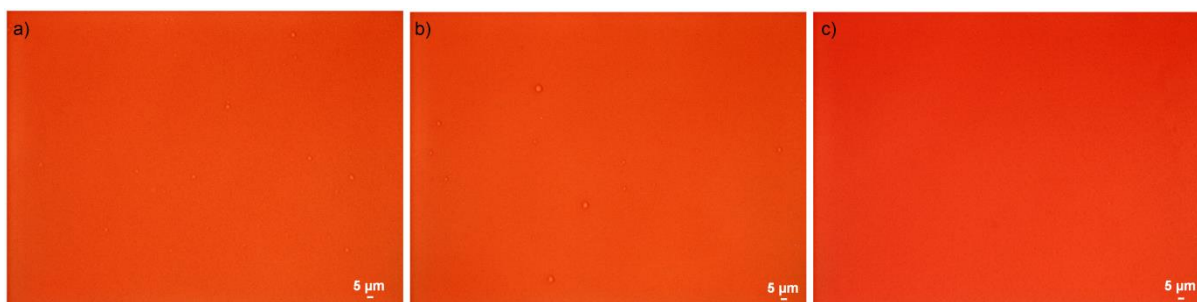
Dugoročna fizičko-hemijska stabilnost ispitivanih nanoemulzija aceklofenaka u velikoj meri je bila determinisana uslovima čuvanja i sastavom smeše surfaktanata upotrebljenih za stabilizaciju. Naime, nakon godinu dana čuvanja, vizuelnim pregledom uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi, u zavisnosti od upotrebljenih surfaktanata, uočena je separacija faza (ireverzibilna pri blagom mućkanju) ili očigledan porast veličine kapi, praćen gubitkom plavičaste nijanse i povećanim viskozitetom. Sa druge strane, nanoemulzije aceklofenaka čuvane u frižideru bile su tečne, homogene, mlečno-bele boje sa plavičastim odsjajem (kao nakon izrade), što ukazuje na zadovoljavajuću dugoročnu stabilnost. Rezultati dobijeni analizom veličine kapi, PI i zeta potencijala nanoemulzija aceklofenaka i odgovarajućih placebo čuvanih u frižideru tokom godinu dana predstavljeni su na slici 4.1.8.



**Slika 4.1.8.** Veličina kapi (Z-ave), polidisperzni indeks (PDI) i zeta potencijal (ZP) nanoemulzija na bazi saharoznih estara (L<sub>2</sub>P<sub>2</sub>A, L<sub>1,5</sub>S<sub>0,5</sub>P<sub>2</sub>A, L<sub>1</sub>S<sub>1</sub>P<sub>2</sub>A), polisorbata 80 (L<sub>2</sub>P<sub>80</sub><sub>2</sub>A) i odgovarajućih placebo nanoemulzija (L<sub>2</sub>P<sub>2</sub>, L<sub>1,5</sub>S<sub>0,5</sub>P<sub>2</sub>, L<sub>1</sub>S<sub>1</sub>P<sub>2</sub>, L<sub>2</sub>P<sub>80</sub><sub>2</sub>), jedan dan nakon izrade (1d) i nakon godinu dana (1g) čuvanja na 4 ± 1°C (srednja vrednost ± SD, n = 3); \* p < 0,05 u poređenju sa vrednošću odgovarajućeg parametra jedan dan nakon izrade

Veličina kapi i PI nanoemulzija aceklofenaka ( $L_2P_2A$ ,  $L_2P_8O_2A$ ) baziranih na hidrofilnim kosurfaktantima sa relativno visokom HLB vrednošću (SP i polisorbat 80) ostali su praktično nepromenjeni tokom godinu dana čuvanja na  $4 \pm 1^\circ C$ . Sa druge strane, dodatak SS, surfaktanta sa umerenom lipofilnošću ( $L_{1,5}S_{0,5}P_2A$ ,  $L_1S_1P_2A$ ), uslovio je reorganizaciju molekula na međupovršini, i posledično, statistički značajno povećanje veličine kapi ( $p < 0,05$ ) u poređenju sa inicijalnim vrednostima (slika 4.1.8). Slični rezultati dobijeni su primenom svetlosne mikroskopije nakon godinu dana čuvanja u frižideru (slika 4.1.9) –  $L_2P_2A$  i  $L_2P_8O_2A$  nanoemulzije su posedovale tek po koju kap sa veličinom u mikrometarskom opsegu, dok je u slučaju  $L_{1,5}S_{0,5}P_2A$  i  $L_1S_1P_2A$  formulacija zabeleženo prisustvo nešto većeg broja mikrometarskih kapi. Dodatno, nakon godinu dana čuvanja, sve ispitivane nanoemulzije aceklofenaka posedovale su visoke, negativne vrednosti zeta potencijala, u opsegu od  $-37$  do  $-48$  mV (slika 4.1.8), što ukazuje na visoko površinsko naelektrisanje koje je neophodno za uspešnu repulziju kapi i sprečavanje njihove koalescencije. Međutim, važno je naglasiti da se zeta potencijal svih ispitivanih formulacija nanoemulzija blago povećao tokom čuvanja. Uzimajući u obzir da je slična tendencija primećena i kod odgovarajućih placebo uzoraka, porast zeta potencijala se ne može pripisati prisustvu aceklofenaka, već prevashodno hidrolitičkoj/oksidativnoj degradaciji ulja i fosfolipida, i posledično formiranju slobodnih masnih kiselina (Baspinar i sar., 2010; Klang i Valenta, 2011). Kao rezultat, uočen je i značajan pad pH vrednosti (približno 0,5 pH jedinica), ali su sve dobijene vrednosti bile još uvek u opsegu prihvatljivom za preparate namenjene za primenu na koži (3,04, 3,08, 3,29, 3,09 za  $L_2P_2A$ ,  $L_{1,5}S_{0,5}P_2A$ ,  $L_1S_1P_2A$ ,  $L_2P_8O_2A$ , respektivno). Dodatno, prosečni sadržaj aceklofenaka bio je oko 90% za sve ispitivane nanoemulzije čuvane na  $4 \pm 1^\circ C$  (sadržaj diklofenaka  $\sim 10\%$ ), što ukazuje da inkorporiranje lekovite supstance u uljanu fazu i/ili međupovršinski fosfolipidni dvosloj, u kombinaciji sa odgovarajućim uslovima čuvanja, omogućava očuvanje hemijske stabilnosti tokom dužeg vremenskog perioda. Interesantno, prosečni sadržaj aceklofenaka i njegovog glavnog degradacionog proizvoda se značajno promenio u slučaju uzoraka čuvanih tokom godinu dana na sobnoj temperaturi (139.0–171.3 % i 17.1–34.2 %, respektivno). Međutim, analizirajući dobijene vrednosti, jasno je da se uočene varijacije u sadržaju aceklofenaka/diklofenaka ne mogu pripisati hemijskoj nestabilnosti aceklofenaka, već prevashodno, fizičkoj nestabilnosti (porastu veličine kapi) posmatranih nanoemulzija i metodološkim ograničenjima u određivanju sadržaja lekovite supstance.





**Slika 4.1.9.** Svetlosne mikrografije nanoemulzija aceklofenaka sa saharozna steatomom u smeši upotrebljenoj za stabilizaciju ( a)  $L_{1,5}S_{0,5}P_2A$  i b)  $L_1S_1P_2A$ ) i odgovarajućeg referentnog uzorka ( c)  $L_2P80_2A$ ), nakon godinu dana čuvanja u frižideru ( $4 \pm 1^\circ C$ ), pri uveličanju  $400\times$ .

Konačno, važno je naglasiti da su u slučaju placebo nanoemulzija, primećene minorne varijacije u odgovarajućim fizičko-hemijskim parametrima tokom godinu dana čuvanja na  $4 \pm 1^\circ C$ , a koje prate trendove uočene kod odgovarajućih nanoemulzija aceklofenaka (slika 4.1.8). Uzimajući u obzir sve rezultate dobijene tokom dugoročne studije stabilnosti, može se zaključiti da su, uprkos niskim pH vrednostima, nanoemulzije aceklofenaka stabilizovane smešom lecitina i SP posedovale zadovoljavajuću fizičko-hemijsku stabilnost, komparabilnu referentnom uzorku, tokom godinu dana čuvanja na  $4 \pm 1^\circ C$  (čak i duže, studija stabilnosti je još uvek u toku), verovatno zahvaljujući: 1) sternom zaštitnom efektu korišćenih nejonskih surfaktanata, koji zajedno sa lecitinom formiraju sloj zadovoljavajuće debljine i gustine na površini kapi, kao i 2) povećanom viskozitetu ovog sloja sa smanjenjem temperature čuvanja (Li i Lu, 2016). Sa druge strane, imajući na umu rezultate dobijene primenom svetlosne mikroskopije, kao i činjenicu da se DLS smatra veoma osetljivom metodom za detekciju nestabilnosti nanoemulzija (Müller i sar., 2012), uočen porast veličine kapi (više od 20 nm) nanoemulzija sa SS u smeši surfaktanta jasno ukazuje na kompromitovanu dugoročnu fizičko-hemijsku stabilnost.

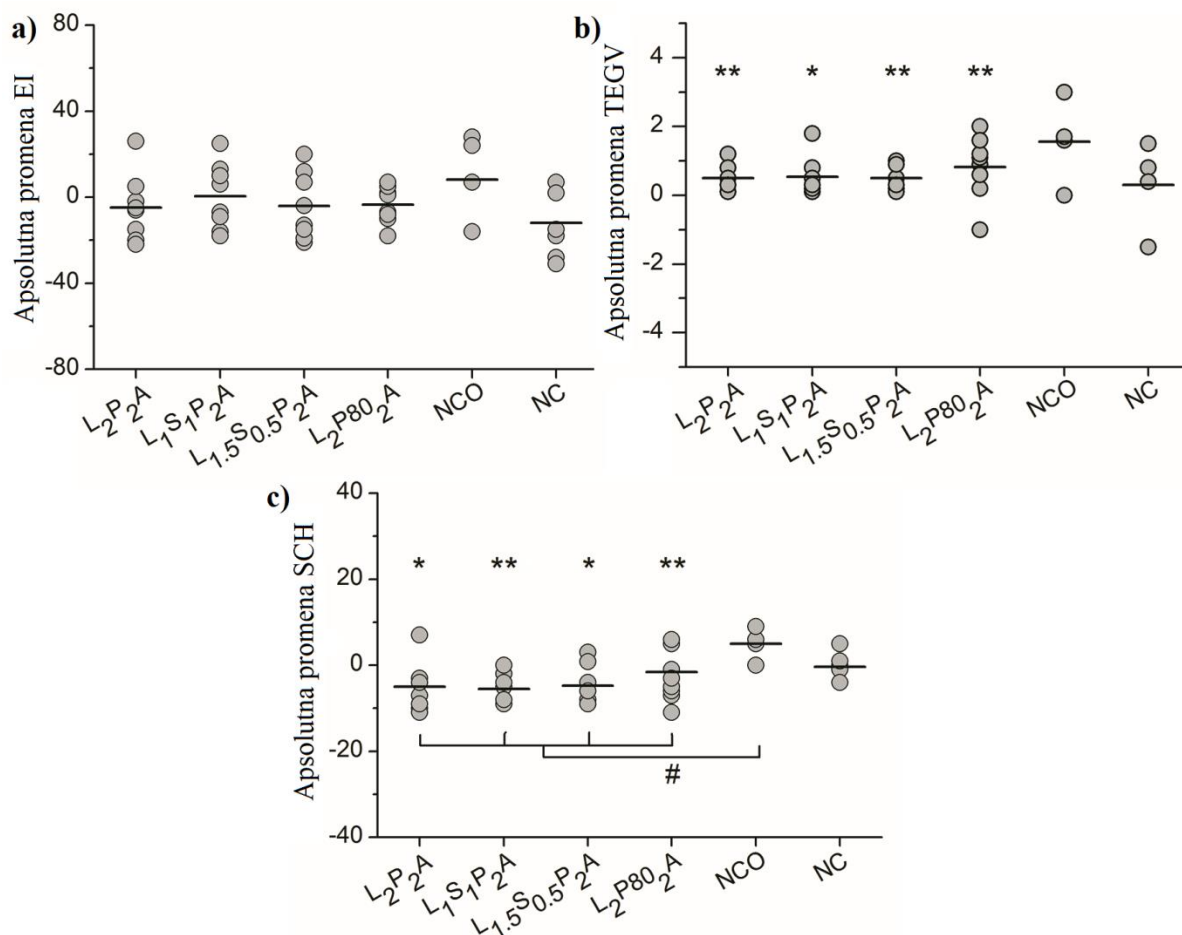
#### 4.1.7 In vivo procena iritacionog potencijala razvijenih nanoemulzija

Tokom razvoja novih preparata za primenu na koži, posebno izrađenih primenom relativno novih surfaktanata (kakvi su saharozni estri), neophodna je procena iritacionog potencijala, kao jednog od najčešćih neželjenih efekata topikalnih formulacija (Pantelić, 2013). Generalno, smatra se da saharozni estri pokazuju bolju podnošljivost od strane kože, odnosno značajno manji iritacioni potencijal u odnosu na tradicionalne, polietoksilovane surfaktante (Nava-Arzaluz i sar., 2015). Međutim, u literaturi nema podataka o efektu saharoznih estara

formulisanih u obliku nanoemulzija na in vivo performanse kože. Stoga, prva faza eksperimentalnog rada zaokružena je merenjem ključnih biofizičkih parametara kože nakon primene ispitivanih uzoraka nanoemulzija na kožu humanih dobrovoljaca, u cilju procene potencijalnog iritacionog potencijala, kao i detaljnijeg uvida u mehanizme interakcija sa kožom.

Takođe, ne treba zaboraviti da aceklofenak, kao i većina lekova iz grupe NSAIL, može da dovede do iritacije kože, usled prisustva karboksilne grupe u strukturi (Raza i sar., 2014). Rezultati određenog broja studija ukazuju da se primenom nanoemulzija može smanjiti iritacioni potencijal određenih lekovitih supstanci, zahvaljujući inkorporiranju u uljano jezgro ili umetanju u međusloj (između molekula surfaktanata) nanoemulzija, čime je smanjen direktni kontakt lekovite supstance sa površinom kože (Jumaa i sar., 1999; 2000). Stoga, cilj ovog ispitivanja, između ostalog, bio je i da se proceni sposobnost razvijenih nanoemulzija da maskiraju iritacioni potencijal aceklofenaka, kao model lekovite supstance. U tu svrhu, direktna procena iritacionog potencijala razvijenih nanoemulzija aceklofenaka na bazi saharoznih estara (sa 2% SP u smeši surfaktanata), kao i referentnog uzorka na bazi polisorbata 80, sprovedena je merenjem EI, nakon 24-časovne studije pod okluzijom. Dodatno, kako bi se dobio dublji uvid u efekte ispitivanih nanoemulzija na barijernu funkciju kože, sprovedeno je merenje SCH i TEGV.

Tri sata nakon uklanjanja okluzije, vizuelnim pregledom kože tretirane ispitivanim formulacijama nanoemulzija, nisu uočene neželjene reakcije na koži. Takođe, kao što je i bilo očekivano, uprkos prisustvu leka sa nepovoljnim iritacionim profilom nisu uočene statistički značajne promene u vrednostima EI u odnosu na bazalne vrednosti (slika 4.1.10). Takođe, nisu detektovane ni statistički značajne razlike u vrednostima promena ovog parametra između ispitivanih formulacija, što ukazuje na dobru podnošljivost na koži svih ispitivanih nanoemulzija.



**Slika 4.1.10.** Efekat ispitivanih nanoemulzija aceklofenaka na bazi saharoznih estara, kao i referentnog uzorka sa polisorbitom 80 kao koemulgatora na promenu vrednosti (a) eritema indeksa (EI), (b) transepidermalnog gubitka vode (TEGV) i (c) stepena hidratisanosti *stratum corneum*-a (SCH). Parametri su izraženi kao apsolutne promene vrednosti dobijenih 3h nakon uklanjanja okluzije u odnosu na bazalne (inicijalno izmerene) vrednosti za svaku ispitivanu nanoemulziju sa aceklofenakom, netretiranu kontrolu pod okluzijom (NCO) i netretiranu kontrolu bez okluzije (NC). \*  $p < 0,05$  u odnosu na bazalne vrednosti; \*\*  $p < 0,01$  u odnosu na bazalne vrednosti; # statistički značajna razlika između NCO i svih ispitivanih formulacija nanoemulzija (L<sub>2</sub>P<sub>2</sub>A ( $p < 0,01$ ), L<sub>1</sub>S<sub>1</sub>P<sub>2</sub>A ( $p < 0,001$ ), L<sub>1.5</sub>S<sub>0.5</sub>P<sub>2</sub>A ( $p < 0,01$ ), i L<sub>2</sub>P<sub>80</sub><sub>2</sub>A ( $p < 0,01$ )).

Analiziranjem vrednosti TEGV (slika 4.1.10), očigledno je da su sve ispitivane formulacije nanoemulzija dovele do statistički značajnog povećanja vrednosti ovog parametra u odnosu na bazalne vrednosti. Međutim, upoređenju sa netretiranim kontrolama, uočene promene nisu bile statistički značajne. Sa druge strane, interesantno, uočeno je statistički značajno smanjenje vrednosti SCH svih test-mesta tretiranih ispitivanim nanoemulzijama u odnosu na

bazalne vrednosti i NCO. Ovaj nalaz je prilično neočekivan, s obzirom da je dobro poznato da okluzija kože *per se*, dovodi do povećanja SCH i narušavanja barijerne funkcije kože (porast TEGV) (Savic i sar., 2009). Međutim, treba istaći da rezultati histološke analize kože tretirane različitim formulacijama nanoemulzija, sa druge strane, ukazuju da komponente nanoemulzija (ulje, surfaktatni) mogu da penetriraju u SC, narušavajući njegov integritet fluidizacijom i/ili ekstrakcijom intercelularnog lipidnog matriksa, što za posledicu ima dehidraciju SC i značajan gubitak vode (Clares i sar., 2014; Kong i sar., 2011). Stoga, uočeno smanjenje SCH udruženo sa blagim porastom TEGV delimično je u skladu sa navedenim tvrdnjama. Naime, iako su Clares i sar. (2014) pretpostavili da opisani efekat nanoemulzija može da dovede do iritacije i značajnog oštećenja kožne barijere, odsustvo statistički značajnih promena u vrednosti TEGV u odnosu na netretirane kontrole (NCO i NC) (zajedno sa odsustvom značajnih promena u vrednostima EI), predstavlja dokaz o blagoj prirodi ispitivanih nanoemulzionih sistema. Dodatno, iako je bilo očekivano da će nanoemulzije na bazi saharoznih estara prouzrokovati značajnije smanjenje SCH u odnosu na referentni uzorak, prevažodno usled sposobnosti građenja jačih vodoničnih veza hidroksilne grupe saharoznih estara sa molekulima vode, u poređenju sa vodoničnim vezama koje gradi atom kiseonika polietilenglikola u polisorbata 80 (Todosijević, 2017), opisani efekat je izostao, odnosno, nisu uočene značajne razlike u promenama vrednosti praćenih parametara između ispitivanih formulacija.

Uzimajući u obzir rezultate ove studije, može se zaključiti da razvijene nanoemulzije na bazi saharoznih estara imaju zadovoljavajući bezbednosni profil, komparabilan referentnoj nanoemulziji, izrađenoj primenom široko korišćenog emulgatora u farmaceutskoj industriji, kakav je polisorbit 80, uprkos prisustvu lekovite supstance (aceklofenaka) sa nepovoljnim iritacionim profilom.

## 4.2 Rezultati i diskusija druge faze eksperimentalnog rada

Uporedno sa intenzivnim istraživanjima na polju nanotehnologije i razvojem naprednih sistema koji treba da omoguće poboljšanu/unapređenu isporuku lekovitih supstanci u/kroz kožu do mesta delovanja, tokom poslednjih godina, kao rezultat sve većeg interesovanja za individualizacijom terapije, izrada lekova u apoteci dobija sve veći značaj. Svaki pacijent doživljava bol izazvan bolestima/povredama skeletno-mišićnog sistema na jedinstven način, što zahteva tretman prilagođen specifičnim potrebama svakog pacijenta (Branvold i Carvalho, 2014). Drugim rečima, brojni pacijenti čije potrebe ne mogu da budu zadovoljene industrijski proizvedenim preparatima dostupnim na tržištu zavise od znanja i veština farmaceuta da izradi lek prilagođen specifičnim uslovima/stanju bolesti (Minghetti i sar., 2014). Prema zahtevu lekara, NSAIL (sami ili u kombinaciji sa drugim lekovitim supstancama) obično se inkorporiraju u gotove, tzv. „*ready to use*“ podloge (npr. Lipoderm<sup>®</sup>, PCCA, SAD) ili podloge izrađene prema propisima domaćih ili stranih farmakopeja ili njihovih dodataka. Međutim, praksa je pokazala da trenutno dostupne podloge često ne pružaju željeni terapijski efekat inkorporiranog NSAIL, kao i da, u većini slučajeva, ne zadovoljavaju očekivanja pacijenta u pogledu željene teksture preparata, senzornih atributa i bezbednosnog profila (Branvold i Carvalho, 2014; Nornoo i sar., 2016; Pantelić, 2013). Otuda, javlja se potreba za uvođenjem novih podloga, a često, i za uključivanjem hemijskih penetracionih inženjera u sastav podloge kako bi se postigla optimalna dermalna raspoloživost i zadovoljile potrebe pacijenata.

Imajući na umu brojne nedostatke tradicionalnih nejonskih emulgatora koje se koriste za stabilizaciju konvencionalnih emulzionih podloga (npr. potencijal za iritaciju kože, odloženo strukturiranje sistema koje za posledicu može imati nekonzistentnu dermalnu raspoloživost lekovite supstance), kao i sve veći afinitet modernih pacijenata prema „zelenim preparatima“, neophodno je inoviranje sastava podloga uvođenjem emulgatora koji se označavaju kao „prijatelji kože i životne sredine“ (engl., *skin and environmental-friendly emulsifiers*). Kao rezultat, alkil poliglukozidni (APG) emulgator, cetearil glukozid i cetearil alkohol (US Drug Master File N° 18925), zahvaljujući povoljnom bezbednosnom profilu, prepoznat je kao obećavajući emulgator za formulaciju „*ready-to-use*“ podloga za primenu na koži, koje se mogu potencijalno izrađivati u industriji za potrebe izrade magistralnih lekova u apotekama (Pantelić, 2013; Savić i sar., 2005b; 2009). Međutim, da bi se neka podloga mogla koristiti u *ex tempore* izradi magistralnih lekova, pored zadovoljavajućeg bezbednosnog profila, treba da zadovolji i niz drugih preduslova, uključujući: jednostavnost formulacije, zadovoljavajuću

fizičku stabilnost, kompatibilnost sa velikim brojem lekovitih supstanci i odgovarajuću isporuku lekovitih supstanci u/kroz kožu (Pantelić, 2013)

Međutim, treba napomenuti da izrada lekova u apotekama nije pod stalnom rigidnom kontrolom, kao proizvodnja lekova u industrijskim uslovima. Naime, izrada magistralnih lekova u apotekama je u potpunosti različita u pogledu analize rizika u poređenju sa serijskom proizvodnjom u industrijskim uslovima. Kontrola kvaliteta lekova izrađenih u apoteci ne može se sprovoditi na isti način kao u industrijskim uslovima (Minghetti i sar., 2014). Kako bi se unapredila praksa izrade lekova u apotekama, i umanjila razlika u pogledu kvaliteta i bezbednosti lekova izrađenih u apotekama i industriji, Komitet ministara Saveta Evrope doneo je Rezoluciju CM/Res(2016)1 (engl., *Resolution CM/Res(2016)1 on quality and safety assurance requirements for medicinal products prepared in pharmacies for the special needs of patients*). Međutim, važno je napomenuti da je Rezolucija CM/Res(2016)1 opšteg karaktera, te pregled dostupne literature ukazuje na nedostatak smernica koje se odnose na razvoj „*ready to use*“ podloga koje bi se proizvodile u industriji, a namenjene su širokoj upotrebi u izradi magistralnih lekova.

Otuda, kako bi se procenila mogućnost prethodno razvijene podloge na bazi APG emulgatora (Pantelić, 2013) da zameni konvencionalno korišćene podloge u magistralnoj praksi (npr. nejonski hidrofilni krem) definisanog farmakopejskog kvaliteta, u odsustvu odgovarajućih regulatornih smernica, primenjen je pristup sličan onome koji je trenutno u fazi izrade za generičke polučvrste preparate za primenu na koži. Drugim rečima, sprovedena je uporedna procena (i) klinički relevantnih atributa kvaliteta koji mogu da ukažu na eventualno prisutne razlike u mikrostrukturi kao i (ii) njihovog uticaja na dermalnu raspoloživost aceklofenaka. Prilikom razvoja, proizvođači generičkih lekova se uobičajeno odlučuju za sastav formulacije koji je što sličniji odabranom referentnom leku. Međutim, u ovom slučaju, s obzirom da je jedan od ciljeva bio da se formuliše savremena, estetski privlačna podloga na bazi prirodnog surfaktanta, razlike u sastavu u odnosu na odabranu referentnu podlogu (nejonski hidrofilni krem) su bile neizbežne. Slično, proizvođač generičkog leka, zbog patente zaštite ili neadekvatnog kvaliteta, može da razvija preparat koji ne odgovara sastavu referentnog leka (Shah i sar., 2015). Dodatno, imajući na umu izuzetna barijerna svojstva kože, kao i niz izazovnih fizičko-hemijskih osobina lekovitih supstanci (naročito novih hemijskih entiteta) koji ograničavaju efikasnu isporuku u/kroz kožu, od posebnog značaja je bilo proceniti da li uključivanje jednostavnih hemijskih penetracionih inhensera/pojačivača penetracije (npr. izopropanol i glicerol) utiče na mikrostrukturu APG podloge i CQA, i posledično, na dermalnu raspoloživost aceklofenaka. U ovom slučaju, osnovna APG podloga se može

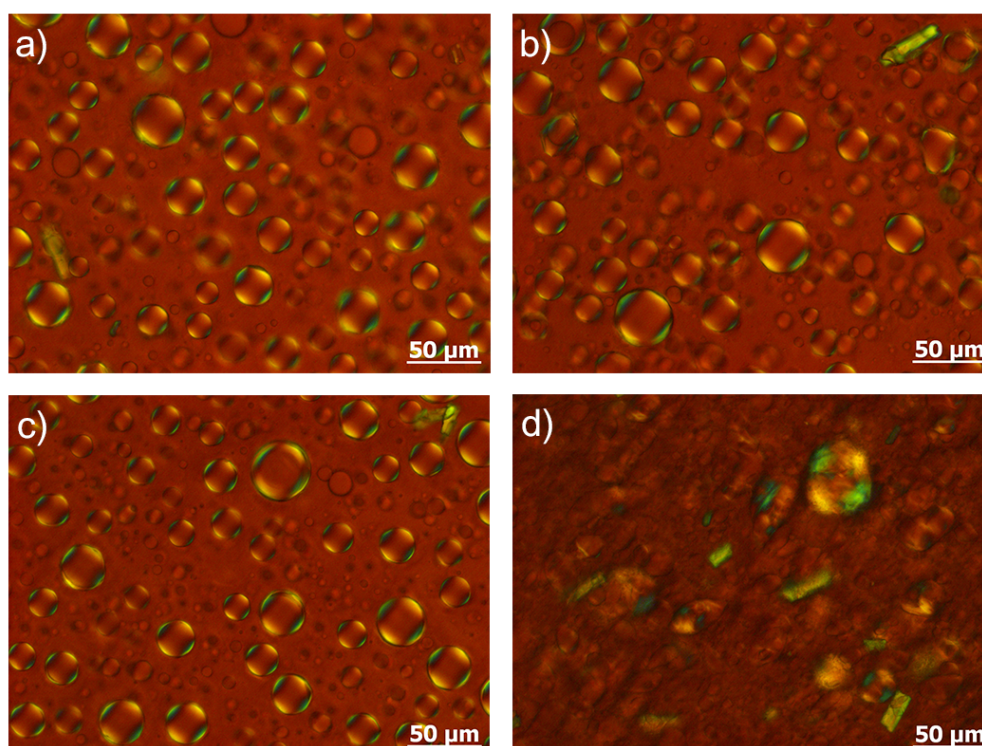
smatrati referentom u odnosu na podloge sa odgovarajućim korastvaračima. S obzirom da na tržištu Evropske unije i SAD nema preparata aceklofenaka za primenu na koži koji poseduju odobrenje za stavljanje u promet, izrada leka u apoteci (inkorporiranjem aceklofenaka u odgovarajuću podlogu), trenutno predstavlja jedino rešenje.

#### **4.2.1 Procena mikrostrukture primenom polarizacione mikroskopije i konfokalne Raman spektroskopije**

Specifična kompleksna priroda polučvrstih preparata za primenu na koži zahteva primenu više različitih tehnika, kako bi se dobio detaljan uvid u mikrostrukturu, razumeli mehanizmi odgovorni za njeno formiranje (npr. interakcije ekscipijenas) i obezbedila zadovoljavajuća kontrola kvaliteta (EMA, 2018). Generalno, prvi korak u utvrđivanju potencijalnih sličnosti/razlika između test i referentnog preparata, nakon procene organoleptičkog izgleda, konzistencije i homogenosti, je vizuelizacija mikrostrukture primenom različitih mikroskopskih tehnika (Chang i sar., 2013b).

Reprezentativne mikrografije, dobijene primenom polarizacione mikroskopije, prikazane na slici 4.2.1, ukazale su na značajne razlike u mikrostrukturi između uzoraka baziranih na APG emulgatoru i referentnog uzorka sa aceklofenakom kao model lekovitom supstancom. Naime, u svim APG uzorcima (slika 4.2.1), jasno se uočava prisustvo anizotropnih kapi mikrometarskih dimenzija, nasumično raspoređenih u kontinualnoj vodenoj fazi, zajedno sa ostacima gelske mreže, koja u vidu koncentričnih krugova okružuje veće kapi ili flokule manjih. Na osnovu prisustva opisanih struktura, može se pretpostaviti da je mehanizam stabilizacije uzoraka sa APG emulgatorom baziran na sinergističkom efektu: 1) lamelarne tečnokristalne faze, prisutne na rubovima uljanih kapi, i 2) lamelarne gel kristalne faze koja se prostire dalje ka kontinualnoj fazi (Pantelić, 2013; Savić i sar., 2005b). Takođe, treba primetiti da je raspodela veličine uljanih kapi slična u svim APG uzorcima, što ukazuje da variranje samo jedne komponente u sastavu formulacije (dodatak korastvarača, izopropanola ili glicerola, na račun smanjenja ukupnog sadržaja vode u preparatu) nije značajno uticalo na mikrostrukturu APG uzoraka u prisustvu aceklofenaka kao model lekovite supstance. Suprotno APG uzorcima, dispergovane uljane kapi se ne mogu jasno uočiti posmatranjem mikrostrukture referentnog uzorka pod mikroskopom (slika 4.2.1). Štaviše, struktura referentnog uzorka podseća na relativno gust matriks, koji se može pripisati prevažodno prisustvu lipofilne gel faze (potiče od cetostearil alkohola zastupljenog u priličnom velikom

procentu u sastavu formulacije), koja mehanički, čvrsto, imobilizuje dispergovanu uljanu fazu (Pantelić, 2013).

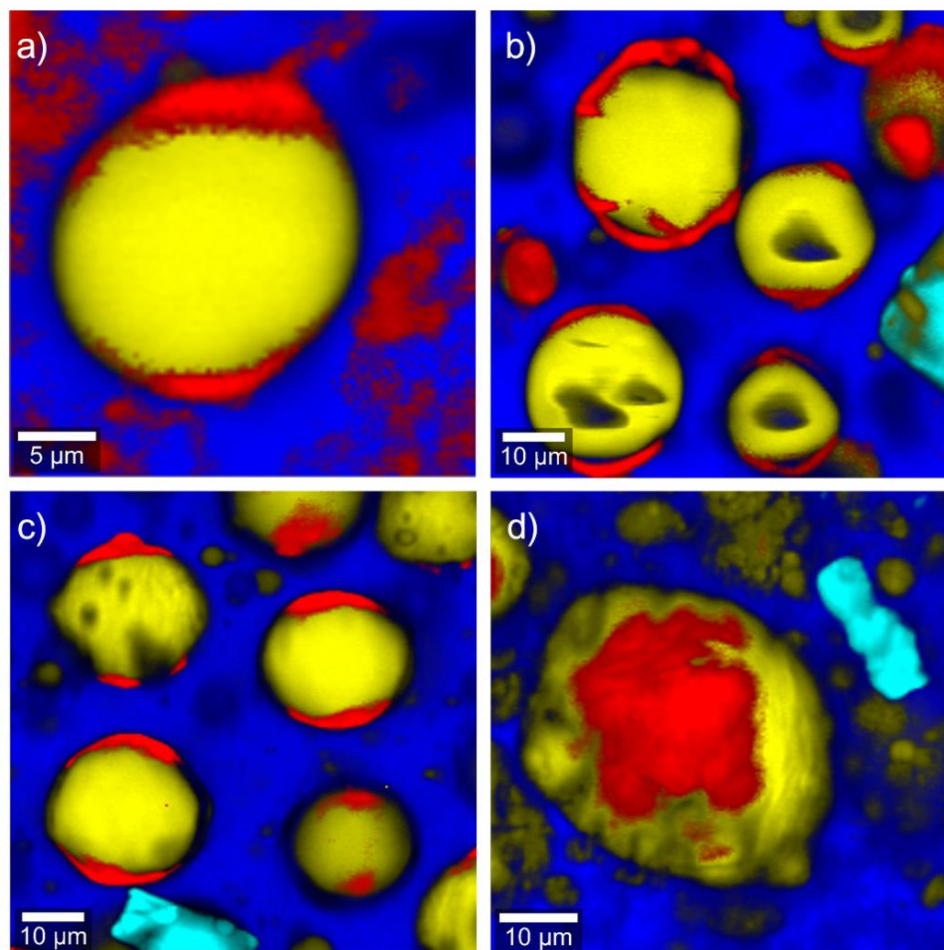


**Slika 4.2.1.** Reprezentativne polarizacione mikrografije ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema sa aceklofenakom kao model lekovitom supstancom, snimljene 7 dana nakon izrade: a) S-BA, b) S-IpaA, c) S-GlyA, d) R-A (uveličanje 400×).

Konačno, pravougaoni ili nepravilno oblikovani kristali nerastvornog aceklofenaka različite veličine mogu se uočiti u svim ispitivanim uzorcima, ali su značajno vidljiviji u referentnom uzorku (slika 4.2.1). Ispitivanje uniformnosti sadržaja aceklofenaka, uzorkovanjem delova sa vrha, sredine i dna kutijice, potvrdilo je da svi ispitivani uzorci ispunjavaju zahteve odgovarajuće monografije Američke farmakopeje (USP37-NF32, 2014a), a što dalje jasno ukazuje na potencijal APG podloga da rastvore inicijalno suspendovan aceklofenak u određenom procentu. Dodatno, važno je naglasiti da iako se rastvorljivost aceklofenaka značajno razlikovala između ispitivanih formulacija (videti ispod – deo 4.2.2), nije uočena značajna razlika u veličini kristala aceklofenaka tokom mikroskopske analize. Drugim rečima, veličina čestica aceklofenaka u ispitivanim uzorcima je određena prevashodno veličinom čestica polazne sirovine. Stoga, iako se veličina čestica lekovite supstance smatra CQA tokom razvoja generičkog leka (brzina rastvaranja zavisi direktno od veličine i morfoloških



karakteristika kristala) (Murthy, 2016), u našem slučaju, logično je pretpostaviti da će uticaj veličine čestica na in vivo performanse biti sličan za sve ispitivane formulacije, te veličina čestica nije identifikovana kao CQA.



**Slika 4.2.2.** Kodirane slike u boji (engl., *color coded images*) ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema aceklofenaka, dobijene primenom konfokalne Raman spektroskopije: a) S-BA (žuta: trigliceridi srednje dužine lanca, crvena: odabrani APG emulgator, plava: prečišćena voda), b) S-IpaA (žuta: trigliceridi srednje dužine lanca, crvena: odabrani APG emulgator, plava: smeša prečišćene vode i izopropanola, tirkizna: aceklofenak), c) S-GlyA (žuta: trigliceridi srednje dužine lanca, crvena: odabrani APG emulgator, plava: smeša prečišćene vode i glicerola, tirkizna: aceklofenak) i d) R-A (žuta: beli vazelin, crvena: cetostearil alkohol, plava: prečišćena voda, tirkizna: aceklofenak)

U slučaju multikomponentnih formulacija, kakvi su ispitivani polučvrsti emulzionih sistemi, pored osnovnih informacija o strukturnim karakteristikama koje se mogu dobiti primenom polarizacione mikroskopije, poznavanje prostorne distribucije lekovite supstance i

ekscipijenas je izuzetno važno radi obezbeđivanja odgovarajućeg kvaliteta (npr. fizičke stabilnosti) i in vivo performansi (npr. brzina oslobađanja leka) (Haeferle i Paulus, 2010). Stoga, kako bi se dobio dublji uvid u mikrostrukturu i distribuciju komponenti u svakoj od ispitivanih formulacija, korišćena je konfokalna Raman spektroskopija. Na dobijenim kodiranim slikama u boji uzoraka stabilizovanih APG emulgatorom, može se jasno uočiti da su kapi ulja okružene slojem korišćenog APG emulgatora u visokoj koncentraciji (slika 4.2.2). Imajući na umu rezultate polarizacione mikroskopije, ovaj nalaz dobijen primenom konfokalne Raman spektroskopije potvrđuje da mešani APG emulgator formira lamelarni sloj oko uljanih kapi u ispitivanim uzorcima, i time omogućava adekvatnu stabilizaciju sistema, odnosno sprečava koalescenciju kapi. Daljim analiziranjem dobijenih spektara, očigledno je da APG emulgator nije lokalizovan samo na površini kapi, već se nalazi i u vodenoj fazi, ali u nižoj koncentraciji (tipični pik na  $1294\text{ cm}^{-1}$  jasno je uočljiv u spektru vodene faze), doprinoseći tako formiranju slabe lamelarne gel kristalne faze. Dodatno, u slučaju uzoraka izrađenih dodatkom izopropanola i glicerola, nije uočena značajna razlika u strukturi u odnosu na osnovnu APG formulaciju, što je u skladu sa nalazima dobijenim primenom polarizacione mikroskopije. Analiziranjem dobijenih spektara uočava se da su oba korastvarača homogeno distribuirana kroz vodenu fazu ispitivanih uzoraka, ali se mogu detektovati i u međusloju (karakteristični pikovi izopropanola na  $813\text{ cm}^{-1}$  i glicerola na  $478\text{ cm}^{-1}$  pojavljuju se u spektrima vodene faze i međupovršinskog sloja).

Sa druge strane, kao što je i bilo očekivano, kodirane slike u boji referentnog uzorka potvrdile su značajnu razliku u mikrostrukturi u odnosu na uzorke bazirane na APG emulgatoru (slika 4.2.2). Ovde se jasno uočavaju lipidne strukture varijabilnog oblika i nejednake veličine. Interesantno, cetostearil alkohol je uglavnom lokalizovan unutar lipidnih struktura, ali je prisutan i u vodenoj fazi i međupovršinskom sloju u nižim koncentracijama (karakteristični pikovi cetostearil alkohola na  $1055$  i  $1120\text{ cm}^{-1}$  jasno se uočavaju u spektru vodene faze R-A uzorka), što podržava pretpostavku da višak cetostearil alkohola može da formira lipofilnu gel fazu.

Na kraju, važno je naglasiti da su kristali nerastvornog aceklofenaka različite veličine uočeni u spektru vodene faze svih ispitivanih uzoraka. Međutim, prisustvo aceklofenaka nije detektovano u spektru vodene faze izvan kristala, kao ni u spektru sloja emulgatora na površini kapi. Ovaj nalaz ne znači da aceklofenak nije rastvoren u vodenoj fazi ili u međusloju ispitivanih uzoraka. Štaviše, pre bi se moglo reći da je rastvorena količina aceklofenaka ispod limita detekcije konfokalne Raman spektroskopije. Naime, dobro je poznato da je koncentracija rastvorene lekovite supstance potrebna za detekciju primenom

konfokalne Raman spektroskopije značajno viša u odnosu na druge analitičke metode kao što je UHPLC-MS/MS. Stoga, metod opisan u delu 3.2.17 korišćen je za određivanje količine aceklofenaka koja je rastvorena u ispitivanim podlogama. Sa regulatorne tačke gledišta, za procenu nivoa sličnosti/razlika u mikrostrukturi između test i referentnog preparata, nije dovoljno sprovesti samo vizuelizaciju mikrostrukture. Regulatorne agencije zahtevaju dokaze dobijene karakterizacijom fizičkih CQA koji mogu (i) da utiču na biološku raspoloživost i aplikaciju preparata, ili pak mogu (ii) da ukažu na varijabilnost u proizvodnom procesu i nestabilnost preparata (EMA, 2018). Stoga, u narednom delu predstavljeni su rezultati ispitivanja atributa kvaliteta koji se smatraju kritičnim za procenu sličnosti u mikrostrukturi između ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema.

#### **4.2.2 Procena CQA ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema**

Prema nacrtu vodiča koji je izdala EMA za kvalitet i ekvivalentnost preparata za primenu na koži (EMA, 2018), CQA koje treba pratiti u cilju procene sličnosti/razlika u mikrostrukturi polučvrstih preparata su: pH, reološko ponašanje i gustina. Sa druge strane, istraživači okupljeni oko FDA ističu značaj određivanja pH vrednosti, odnosa rastvorenog i nerastvornog oblika leka, veličine čestica, polimorfnog oblika, gustine, specifične težine, reološkog ponašanja i aktivnosti vode (Murthy, 2016). S obzirom da lista CQA koje treba pratiti nije konačna, u ovoj studiji, kao atributi koji su potencijalno kritični za terapijske performanse ispitivanih uzoraka izdvojeni su: saturaciona koncentracija aceklofenaka, pH vrednost, reološki parametri i način distribucije vode u sistemu.

Imajući na umu da bilo koja promena u sastavu podloge, posebno prisustvo korastvarača, može da utiče na rastvorljivost leka u podlozi i time, njegovu termodinamičku aktivnost (Smith i sar., 2000), **saturaciona koncentracija aceklofenaka (Cs)** u ispitivanim podlogama je identifikovana kao važan faktor rizika (CQA) koji može značajno da utiče na in vivo performanse. Drugim rečima, određivanje Cs aceklofenaka sprovedeno je sa ciljem da se proceni potencijal ispitivanih podloga (sa/bez dodatog rastvarača) da rastvore inicijalno suspendovan aceklofenak. Poređenjem dobijenih Cs vrednosti može se uočiti značajna razlika u količini aceklofenaka koja je rastvorena u ispitivanim podlogama. Naime, Cs aceklofenaka u APG podlozi sa izopropanolom (Cs=1,082 mg/g) bila je značajno veća u odnosu na APG podlogu bez korastvarača (Cs=0,156 mg/g), dok je Cs aceklofenaka u APG podlozi sa glicerolom (Cs=0,575 mg/g) bila manja u odnosu na APG podlogu sa izopropanolom, ali ipak značajno veća u odnosu na osnovnu APG podlogu. Sa druge strane, Cs aceklofenaka u

referentnoj podlozi bila je značajno manja u poređenju sa svim ispitivanim APG podlogama ( $C_s=0,075$  mg/g), što ukazuje na sposobnost koloidne strukture APG uzoraka da rastvori inicijalno suspendovan aceklofenak u određenom procentu. Međutim, treba naglasiti da su svi ispitivani uzorci po tipu suspenzije (što je potvrđeno primenom polarizacione mikroskopije i konfokalne Raman spektroskopije), pri čemu je dodatak korastvarača samo uslovio povećanje količine aceklofenaka koja je rastvorena u odgovarajućim podlogama. Takođe, usled značajnih razlika u vrednostima ovog parametra, razumno je očekivati razliku između ispitivanih formulacija u pogledu isporuke aceklofenaka u/kroz kožu. Stoga, dobijene  $C_s$  vrednosti biće razmatrane u trećoj fazi eksperimentalnog rada, radi boljeg razumevanja studija penetracije i permeacije u/kroz kožu.

**Tabela 4.2.1.** Reološki parametri (minimalni ( $\eta_{\min}$ ) i maksimalni ( $\eta_{\max}$ ) prividni viskozitet, prinosni napon i histerezna površina), pH i električna provodljivost ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema, određeni nakon nedelju dana i nakon tri meseca čuvanja na  $25 \pm 2$  °C (srednja vrednost  $\pm$  SD, n=3)

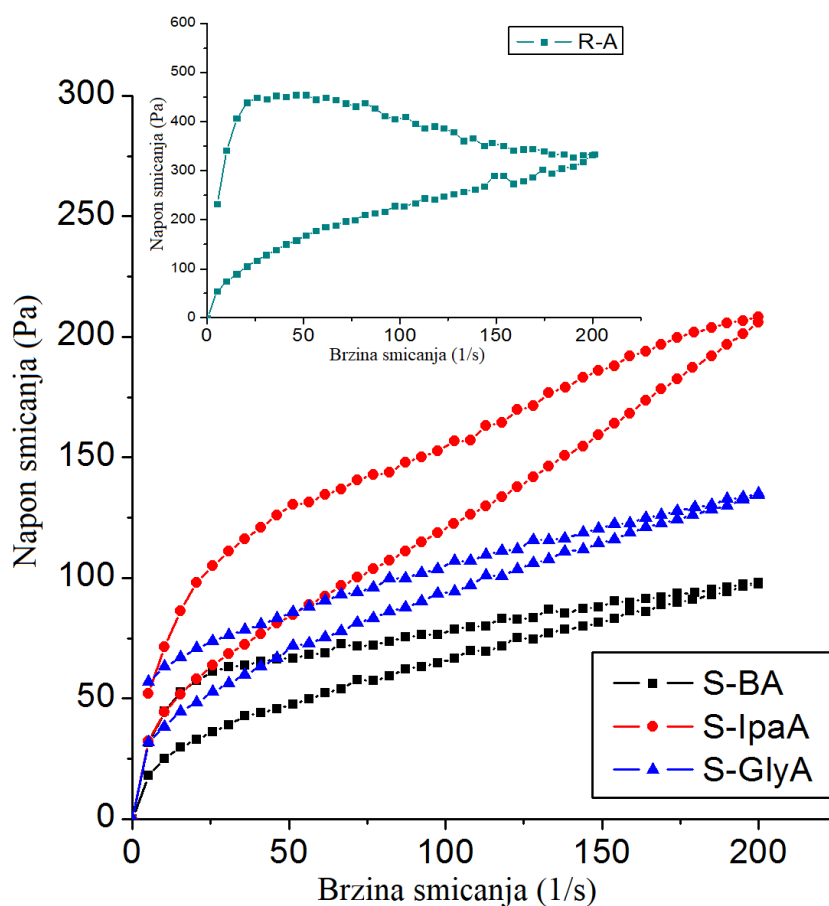
Uzorak	$\eta_{\min}$ (Pas)	$\eta_{\max}$ (Pas)	Prinosni napon (Pa)	Histerezna površina (Pa/s)	pH	Električna provodljivost ( $\mu$ S/cm)
<b>Nakon 7 dana čuvanja</b>						
S-BA	0,49 $\pm$ 0,02	6,18 $\pm$ 0,61	11,34 $\pm$ 0,56	2318,6 $\pm$ 134,9	4,66 $\pm$ 0,06	14,18 $\pm$ 0,04
S-IpaA	1,05 $\pm$ 0,03	10,10 $\pm$ 1,04	21,82 $\pm$ 2,46 <sup>#</sup>	5903,9 $\pm$ 376,5 <sup>#</sup>	4,31 $\pm$ 0,02	9,26 $\pm$ 0,13
S-GlyA	0,67 $\pm$ 0,04	11,05 $\pm$ 1,46	11,13 $\pm$ 0,77	2090,5 $\pm$ 207,5	4,46 $\pm$ 0,02	8,11 $\pm$ 0,22
R-A	1,66 $\pm$ 0,12	45,41 $\pm$ 2,76*	58,02 $\pm$ 4,67*	33546,7 $\pm$ 2073,8*	4,20 $\pm$ 0,01	5,98 $\pm$ 0,12
<b>Nakon 3 meseca čuvanja</b>						
S-BA	0,69 $\pm$ 0,01	6,68 $\pm$ 0,32	12,29 $\pm$ 0,48	2605,5 $\pm$ 130,1	4,48 $\pm$ 0,02	12,34 $\pm$ 0,71
S-IpaA	1,10 $\pm$ 0,05	9,64 $\pm$ 0,38	25,24 $\pm$ 1,79	6693,0 $\pm$ 424,9	4,01 $\pm$ 0,02	7,79 $\pm$ 0,10
S-GlyA	0,77 $\pm$ 0,16	10,11 $\pm$ 1,39	12,35 $\pm$ 0,37	2314,9 $\pm$ 252,5	4,17 $\pm$ 0,02	6,39 $\pm$ 0,01
R-A	1,77 $\pm$ 0,26	54,70 $\pm$ 1,46*	63,19 $\pm$ 5,88*	31364,3 $\pm$ 2719,8*	3,96 $\pm$ 0,02	3,35 $\pm$ 0,08

\*  $p < 0,05$  u poređenju sa svim APG uzorcima (S-BA, S-GlyA, S-IpaA)

<sup>#</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa S-BA i S-GlyA

U slučaju slabo kiselih lekova, kao što je aceklofenak, u zavisnosti od pH vrednosti, ukupna količina leka rastvorena u vodenoj fazi može da bude u nejonizovanom i/ili jonizovanom obliku, koji poseduju različit potencijal za permeaciju kroz kožu. Dodatno, pH vrednost,

pored uticaja na stepen jonizacije leka, može da utiče i na distribuciju lekovite supstance u mikrostrukturi, stabilnost ispitivanog preparata i njegov bezbednosni profil (Shanley, 2016; Chang i sar., 2013b). Stoga, pH vrednost je važan atribut kvaliteta koji je neophodno razmotriti prilikom poređenja test i referentnog preparata (Murthy, 2016). Merenje pH vrednosti potvrdilo je da su sve formulacije u opsegu prihvatljivom za primenu na koži (tabela 4.2.1), pri čemu su uočene male razlike u pH vrednostima između uzoraka na bazi APG emulgatora i referentnog uzorka. Dodatno, poređenjem pH vrednosti uzoraka sa aceklofenakom (tabela 4.2.1) sa odgovarajućim placebo uzorcima (4,79, 4,71, 4,61, 4,30 za uzorke S-B, S-Ipa, S-Gly, R (bez aceklofenaka), respektivno), jasno je da je dodatak aceklofenaka indukovaо blag pad pH vrednosti svih ispitivanih uzoraka. Imajući na umu dobijene rezultate, razumno je očekivati da uočene male razlike (u okviru 0,5 pH jedinice), neće usloviti značajne varijacije u in vivo performansama ispitivanih uzoraka.



**Slika 4.2.3.** Uporedni prikaz krivih tečenja (reograma) ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema na bazi odabranog APG emulgatora (S-BA, S-IpaA, S-GlyA) i odgovarajućeg referentnog uzorka (R-A), snimljenih inicijalno, nakon 7 dana strukturiranja.

Reološko ponašanje polučvrstih emulzionih sistema je direktna funkcija specifične mikrostrukture, te može da utiče kako na aplikativne/senzorne karakteristike preparata, tako i na isporuku leka u/kroz kožu i time na terapijsku efikasnost (Krishnaiah i sar., 2014). S obzirom da razmazivost, kao tipična senzorna osobina, direktno zavisi od reoloških karakteristika ispitivanih uzoraka, odnosno, prevashodno od prinosnog napona, njegovo određivanje je inicijalno predloženo za procenu sličnosti/razlika u mikrostrukтури ispitivanog generičkog i odgovarajućeg referentnog preparata (Kryscio i sar., 2008; Krishnaiah i sar., 2014). Međutim, predloženi nacrt vodiča za kvalitet i ekvivalentnost preparata za primenu na koži zahteva značajno kompleksniju reološku analizu kako bi se u potpunosti okarakterisala mikrostruktura polučvrstih preparata za primenu na koži (EMA, 2018). Stoga, pored određivanja prinosnog napona *shear stress ramp* metodom, sprovedena je analiza krivih tečenja primenom *steady-state* (kontinualnih) reoloških merenja, kao i određivanje vrednosti histerezne površine, minimalnog i maksimalnog prividnog viskoziteta. Pored uvida u specifičnu mikrostrukturu, analiza pomenutih reoloških parametara trebalo je da da određeni uvid u ponašanje ispitivanih uzoraka prilikom aplikacije.

Dobijene krive proticanja/tečenja, predstavljene na slici 4.2.3, ukazale su da sve ispitivane uzorke karakteriše pseudoplastični, vremenski zavisni tip tečenja (engl., *shear-thinning flow behavior*) sa umerenom do izraženom tiksotropijom. Ujedno, dobijeni rezultati ukazali su na značajne razlike u reologiji ispitivanih uzoraka u skladu sa razlikama u sastavu formulacije, odnosno razlikama u mikrostrukтури uočenoj pod polarizacionim mikroskopom. Kao što je i bilo očekivano, referentni uzorak je pokazao statistički značajno veću ( $p < 0,05$ ) vrednost prinosnog napona u odnosu na uzorke na bazi APG emulgatora (tabela 4.2.1), što ukazuje na veći otpor pri delovanju spoljašnje sile (pre nego što sistem započne tečenje), odnosno na veći nivo strukturiranja u sistemu. Takođe, referentni uzorak je pokazao statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) ukupni otpor proticanju/tečenju, izražen vrednošću viskoziteta, kao i veći stepen tiksotropije što se manifestovalo statistički značajno većom ( $p < 0,05$ ) vrednošću histerezne površine (tabela 4.2.1).

Sa druge strane, pažljivim analiziranjem reograma (slika 4.2.3) i reoloških parametara (tabela 4.2.1) dobijenih za uzorke na bazi APG emulgatora, može se zaključiti, na prvi pogled, da je dodatak glicerola doveo do minornih promena u mikrostrukтури ispitivanih podloga. Naime, poređenjem vrednosti prinosnog napona i histerezne površine (tabela 4.2.1) uzorka sa glicerolom u odnosu na osnovni APG uzorak, iako je nešto veći viskozitet prilikom smicanja uočen za uzorak S-GlyA, može se očekivati da se njihove aplikativne karakteristike tokom faze nanošenja/utrljavanja, neće značajno razlikovati. Međutim, isto se ne može reći i za

dodatak izopropanola koji je, očigledno, doveo do značajnog ugušćivanja sistema, što se odrazilo značajnim porastom svih ispitivanih parametara (posebno prinosnog napona i histerezne površine). Na kraju važno je naglasiti da se uočeno reološko ponašanje uzoraka izrađenih primenom podloge na bazi APG emulgatora, sa umerenom tiksotropijom i relativno niskim vrednostima prinosnog napona, generalno smatra poželjnim, jer omogućava lako, ravnomerno i homogeno nanošenje inkorporirane lekovite supstance i obrazovanje kontinuiranog filma koji dobro adherira na površinu kože (Pantelić, 2013).

Međutim, interesantno je napomenuti da je inkorporiranje aceklofenaka u sve ispitivane podloge dovelo do značajnog povećanja otpora pri primeni napona smicanja u odnosu na odgovarajuće prazne podloge (Pantelić, 2013). Iako se često u literaturi navodi da je prisustvo suspendovanog leka odgovorno za ugušćivanje sistema (npr. Nagelreiter i sar., 2013; Pantelić, 2013), ne može se zanemariti mogućnost da je u slučaju lekovitih supstanci sa amfifilnim karakteristikama, kakav je aceklofenak, mala količina (iako nije detektovana primenom konfokalne Raman spektroskopije, usled ograničenja u osetljivosti) lokalizovana u lamelarnom regionu na površini kapi i/ili kontinualnoj fazi, doprinoseći tako strukturiranju sistema.

**Tabela 4.2.2.** Parcijalni gubitak mase ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema tokom definisanih temperaturnih intervala, dobijen termogravimetrijskom analizom

<b>Uzorak</b>	<b>30–50°C (%)</b>	<b>50–70°C (%)</b>	<b>70–110°C (%)</b>	<b>Rezidualna masa (%)</b>
<b>S-BA</b>	11,8±1,0	23,7±1,8	31,8±3,2	32,7±1,4
<b>S-IpaA</b>	9,2±0,6	55,4±2,0	3,3±1,9	32,1±0,6
<b>S-GlyA</b>	8,4±1,4	26,3±1,2	19,5±3,8	45,8±1,2
<b>R-A</b>	3,5±0,2	15,7±1,2	14,9±1,9	65,9±0,6

Dobro je poznato da način distribucije vode u emulzionim sistemima može da utiče na isporuku leka u/kroz kožu, preko (i) uticaja na brzinu difuzije lekovite supstance kroz nosač u/kroz kožu i/ili (ii) putem hidratacije kože i promene njene permeabilnosti. Naime, za razliku od slobodne (bulk) vode koja isparava vrlo brzo nakon primene i doprinosi subjektivnom osećaju hlađenja kože, interlamelarna (vezana) voda obezbeđuje dugotrajnu hidrataciju kože, što može doprineti poboljšanju perkutane resorpcije (Csizmazia i sar., 2010; Pantelić, 2013;

Savic i sar., 2009). Stoga, podaci o načinu distribucije vode, kao dodatnom CQA dobijeni su termogravimetrijskom analizom i merenjem električne provodljivosti.

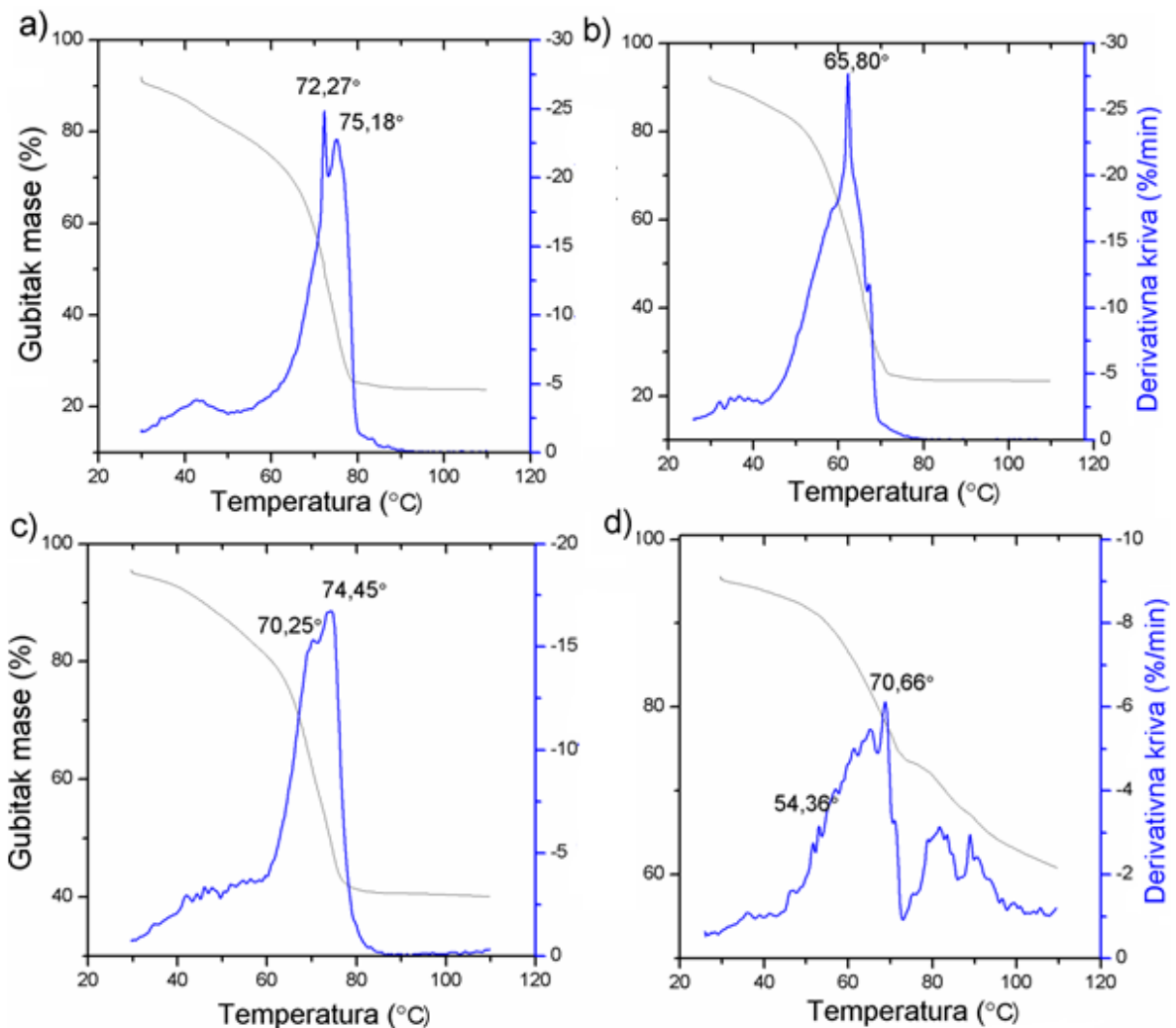
Analiziranjem rezultata dobijenih primenom termogravimetrijske analize za parcijalni gubitak mase tokom unapred definisanih temperaturnih intervala za uzorke na bazi APG emulgatora (tabela 4.2.2), očigledno je da se u slučaju S-BA uzorka, najveći gubitak mase odvija u trećem temperaturom opsegu (31,83%), što ukazuje na dominantno prisustvo interlamelarno vezane („depo“) vode. S obzirom da količina interlamelarno vezane vode zavisi od broja grupa slobodnih za građenje vodoničnih veza, može se očekivati da će dodatak rastvarača koji se mešaju sa vodom (npr. glicerol i izopropanol), promeniti odnos „slobodne“ i „vezane“ vode u sistemu (Pantelić, 2013; Savic i sar., 2009). Zaista, u slučaju uzorka sa glicerolom, najveći gubitak mase odvija se u drugom (26,27%) i nešto manje u trećem temperaturnom opsegu (19,46%), što potvrđuje da S-GlyA uzorak poseduje manje interlamelarno vezane vode u poređenju sa uzorkom izrađenim primenom osnovne APG podloge (S-BA). Međutim, treba primetiti da je uticaj prisustva isparljivog korastvarača, kao što je izopropanol, mnogo izraženiji, i rezultuje značajnim gubitkom mase u drugom (55,41%) i minimalnim u trećem temperaturnom opsegu (3,31%). Takođe, analiziranjem rezultata dobijenih za rezidualnu masu na kraju eksperimenta (tabela 4.2.2), očigledno je da je izopropanol u potpunosti ispario tokom studije, dok je značajno veća količina glicerola zaostala u odgovarajućem uzorku (što je bilo i očekivano).

Sa druge strane, analiziranjem vrednosti za parcijalni gubitak mase referentnog uzorka, može se primetiti da su gubici mase u definisanim temperaturnim opsezima manje izraženi u odnosu na uzorke stabilizovane APG emulgatorom, verovatno kao posledica manje kompleksne koloidne strukture. Naime, jasno se uočava gotovo potpuno jednak gubitak mase tokom drugog (15,72%) i trećeg (14,86%) temperaturnog opsega, što bi se moglo pripisati isparavanju semihidratne vode cetostearil alkohola, kao i vode koja je mehanički zarobljena u gelsku mrežu cetostearil alkohola (Nesseem, 2001; Pantelić, 2013). Dodatno, kao što je i bilo očekivano, referentni uzorak je okarakterisan najvećim procentom rezidualne mase (tabela 4.2.2), usled veće količine neisparljivih lipidnih komponenata.

Pažljivom analizom dobijenih derivativnih profila (slika 4.2.4), može su uočiti da je dodatak oba korastvarača uslovio blago povećanje brzine evaporacije (S-IpaA i S-GlyA) u poređenju sa S-BA uzorkom. Naime, brzina evaporacija S-BA uzorka rasla je do 75,18°C, dok su u slučaju uzoraka sa korastvaračima derivativne krive pomerene ka nižim vrednostim (65,8°C i 74,45°C za S-IpaA i S-GlyA, respektivno). Mali pikovi na derivativnim krivama referentnog uzorka, koji prethode osnovnom piku, mogu biti rezultat topljenja cetostearil alkohola (tačka



topljenja cetostearil alkohola je na oko 56°C) (Nesseem, 2001). Interesantno je napomenuti da u slučaju uzoraka stabilizovanih APG emulgatorom, dodatak aceklofenaka nije doveo da značajnih promena u parcijalnom gubitku mase tokom definisanih temperaturnih opsega, kao i izgledu derivativnih krivih u poređenju sa praznim podlogama (Pantelić, 2013). Međutim, u slučaju referentnog uzorka izrađenog korišćenjem nejonskog hidrofilnog krema kao podloge, uočene su značajne razlike – u slučaju prazne podloge, najveći gubitak mase (30,56%) dobijen je tokom zagrevanja od 50 do 70°. Slična pojava uočena je nakon inkorporiranja ketoprofena u ovu podlogu, što je verovatno posledica izražene amfifilne prirode ovih model lekovitih supstanci, koje uslovljavaju promene u sadržaju sekundarne vode u sistemu (Pantelić, 2013).



**Slika 4.2.4.** Komparativan prikaz termogravimetrijskih i derivativnih profila ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema sa aceklofenakom kao model lekovitom supstancom: a) S-BA, b) S-Ipa, c) S-GlyA, d) R-A

Uočene razlike u električnoj provodljivosti između ispitivanih uzoraka sa aceklofenakom kao model lekovitom supstancom (tabela 4.2.1), bile su u potpunosti u skladu sa različitim odnosom slobodne vode u njihovoj strukturi (tabela 4.2.2). Naime, dobro je poznato da električna provodljivost višefaznih emulzionih sistema (kao što su ispitivani uzorci) zavisi od udela slobodne vode u sistemu i koncentracije rastvorenih jona u njoj (Savic i sar., 2009). Na primer, među ispitivanim uzorcima, uzorak S-BA je posedovao najveću električnu provodljivost (tabela 4.2.1) i najveći gubitak mase u prvom temperaturom opsegu (tabela 4.2.2), što odgovara evaporaciji slobodne vode. Takođe, kao što je i bilo očekivano, prisustvo aceklofenaka, kao slobodne kiseline, dovelo je do značajnog povećanja vrednosti električne provodljivosti u poređenju sa odgovarajućim placebo podlogama (13,86, 7,53, 7,09, 5,19  $\mu\text{S}/\text{cm}$  za uzorke S-B, S-Ipa, S-Gly, R (bez aceklofenaka), respektivno), što potvrđuje da je rastvorena frakcija aceklofenaka makar delom prisutna u jonizovanom obliku.

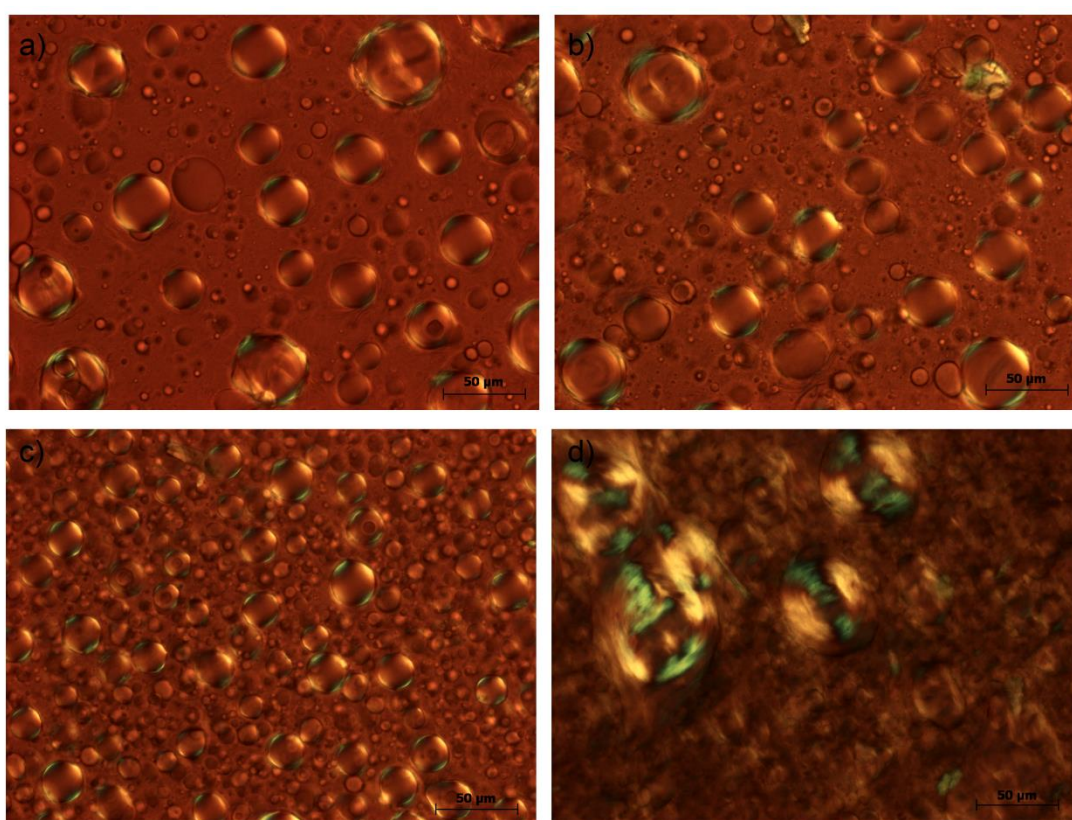
U zaključku, karakterizacija odabranih CQA potvrdila je prisustvo određenih razlika u mikrostrukturi ispitivanih emulzionih sistema. Kao rezultat, dodatne in vitro/in vivo studije su bile neophodne kako bi se procenilo da li uočen nivo razlika u praćenim parametrima može da ukaže na razlike u isporuci aceklofenaka u/kroz kožu između test i referentnih uzoraka. Drugim rečima, cilj sprovedenog sveobuhvatnog ispitivanja, između ostalog, bio je da ukaže da li je procena sličnosti/razlika u odabranim CQA, zajedno sa odgovarajućim in vitro i/ili in vivo studijama dobra alternativa za dokazivanje terapijske ekvivalentnosti polučvrstih preparata za primenu na koži.

#### **4.2.3 Ispitivanje fizičko-hemijske stabilnosti ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema**

Prema poglavlju <795> Američke farmakopeje „*Pharmaceutical Compounding—Nonsterile Preparations*“ (USP37-NF32, 2014b), u odsustvu odgovarajućih podataka o stabilnosti, rok upotrebe polučvrstih preparata izrađenih u apoteci, koji sadrže vodu u sastavu formulacije, je do 30 dana. Takođe, DAC/NRF 2013 propisuje rok upotrebe do mesec dana za hidrofilne kreme izrađene u apotekama (konzervisan preparat, u plastičnoj kutiji kao unutrašnjem pakovanju). Kako bi se sprečio nepotreban otpad i tako smanjili troškovi za pacijente, potrebni su podaci o stabilnosti tokom dužeg vremenskog perioda. Stoga, fizičko-hemijska stabilnost test uzoraka izrađenih suspendovanjem aceklofenaka u podloge na bazi APG emulgatora, kao i odabranu referentnu podlogu praćena je tokom tri meseca čuvanja na sobnoj temperaturi, analizom promena u sledećim karakterističnim parametrima: izgled (vizuelni i

mikroskopski), pH vrednost, električna provodljivost, reološki parametri, sadržaj aceklofenaka i njegovog degradacionog proizvoda diklofenaka.

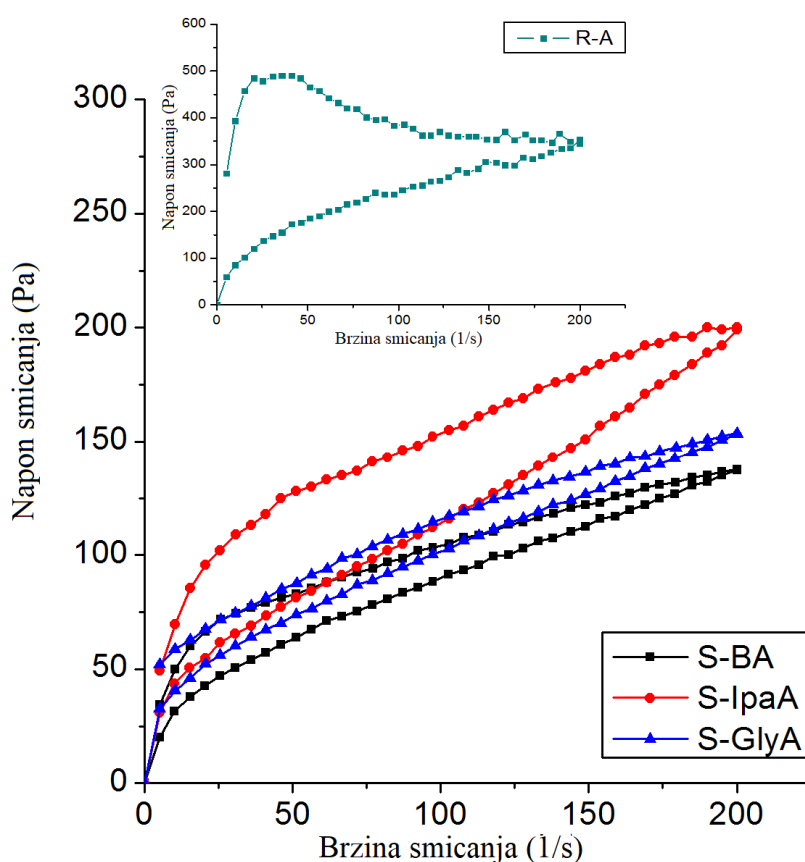
Vizuelna kontrola ispitivanih uzoraka tri meseca nakon čuvanja na sobnoj temperaturi potvrdila je da su svi ispitivani uzorci zadržali svoje inicijalne karakteristike (sjajni kremovi različite konzistencije (u skladu sa razlikama u sastavu), bez grudvica i stranih materija), bez znakova separacije faza. Takođe, pažljivom analizom polarizacionih mikrografija snimljenih nakon tri meseca čuvanja (slika 4.2.5), nisu uočene značajne promene u mikrostrukтури, kao i u veličini i distribuciji veličine kapi u poređenju sa mikrografijama dobijenim 7 dana nakon izrade (slika 4.2.1).



**Slika 4.2.5.** Reprezentativne polarizacione mikrografije ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema sa aceklofenakom kao model lekovitom supstancom, snimljene nakon tri meseca čuvanja na  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ : a) S-BA, b) S-IpaA, c) S-GlyA, d) R-A (uveličanje  $400\times$ ).

Krive tečenja, predstavljene grafički kao zavisnost napona smicanja od brzine smicanja (slika 4.2.6), kao i odgovarajući reološki parametri (tabela 4.2.1), blago su pomereni ka većim vrednostima (bez statističke značajnosti), što ukazuje na blago strukturiranje i posledično ugušćivanje ovih sistema tokom čuvanja. Ova pojava je česta kod emulzionih sistema

stabilizovanih nejonskim mešanim emulgatorima (Pantelić, 2013). Drugim rečima, s obzirom da je sličan trend uočen i kod placebo podloga (bez aktivnih supstanci) (Pantelić, 2013), uočeno strukturiranje sistema se ne može pripisati prisustvu aceklofenaka, kao model lekovite supstance, već karakteristikama upotrebljenih emulgatora. Kao što je i bilo očekivano, uočeno ugušćivanje ispitivanih uzorka nakon tri meseca čuvanja, praćeno je smanjenjem vrednosti električne provodljivosti (tabela 4.2.1). Istovremeno, detektovan je i blag pad pH (tabela 4.2.1), ali su sve dobijene vrednosti bile u opsegu prihvatljivom za preparate za primenu na koži.



**Slika 4.2.6.** Uporedni prikaz krivih tečenja (reograma) ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema na bazi odabranog APG emulgatora (S-BA, S-IpaA, S-GlyA), i odgovarajućeg referentnog uzorka (R-A), snimljenih nakon tri meseca čuvanja na  $25 \pm 2^\circ\text{C}$

Na kraju, važno je istaći da je prosečni sadržaj aceklofenaka u svim ispitivanim podlogama bio oko 93% (94,8%, 93,1%, 93,9%, 93,2% za uzorke S-BA, S-Ipa, S-GlyA i R-A, respektivno) – sadržaj diklofenaka kao glavnog degradacionog proizvoda aceklofenaka je bio manji od 7% – što potvrđuje da čuvanje tokom tri meseca na sobnoj temperaturi nije značajno

uticalo na hemijsku stabilnost aceklofenaka. Dobijeni rezultati jasno ukazuju na dobru preliminarnu fizičko-hemijsku stabilnost svih podloga na bazi APG emulgatora, u prisustvu aceklofenaka kao model lekovite supstance, koja je u potpunosti uporediva sa stabilnošću referentne podloge farmakopejskog kvaliteta, a što dalje implicira mogućnost njihove upotrebe kao alternativnih podloga u izradi magistralnih lekova.

## 4.3 Rezultati i diskusija treće faze eksperimentalnog rada

### 4.3.1 In vitro ispitivanje oslobađanja aceklofenaka

Početak, dužina trajanja i stepen terapijskog odgovora preparata za primenu na koži zavisi od relativne efikasnosti tri uzastopna procesa: 1) oslobađanje lekovite supstance iz nosača aplikovanog na površini kože, 2) penetracija/difuzija lekovite supstance kroz SC i druge slojeve kože, 3) postizanje željenog farmakološkog efekta na mestu delovanja. Varijacije u navedenim procesima mogu direktno da utiču na bezbednost i efikasnost preparata (Shah i sar., 2015). Stoga, u trećoj fazi eksperimentalnog rada, biofarmaceutska karakterizacija uzoraka razvijenih tokom prve i druge faze započeta je analizom in vitro profila oslobađanja aceklofenaka kroz sintetsku (polikarbonatnu) membranu.

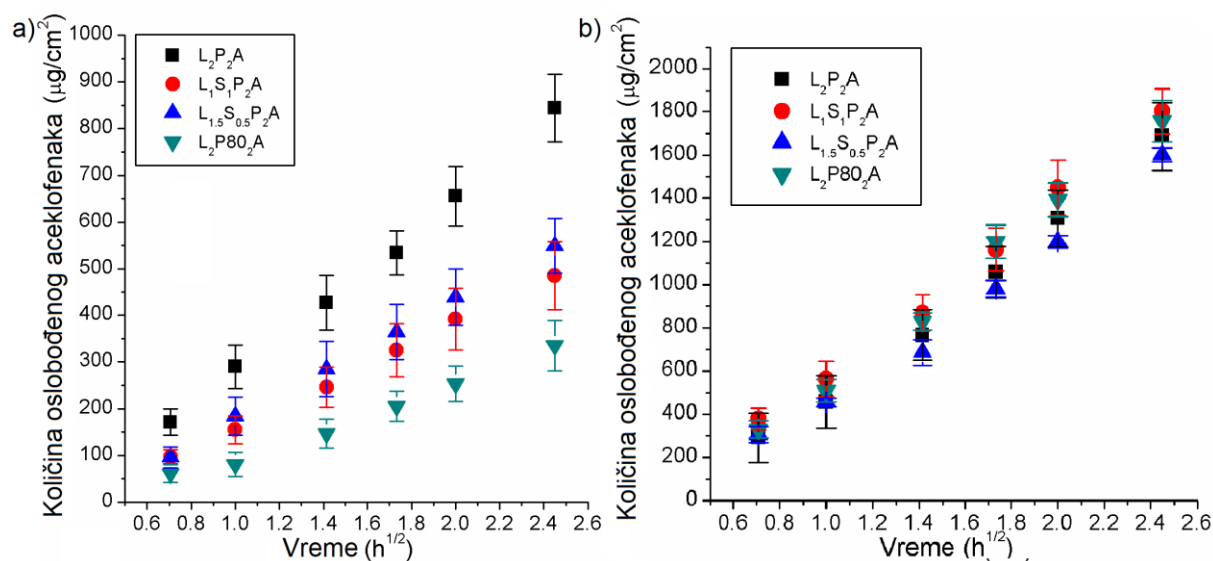
Generalno, određivanje in vitro brzine oslobađanja smatra se korisnim u različitim aspektima razvoja preparata za primenu na koži. Inicijalno, tokom razvoja formulacije, in vitro ispitivanjem oslobađanja lekovite supstance mogu se dobiti informacije o mikrostrukturi, neophodne za optimizaciju sastava formulacije i proizvodnog procesa. Sa druge strane, tokom kasnog razvoja, kao i postmarketinške faze, in vitro ispitivanje oslobađanja je korisno za kontrolu kvaliteta, procenu konzistentnosti između serija i stabilnosti preparata tokom roka upotrebe (Miranda i sar., 2018a). Štaviše, prema nacrtu vodiča za procenu kvaliteta i ekvivalentnosti preparata za primenu na koži (EMA, 2018), in vitro brzina oslobađanja, kao CQA, je sastavni deo specifikacije nakon puštanja u promet i roka trajanja. Takođe, tokom razvoja generičkog leka, validiran postupak in vitro ispitivanja oslobađanja lekovite supstance je neophodan za dokazivanje proširene farmaceutske ekvivalentnosti sa odgovarajućim referentnim lekom (EMA, 2018). Kao glavne prednosti ove metodologije ističu se visoka osetljivost i diskriminatorna snaga u detekciji potencijalnih razlika u fizičko-hemijskim karakteristikama preparata za primenu na koži (Miranda i sar., 2018a). Otuda, iako se ne može direktno predvideti biološka raspoloživost in vivo (usled primene sintetskih membrana) (USP37-NF32, 2014c), in vitro ispitivanje oslobađanja sprovedeno je sa ciljem da se proceni značaj uočenih razlika u sastavu i mikrostrukturi (odnosno ispitivanim fizičko-hemijskim parametrima) svakog od razvijenih nosača, i tako dobije određeni uvid u kompleksnost faktora koji određuju isporuku aceklofenaka u/kroz kožu.

#### 4.3.1.1 In vitro ispitivanje oslobađanja aceklofenaka iz nanoemulzija

Uprkos intenzivnim istraživanjima, još uvek ne postoji standardna metoda ili aparatura za in vitro ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance iz nanonosaa. Stoga, in vitro ispitivanje oslobađanja aceklofenaka iz nanoemulzija izdvojenih na osnovu rezultata eksperimentalnog dizajna i preliminarne studije stabilnosti, sprovedeno je primenom vertikalnih difuzionih ćelija i imerzionih ćelija u cilju (i) identifikacije najadekvatnije metode za ovu vrstu ispitivanja kao i (ii) detekcije potencijalnih razlika u in vitro brzini oslobađanja aceklofenaka iz razvijenih formulacija. Dodatno, ispitivanju je podvrgnuta referentna nanoemulzija (L<sub>2</sub>P80<sub>2</sub>A), stabilizovana smešom lecitina (2%) i polisorbata 80 (2%), kako bi se procenilo da li su odabrani saharozni estri, kao blagi penetracioni inhenseri, sposobni da poboljšaju oslobađanje, odnosno, isporuku aceklofenaka u/kroz kožu, u odnosu na konvencionalno korišćen kosurfaktant, polisorbat 80. Tokom in vitro ispitivanja brzine oslobađanja, korišćena je polikarbonatna membrana sa dijametrom pora 100 nm, kako bi se sprečio prolazak nanokapi u receptorsku ćeliju. Interesantno, tokom razvoja metode, pored polikarbonatnih membrana, testirana je mogućnost primene različitih membrana na bazi celuloza nitrata (Sartorius, Stedim Biotech GmbH, Nemačka), smeše celuloznih estara (MF-Milipore™, Millipore Corporation, SAD) i polietarsulfona (Express plus PES, Merck KGaA, Nemačka). Jedino u slučaju polikarbonatnih membrana nije uočena povratna difuzija receptorskog medijuma u donorsku ćeliju tokom trajanja eksperimenta, te su ove membrane odabrane za dalja ispitivanja.

Dobijeni in vitro profili oslobađanja predstavljeni su na slici 4.3.1. Ispitivanje je sprovedeno pri *infinite dose* uslovima, kako bi se sprečila deplecija/praznjenje aceklofenaka u donorskoj ćeliji tokom eksperimenta, i posledično, obezbedila konstantna pokretačka sila za proces oslobađanja i omogućilo postizanje *steady-state* uslova (Montenegro i sar., 2012). Na ovaj način, bilo je moguće odrediti brzinu oslobađanja i ukupnu količinu oslobođenog aceklofenaka tokom eksperimenta (tabela 4.3.1). Komparativnom analizom dobijenih podataka može se jasno uočiti da je, za razliku od imerzionih (VanKel) ćelija, primena vertikalnih difuzionih ćelija omogućila detekciju značajnih razlika u oslobađanju aceklofenaka iz ispitivanih formulacija nanoemulzija. Drugim rečima, kao što se može videti sa slike 4.3.1, in vitro profili oslobađanja dobijeni primenom imerzionih ćelija su skoro u potpunosti preklapljeni, bez statistički značajnih razlika ( $p > 0,05$ ) u brzini oslobađanja, odnosno ukupnoj količini oslobođenog aceklofenaka (tabela 4.3.1). Međutim, treba primetiti da su vrednosti brzine oslobađanja kao i ukupne količine oslobođenog aceklofenaka značajno

veće ( $p < 0,05$ ) u odnosu na vrednosti ovih parametara dobijenih primenom vertikalnih difuzionih ćelija, verovatno kao posledica veće zapremine receptorskog medijuma i bolje kontrole *sink* uslova. Imajući na umu specifičan dizajn VanKel ćelija (u potpunosti su uronjene u receptorski medijum tokom eksperimenta), može se zaključiti da imerzione ćelije nisu pogodne za procenu uticaja malih razlika u sastavu formulacije na in vitro brzinu oslobađanja lekovite supstance inkorporirane u nanoemulzije.



**Slika 4.3.1.** Komparativni prikaz in vitro profila oslobađanja aceklofenaka iz ispitivanih formulacija nanoemulzija kroz veštačku polikarbonatnu membranu, određenih primenom (a) vertikalnih difuzionih i (b) imerzionih ćelija (srednja vrednost ± SD, n=6)

Detaljnou analizom rezultata dobijenih primenom vertikalnih difuzionih ćelija (slika 4.1.3, prvo se jasno uočava linearna zavisnost ( $r > 0,99$ ) između ukupne količine oslobođenog aceklofenaka po jedinici površine i kvadratnog korena iz vremena, što ukazuje da se oslobađanje odvija u skladu sa Higuchi-jevom jednačinom, odnosno da je kontrolisano procesom difuzije. Takođe, očigledno je da su brzina oslobađanja i ukupna količina oslobođenog aceklofenaka na kraju eksperimenta značajno veće (ANOVA,  $p < 0,05$ ) iz nanoemulzija na bazi saharoznih estara u odnosu na referentni uzorak (tabela 4.3.1). S obzirom da su sve ispitivane nanoemulzije posedovale inicijalno sličnu veličinu kapi (~180 nm), zeta potencijal (~40 mV), pH vrednost (~3,5) i viskozitet (~3,5 mPa s.), sa jednakom ukupnom koncentracijom surfaktanata u formulaciji (4%, *m/m*), kao i jednakim sadržajem aceklofenaka (1%, *m/m*), najmanja brzina oslobađanja iz L<sub>2</sub>P80<sub>2</sub>A formulacije mogla bi se pripisati razlikama u strukturi upotrebljenih kosurfaktanata, kao i njihovom prostornom



pakovanju na ulje-voda međupovršini (Montenegro i sar., 2012). Na osnovu dobijenih rezultata, čini se da je polisorbitat 80, uprkos razgranatoj polarnoj glavi, formirao gusto pakovan sloj na površini kapi zajedno sa fosfolipidima iz lecitina, što je za posledicu imalo najmanje oslobađanje aceklofenaka među ispitivanim formulacijama. Svakako, ne treba zaboraviti sposobnost saharoznih estara *per se* da poboljšaju oslobađanje slabo rastvornih lekovitih supstanci iz odgovarajućih nosača (Csóka i sar., 2007; Szüts and Szabó-Révész, 2012).

**Tabela 4.3.1.** Brzina oslobađanja i ukupna količina oslobođenog aceklofenaka iz razvijenih nanoemulzionih sistema, određene primenom vertikalnih difuzionih i imerzionih ćelija (srednja vrednost  $\pm$  SD, n=6)

Uzorci	Vertikalne difuzione ćelije		Imerzione ćelije	
	Brzina oslobađanja ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ )	$Q_{6h}^{\$}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Brzina oslobađanja ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ )	$Q_{6h}^{\$}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
L <sub>2</sub> P <sub>2</sub> A	379,65 $\pm$ 33,91*	843,96 $\pm$ 72,66*	814,83 $\pm$ 22,76	1686,28 $\pm$ 157,09
L <sub>1,5</sub> S <sub>0,5</sub> P <sub>2</sub> A	258,23 $\pm$ 26,26	548,89 $\pm$ 58,66	748,85 $\pm$ 34,86	1632,64 $\pm$ 33,47
L <sub>1</sub> S <sub>1</sub> P <sub>2</sub> A	226,83 $\pm$ 39,94	485,18 $\pm$ 65,49	835,30 $\pm$ 34,22	1802,51 $\pm$ 105,46
L <sub>2</sub> P <sub>80</sub> 2A	162,78 $\pm$ 33,01 <sup>#</sup>	335,02 $\pm$ 53,56 <sup>#</sup>	844,62 $\pm$ 44,62	1757,86 $\pm$ 97,07

<sup>\$</sup>  $Q_{6h}$  – ukupna količina aceklofenaka oslobođena na kraju eksperimenata (nakon 6h od početka ispitivanja); \*  $p < 0,05$  u poređenju sa L<sub>1,5</sub>S<sub>0,5</sub>P<sub>2</sub>A, L<sub>1</sub>S<sub>1</sub>P<sub>2</sub>A i L<sub>2</sub>P<sub>80</sub>2A; <sup>#</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa L<sub>2</sub>P<sub>2</sub>A, L<sub>1,5</sub>S<sub>0,5</sub>P<sub>2</sub>A i L<sub>1</sub>S<sub>1</sub>P<sub>2</sub>A

Analizom rezultata dobijenih za nanoemulzije na bazi saharoznih estara, može se uočiti da su brzina oslobađanja i ukupna količina oslobođenog aceklofenaka statistički značajno veće (ANOVA,  $p < 0,05$ ) iz formulacije L<sub>2</sub>P<sub>2</sub>A u odnosu na L<sub>1,5</sub>S<sub>0,5</sub>P<sub>2</sub>A i L<sub>1</sub>S<sub>1</sub>P<sub>2</sub>A, koje sadrže SS kao dodatni koemulgator (tabela 4.3.1). S obzirom da SS sadrži značajnu količinu lipofilnijih estara saharoze (dominantno di-, manje tri- i tetraestri), povećanje sadržaja SS na račun smanjenja sadržaja lecitina u smeši upotrebljenoj za stabilizaciju, verovatno je dovelo do formiranja gusto pakovanog i rigidnog filma na međupovršini (Aramaki i sar., 2001), što je dalje za posledicu imalo smanjeno oslobađanje aceklofenaka. Takođe, interesantno je

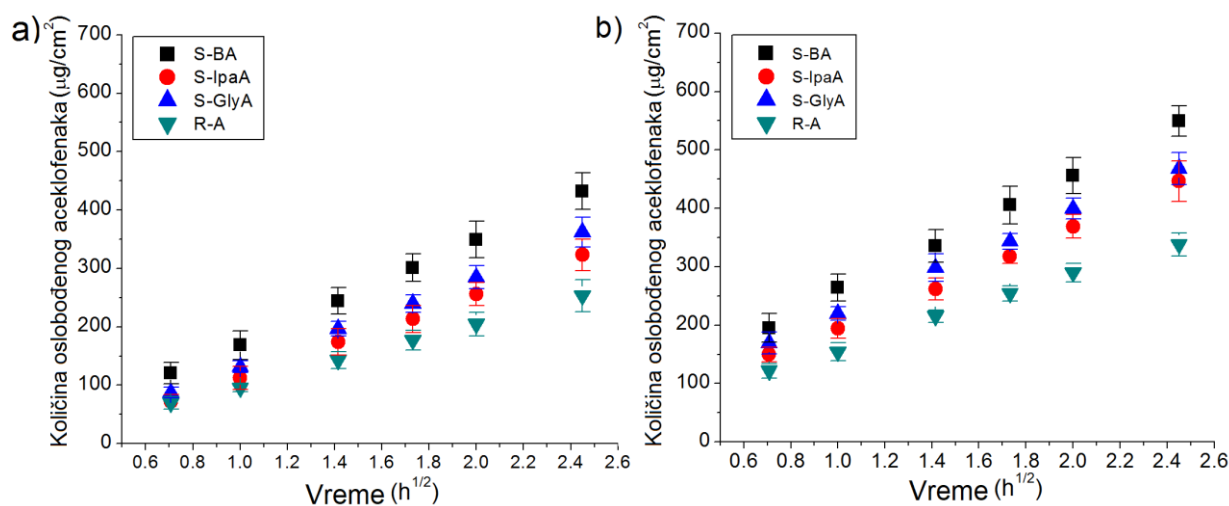
spomenuti i literaturne podatke koji ukazuju da saharozni estri sa kraćim lancem masne kiseline i višom HLB vrednošću (SP u našem slučaju) efikasnije povećaju oslobađanje lekovite supstance iz odgovarajućeg nosača u odnosu na saharozne estre sa kraćim lancem masne kiseline i nižom HLB vrednošću (SS u našem slučaju) (Csóka i sar., 2007). Stoga, na osnovu dobijenih podataka, može se zaključiti da tip i udeo surfaktanata upotrebljenih za stabilizaciju ima važnu ulogu u in vitro oslobađanju aceklofenaka iz nanoemulzija.

#### **4.3.1.2 In vitro ispitivanje oslobađanja aceklofenaka iz mikrostrukturiranih emulzionih sistema**

Za razliku od nanoemulzionih sistema, Američka farmakopeja u poglavlju <1724> *Semisolid drug products–performance tests* navodi metode koje se mogu koristiti za in vitro ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance iz polučvrstih preparata za primenu na koži (vertikalne difuzione, imerzione i *flow-through* ćelije), daje određene preporuke za sam dizajn ispitivanja, kao i detaljan postupak za obradu dobijenih rezultata (USP37-NF32, 2014c). Među navedenim metodologijama, dominantno se koriste vertikalne difuzione ćelije (u kombinaciji sa sintetskim membranama), pre svega zbog relativno jednostavne standardizacije protokola ispitivanja, dok se imerzione ćelije značajno ređe sreću u literaturi (Shah i sar., 2015). Iako se smatra da se primenom navedenih metodologija dobijaju slični in vitro profili oslobađanja lekovite supstance iz polučvrstih preparata, još uvek je ograničen broj studija koje potvrđuju navedene tvrdnje. Dodatno, imajući na umu rezultate dobijene in vitro ispitivanjem brzine oslobađanja aceklofenaka iz nanoemulzija, cilj prvog dela ove studije bio je da se proceni sposobnost vertikalnih difuzionih i imerzionih ćelija da detektuju potencijalne razlike u in vitro oslobađanju aceklofenaka iz ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema izrađenih suspendovanjem aceklofenaka u odabrane podloge. Za procenu in vitro brzine oslobađanja korišćene su, kao i u prethodnom slučaju, polikarbonatne membrane, pri *infinite dose* uslovima.

Kao što se može videti na slici 4.3.2, grafičkim predstavljanjem zavisnosti kumulativne količine oslobođenog aceklofenaka po jedinici površine od kvadratnog korena iz vremena dobijena je linearna zavisnost sa visokim koeficijentom korelacije ( $r > 0,99$ ) za oba tipa difuzionih ćelija, što potvrđuje da je, i u slučaju ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema, oslobađanje aceklofenaka kontrolisano procesom difuzije. Uprkos jasnim razlikama u dobijenim vrednostima za brzinu oslobađanja i ukupnu količinu oslobođenog aceklofenaka na kraju eksperimenta, primenom vertikalnih difuzionih i imerzionih ćelija dobijen je identičan

redosled oslobađanja aceklofenaka iz ispitivanih formulacija : S-BA>>S-GlyA>S-IpaA>>R-A. Kako cilj in vitro ispitivanja oslobađanja nije direktna procena biološke raspoloživosti (USP37-NF32, 2014c), rezultati ove studije potvrđuju da se imerziona (VanKel) ćelija mogu koristiti za procenu uticaja značajnih razlika u sastavu formulacije/mikrostrukturi. Sa druge strane, imajući na umu rezultate dobijene in vitro ispitivanjem oslobađanja aceklofenaka iz nanoemulzija, može se zaključiti da imerziona ćelija nisu pogodna za procenu minornih promena u sastavu formulacije/mikrostrukturi ispitivanih uzoraka. Svakako, ne može se isključiti i mogućnost promena u samoj strukturi nanoemulzija tokom eksperimenta, usled specifičnog dizajna imerzionih ćelija (postoji značajna razlika u karakteristikama mikro- i nanostrukturiranih emulzionih sistema).



**Slika 4.3.2.** Komparativni prikaz in vitro profila oslobađanja aceklofenaka iz ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema kroz veštačku polikarbonatnu membranu, određenih primenom (a) vertikalnih difuzionih i (b) imerzionih ćelija (srednja vrednost  $\pm$  SD, n=6)

Imajući na umu sastav (najmanji sadržaj vode), specifičnu mikrostrukturu, kao i reološki profil referentnog uzorka (najveća vrednost prinosnog napona i viskoziteta pri smicanju), najniže vrednosti brzine oslobađanja i kumulativne količine oslobođenog aceklofenaka (ANOVA,  $p < 0,05$ ) bile su krajnje očekivane (tabela 4.3.2). Štaviše, kako u nosačima tipa suspenzija oslobađanje zavisi direktno od količine lekovite supstance rastvorene u nosaču (Refai, 2001), najmanje oslobađanje iz R-A uzorka u skladu je sa najmanjom uočenom  $C_s$  vrednošću aceklofenaka u ovoj podlozi. Međutim, interesantno, među ispitivanim uzorcima na bazi APG emulgatora, najveća brzina oslobađanja i ukupna količina oslobođenog aceklofenaka (tabela 4.3.2) postignuta je primenom S-BA uzorka, izrađenog sa osnovnom

APG podlogom (Cs vrednost aceklofenaka u ovoj podlozi je bila najmanja). Takođe, iako je dodatak glicerola, odnosno izopropanola, doveo da značajnog povećanja vrednosti Cs aceklofenaka u odgovarajućim podlogama, oslobađanje je bilo statistički značajno manje ( $p < 0,05$ ) u odnosu na S-BA uzorak. Ovi nalazi jasno ukazuju na zanemarljivu ulogu količine aceklofenaka rastvorene u podlozi u njegovom oslobađanju. Štaviše, čini se da su razlike u reološkom ponašanju imale presudnu ulogu u oslobađanju aceklofenaka iz ispitivanih formulacija. Međutim, ne može se zanemariti mogućnost da je smanjenje brzine oslobađanja aceklofenaka iz uzoraka S-GlyA i S-IpaA u poređenju sa osnovnom APG formulacijom (S-BA) rezultat difuzije primenjenih korastvarača u receptorski medijum, što je dovelo do smanjene rastvorljivosti aceklofenaka u ovim podlogama i posledično njegove precipitacije.

**Tabela 4.3.2.** Brzina oslobađanja i ukupna količina oslobođenog aceklofenaka iz mikrostrukturiranih emulzionih sistema, određene primenom vertikalnih difuzionih i imerzionih ćelija (srednja vrednost  $\pm$  SD,  $n=6$ )

Uzorci	Vertikalne difuzione ćelije		Imerzione ćelije	
	Brzina oslobađanja ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ )	$Q_{6h}^s$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Brzina oslobađanja ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ )	$Q_{6h}^s$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
<b>S-BA</b>	179,5 $\pm$ 15,7 <sup>a</sup>	429,1 $\pm$ 28,4 <sup>a</sup>	200,7 $\pm$ 15,0 <sup>a</sup>	549,6 $\pm$ 25,9 <sup>a</sup>
<b>S-IpaA</b>	143,5 $\pm$ 7,2	323,1 $\pm$ 27,4	172,6 $\pm$ 14,9	459,5 $\pm$ 30,5
<b>S-GlyA</b>	156,3 $\pm$ 12,1	362,1 $\pm$ 25,8	175,4 $\pm$ 11,5	468,2 $\pm$ 27,4
<b>R-A</b>	103,9 $\pm$ 13,4 <sup>b</sup>	253,6 $\pm$ 27,5 <sup>b</sup>	127,5 $\pm$ 10,2 <sup>b</sup>	338,0 $\pm$ 19,7 <sup>b</sup>

\*  $Q_{6h}$  – ukupna količina aceklofenaka oslobođena na kraju eksperimenata (nakon 6h od početka ispitivanja); <sup>a</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa S-IpaA, S-GlyA i R-A; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa S-BA, S-IpaA i S-GlyA

Na kraju, interesantno je napomenuti da su brzina oslobađanja i ukupna količina oslobođenog aceklofenaka iz svih ispitivanih formulacija nanoemulzija bile statistički značajno veće u odnosu na mikrostrukturirane emulzione sisteme izrađene suspendovanjem aceklofenaka u odgovarajuće podloge. Uočena razlika bi se mogla prevashodno pripisati izrazito maloj veličini kapi nanoemulzija, koja obezbeđuje visok odnos površine i zapremine kapi (engl. *surface to volume ratio*), i posledično, bolje oslobađanje aceklofenaka u odnosu na

odgovarajuće mikrostrukturirane emulzione sisteme. S obzirom na značajne razlike u sastavu, mikrostrukturi i in vitro oslobađanju aceklofenaka između ispitivanih sistema, kao i među razvijenim formulacijama u okviru svakog od sistema (Shah i sar., 2015; EMA, 2018), dalje studije bazirane na primeni biološki relevantnih modela su bile neophodne kako bi se procenio efekat ispitivanih nosača na isporuku aceklofenaka u/kroz kožu.

#### **4.3.2 Procena dermalne raspoloživosti *tape stripping* metodom**

##### **4.3.2.1 Razvoj protokola *tape stripping* metode na koži uha svinje**

Aceklofenak oslobođen iz nosača primenjenog na površini kože, prvo mora da penetrira kroz SC, kao primarnu barijeru za difuziju lekovitih supstanci u/kroz kožu. Polazeći od pretpostavke da razlike u brzini i obimu isporuke lekovite supstance na mestu delovanja, u dubljim delovima kože i/ili sistemske cirkulaciji, potiču od razlika u koncentracionim profilima u SC (Raney i sar., 2015), u narednom delu ove faze istraživanja, biofarmaceutska karakterizacija uzoraka razvijenih tokom prve i druge faze eksperimentalnog rada nastavljena je analizom penetracionih profila primenom *tape stripping* metode. Iako je *tape stripping* minimalno invazivna metoda i pogodna za sprovođenje in vivo, na humanim dobrovoljcima, tokom razvoja unapređenih/inovativnih formulacija sa dobro poznatim lekovitim supstancama, i posebno, tokom razvoja preparata sa novim hemijskim entitetima, javlja se potreba za pojednostavljenjem protokola, pre svega u pogledu izbegavanja pripreme obimne dokumentacije neophodne za dobijanje odobrenja od strane Etičkog komiteta (Klang i sar., 2012b). Kao rezultat, tokom nekoliko poslednjih godina, uočava se sve veće interesovanje za razvojem metode, koja bi se mogla rutinski koristiti u in vitro uslovima. Iako se izolovana humana koža smatra „zlatnim standardom“ u ispitivanju permeacije lekovitih supstanci in vitro, koža uha svinje je značajno pogodnija za in vitro *tape stripping*. Prvo, primena humane kože je često udružena sa veoma visokom varijabilnošću, usled značajnih razlika u karakteristikama kože između polova, rasa, godina ili anatomskeg mesta sa kojeg je uzorak uzet (Flaten i sar., 2015). Za razliku od isečaka humane kože koji se kontrahuju odmah nakon izolovanja sa donora, koža uha svinje ostaje na hrskavici koja sprečava zatvaranje folikula dlake koje je karakteristično za izolovanu humanu kožu (Lademann i sar., 2010). Takođe, prisustvo hrskavice doprinosi odlaganju neizbežne dehidracije kože (Klang i sar., 2012b). Histološkom analizom potvrđene su brojne sličnosti kože uha svinje sa humanom kožom. Debljina SC kože uha svinje je uobičajeno u opsegu 17–28 µm (Jacobi i sar., 2007) odnosno

12–18  $\mu\text{m}$  (Carrer i sar., 2008), dok je debljina vijabilnog epidermisa 60–85  $\mu\text{m}$  (uključujući *rete ridges* 151–176  $\mu\text{m}$ ) (Jacobi i sar., 2007), odnosno 30–85  $\mu\text{m}$  (Carrer i sar., 2008). Slično, debljina SC humane kože je u opsegu 6–19  $\mu\text{m}$  (u zavisnosti od mesta na telu), a debljina vijabilnog epidermisa od oko 70  $\mu\text{m}$  (rame) do 82  $\mu\text{m}$  (zadnjica). Prosečna debljina dermisa kože uha svinje je približno 1,86 mm, dok je u slučaju humane kože, najveća debljina dermisa uočena na leđima (1,8–1,9 mm) (ostali delovi tela približno 1 mm) (Jacobi i sar., 2007). Dalje, prosečno 20 dlaka je uočeno na 1  $\text{cm}^2$  kože uha svinje, dok kod ljudi, broj velus dlaka je obično 14–32 po 1  $\text{cm}^2$  (Carrer i sar., 2008; Jacobi i sar., 2007). Prosečan dijametar dlake kože uha svinje je 82  $\mu\text{m}$ , dok je dijametar velus dlaka na telu uglavnom u opsegu 16–18  $\mu\text{m}$ , sa izuzetkom intermedijarnih folikula na butini (29  $\mu\text{m}$ ) i listu (42  $\mu\text{m}$ ). Stoga, jasno se vidi da je dijametar dlake kože uha svinje značajno veći u odnosu na dijametar humanih velus i intermedijarnih dlaka, ali je sličan debljini humanih terminalnih dlaka (57–68  $\mu\text{m}$ ). Interesantno, dlake se protežu u dermis kože uha svinje do dubine od približno 1,2 mm, a humane velus dlake, do dubine 1 mm (Jacobi i sar., 2007).

S obzirom da *tape stripping* podrazumeva uklanjanje slojeva SC, važno je naglasiti da su, za razliku od humane kože, korneociti organizovani u poligonalne klastere ili kolone (obuhvataju ceo epidermis), između kojih se nalaze interklasterni regioni ili „kanjoni“. Rastojanje između klastera (paralelno sa površinom kože) varira između 100 i 250  $\mu\text{m}$ . Klasteri sadrže 15 do 30 ćelija u SC, odnosno od 150 do 300 ćelija u blizini bazalne membrane. Na površini kože, interklasterni regioni počinju kao male bore, dok se dublje u koži, bore zatvaraju i zamenjuju „kanjonima“. Posmatranjem poprečnog preseka, „kanjoni“ izgledaju kao invaginacije SC u tkivo (Carrer i sar., 2008). Sa druge strane, nisu uočene značajne razlike između humane kože i kože uha svinje u vaskularnoj anatomiji, organizaciji kolagenih i elastičnih vlakana u dermisu, kao i sadržaju glikofosfolipida i ceramida (Godin i Touitou, 2007). Međutim, treba naglasiti da samo središnji deo dorzalne strane kože uha svinje predstavlja dobar model za humanu kožu. Strukturne karakteristike ostalih delova uha (posebno uz ivicu) se obično značajno razlikuju od humane kože, jer zavise od uslova gajenja svinja, rase i načina ishrane, te nisu pogodne za primenu u dermatološkim ispitivanjima (Meyer i sar., 2007).



**Slika 4.3.3.** Region A – deo dorzalne strane uha svinje koji se smatra optimalnim za primenu u dermatološkim ispitivanjima (prilagođeno prema Meyer i sar., 2007)

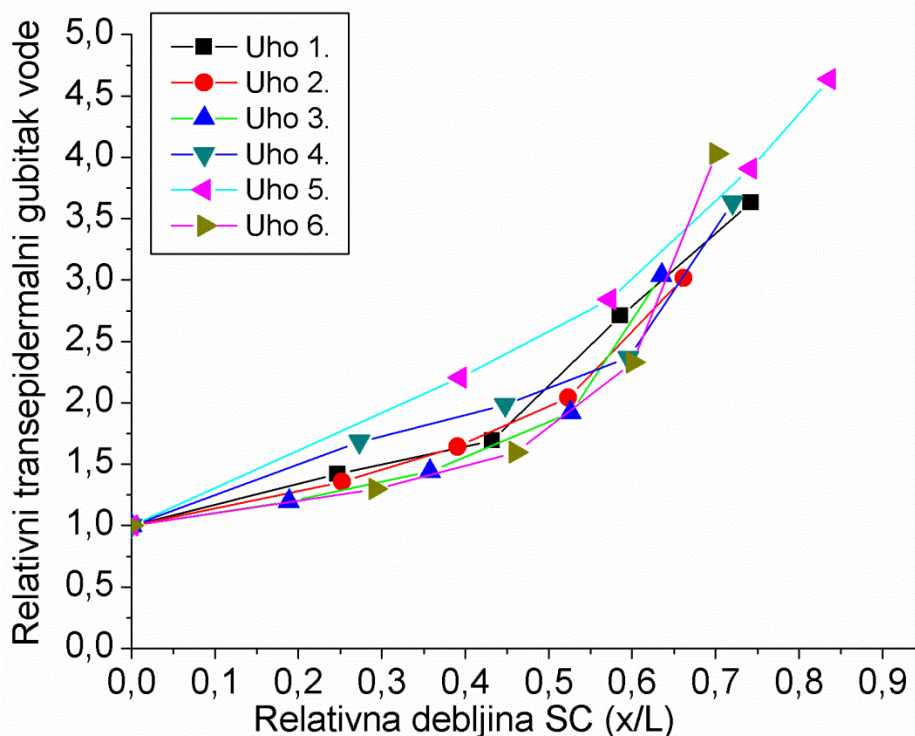
Važno je istaći da se *tape stripping*-om na koži uha svinje trenutno bavi svega nekoliko istraživačkih grupa u svetu, i da nema jasno definisanog protokola za njegovo sprovođenje. Sprovedene studije ukazale su da na dobijene rezultate u značajnoj meri mogu uticati brojni faktori: starost i rasa svinje, anatomski deo uha na kome se vrši ispitivanje, uslovi i dužina čuvanja svinjskih ušiju, način pripreme ušiju za rad, način aplikovanja i količina uzorka, vrsta adhezivnih traka za uklanjanje SC, broj traka koji se sakuplja i način njihovog uklanjanja, pritisak koji se vrši na adhezivnu traku, način određivanja uklonjenih slojeva SC, uslovi postupka ekstrakcije (Nagelreiter i sar., 2015; Raber i sar., 2014; Sekkat i sar., 2002). Stoga, tokom razvoja protokola *tape stripping* metode na koži uha svinje, posebna pažnja je fokusirana na definisanje faktora koji mogu u značajnom stepenu da utiču na dobijene rezultate.

Nesumnjivo je da uslovi i dužina čuvanja svinjskih ušiju, kao i način pripreme kože pre početka eksperimenta mogu da utiču na permeabilnost. Pregledom literature uočava se da se *tape stripping* može sprovoditi na svežim ušima (npr. Herkenne i sar., 2006), ali i na ušima čuvanim na  $-20^{\circ}\text{C}$  (tokom različitog perioda) i odmrznutim na sobnoj temperaturi neposredno pred početak eksperimenata (Klang i sar., 2012b). Međutim, treba imati na umu da su podaci o uticaju smrzavanja/odmrzavanja na integritet kožne barijere i posledično na penetraciju različitih lekovitih supstanci u kožu prilično kontraverzni. Određen broj autora smatra da nema razlike u permeabilnosti između svežih ušiju i ušiju podvrgnutih ciklusu smrzavanja/odmrzavanja, te se iz praktičnih razloga, preporučuje čuvanje ušiju u zamrzivaču na  $-20^{\circ}\text{C}$  (Flaten i sar., 2015; Klang i sar., 2012b). Sa druge strane, određene studije ukazuju

da čuvanje u zamrzivaču narušava strukturu vodenih pora u lipidnim dvoslojevima kože (što ih čini permeabilnijim za difuziju vode), bez uticaja na strukturu lipidnih delova SC (Abdayem i sar., 2015; Sintov i Botner, 2006). Kao rezultat, uočeno je da lekovite supstance iz grupe NSAID značajno efikasnije penetriraju u kožu podvrgnutu ciklusu smrzavanja/odmrzavanja iz hidrofilnih nosača u odnosu na lipofilne nosače (Sintov i Botner, 2006). Stoga, u cilju definisanja optimalnih uslova i dužine čuvanja svinjskih ušiju, neophodno je pratiti eventualnu promenu integriteta kožne barijere tokom produženog perioda čuvanja.

Kao što je već naglašeno, merenje TEGV je često korišćen metod za procenu barijerne funkcije SC in vivo, na humanim dobrovoljcima. Takođe, određeni autori predlažu merenje TEGV u in vitro uslovima, kako bi se (i) isključili delovi sa narušenom barijernom funkcijom kože, (ii) pratio proces odmrzavanja kože i (iii) standardizovao protokol za sprovođenje *tape stripping* metode (vrednost TEGV od 10 do 20 g m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> se smatra pogodnom za otpočinjanje eksperimenta) (Klang i sar., 2012b). Opet, važno je naglasiti, da su literaturni podaci vezani za primenu TEGV merenja u in vitro uslovima za procenu integriteta kožne barijere prilično kontradiktorni. Na primer, Netzlaff i sar. (2006) su uočili da se merenjem TEGV mogu detekovati isključivo značajna oštećenja izolovanog epidermisa in vitro, prouzrokovana uklanjanjem 15 adhezivnih traka (blaža oštećenja kože, izazvana primenom 3 – 7 adhezivnih traka, nisu detektovana merenjem TEGV). Sa druge strane, Sekkat i sar. (2002) su utvrdili da rezultati merenja TEGV tokom sukcesivnog uklanjanja slojeva SC kože uha svinje primenom adhezivnih traka u potpunosti koreliraju sa rezultatima dobijenim in vivo, na humanim dobrovoljcima, što potvrđuje mogućnost primene ove metodologije u proceni integriteta kožne barijere. Međutim, važno je naglasiti da je ova studija sprovedena na svežim ušima dobijenim neposredno nakon žrtvovanja svinje. Generalno su oskudni literaturni podaci o mogućnosti primene merenja TEGV za procenu integriteta kože uha svinje čuvane u zamrzivaču, pre svega zbog potencijalno negativnog uticaja temperature ušiju nakon odmrzavanja. Stoga, prvo su sprovedena merenja TEGV inicijalno, nakon odmrzavanja ušiju čuvanih u zamrzivaču maksimalno tokom mesec dana (radi detekcije vrednosti TEGV od 10 do 20 g m<sup>-2</sup>h<sup>-1</sup> za otpočinjanje eksperimenta), kao i nakon 4., 8., 12. i 15. uklonjene adhezivne trake, kako bi se utvrdila mogućnost primene TEGV u proceni integriteta kožne barijere, kao i izračunavanju tzv. normalizovane (standardizovane) vrednosti debljine uklonjenog sloja SC radi poređenja rezultata dobijenih na različitim ušima (smanjenje uticaja inter- i intra-individualnih varijacija) (videti ispod).





**Slika 4.3.4.** Relativni TEGV (izmerena vrednost TEGV podeljena inicijalno izmerenom vrednošću, pre *tape stripping* procedure) u funkciji udela debljine uklonjenog sloja SC u odnosu na ukupnu debljinu SC. Eksperimentalni podaci su dobijeni sa 6 različitih ušiju domaće bele svinje (starosti približno 4-6 meseci)

Kao što se može videti sa slike 4.3.4, TEGV se postepeno povećava sa sukcesivnim uklanjanjem slojeva SC adhezivnim trakama. Tokom uklanjanja približno 40% SC, beleži se blag porast TEGV, koji se nakon uklanjanja 50% SC, značajno povećava. Uklanjanje najvećeg dela SC (75-90%) praćeno je značajnim porastom vrednosti TEGV (4-5 puta). Treba obratiti pažnju da je na slici 4.3.4 predstavljen relativni TEGV (izmerena vrednost TEGV podeljena inicijalno izmerenom vrednošću, pre *tape stripping* procedure) u funkciji udela debljine uklonjenog sloja SC u odnosu na ukupnu debljinu SC (relativna/normalizovana vrednost debljine SC). Prilikom izračunavanja debljine uklonjenog sloja SC, odnosno ukupne debljine SC, primenjen je sledeći postupak, koji se uz minimalne modifikacije, koristi prilikom odgovarajućih proračuna na humanoj koži (Pantelić, 2013).

Masa uklonjenog sloja SC kože uha svinje tokom *tape stripping* procedure izračunata je na osnovu razlike mase svake adhezivne trake pre ( $m_1$ ) i posle primene ( $m_2$ ):

$$m = m_2 - m_1 \quad (4.3.1)$$

Potom, masa uklonjenog sloja SC ( $\mu\text{g}$ ) je prevedena jednostavno u debljinu uklonjenog sloja SC,  $x$  ( $\mu\text{m}$ ) primenom jednačine:

$$x = \frac{m}{P * \rho} \quad (4.3.2)$$

pri čemu je  $P$  površina adhezivne trake izražena u  $\mu\text{m}^2$ , a  $\rho$  aproksimacija gustine SC kože uha svinje ( $\rho = 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{m}^3$ ) (Sekkat i sar., 2002).

Analogno humanoj koži, polazeći od pretpostavke da SC predstavlja homogenu barijeru za difuziju vode, relativna/ukupna debljina SC,  $L$ , izračunata je na osnovu prvog Fick-ovog zakona difuzije koji opisuje promenu TEGV kroz SC (Sekkat i sar., 2002):

$$TEGV_0 = \frac{K * D * \Delta C}{L} \quad (4.3.3)$$

gde je  $TEGV_0$  bazalna vrednost TEGV (vrednost TEGV za započinjanje eksperimenata),  $K$  SC-vijabilno tkivo particioni koeficijent vode,  $D$  difuzioni koeficijent vode,  $\Delta C$  koncentracioni gradijent vode kroz SC, a  $L$  ukupna debljina SC.

Kada se primenom adhezivnih traka ukloni sloj SC određene debljine ( $x$ ), vrednost TEGV raste do  $TEGV_x$ :

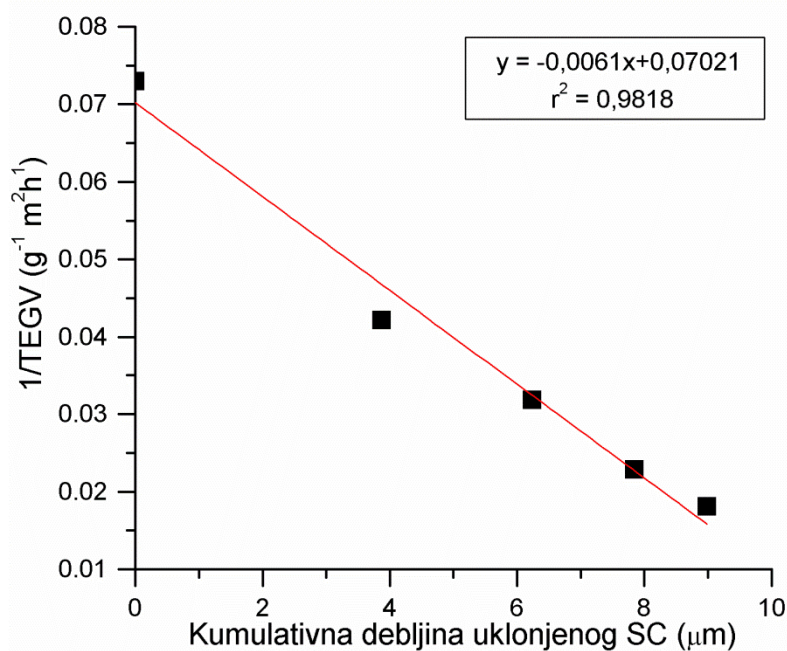
$$TEGV_x = \frac{K * D * \Delta C}{(L - x)} \quad (4.3.4)$$

Transformacijom jednačine 4.3.4 u jednačinu 4.3.5 i linearnom regresionom analizom dobijenih rezultata (slika 4.3.5), izračunata je, uz zadovoljavajući koeficijent korelacije ( $R^2 > 0,90$ ) ukupna debljina SC:

$$\frac{1}{TEGV_x} = \frac{L}{D * K * \Delta C} - \frac{x}{D * K * \Delta C} \quad (4.3.5)$$

Konačno, važno je istaći da su grafici zavisnosti  $1/TEGV$  u funkciji debljine uklonjenog SC ( $x$ ) bili linearni (srednja vrednost  $r^2$  za 6 ušiju je iznosila 0,9723 ), sa zadovoljavajućom reproducibilnošću između različitih ušiju (slika 4.3.5). Prosečna ukupna debljina SC ( $L$ )

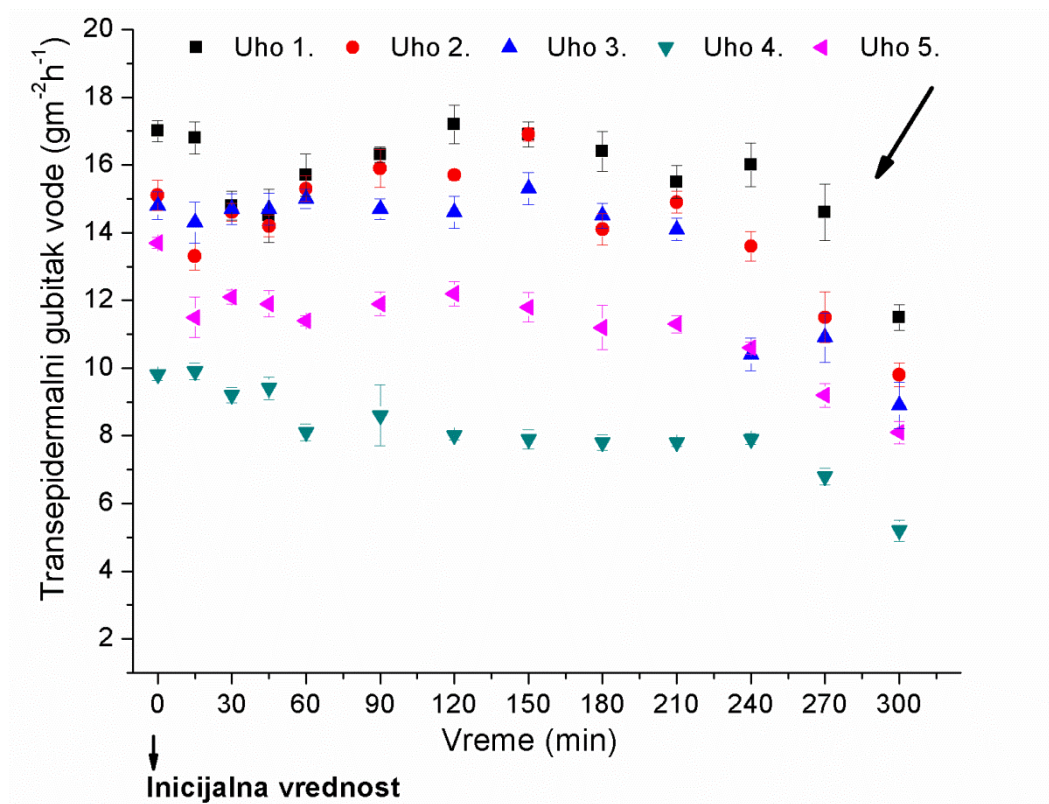
određena na ovaj način na šest ušiju iznosila je  $10,9 \pm 3,2 \mu\text{m}$ , što je u skladu sa literaturnim vrednostima za debljinu SC svežih ušiju ( $11,8 \pm 4,0 \mu\text{m}$ ) (Herkenne i sar., 2006; Sekkat i sar., 2002). Na osnovu navedenog, može se zaključiti da uprkos odsustvu metaboličke aktivnosti i cirkulacije, merenje TEGV može da ukaže na barijernu funkciju kože uha svinje. Takođe, dobijeni rezultati jasno ukazuju da čuvanje svinjskih ušiju na temperaturi  $-20^\circ\text{C}$  tokom jednog meseca, kao i odmrzavanje na sobnoj temperaturi, ne utiču na integritet kožne barijere. Međutim, važno je napomenuti da je primena opisanog protokola na ušima čuvanim tokom tri meseca u zamrzivaču, ukazala na određeno odstupanje od linearnosti grafika zavisnosti  $1/\text{TEGV}$  od debljine uklonjenog SC (srednja vrednost  $r^2$  za 6 ušiju je iznosila 0,8217), verovatno usled promena u barijernim karakteristikama kože tokom produženog čuvanja. Kao zaključak sprovedenih ispitivanja, može se izdvojiti da uši domaće svinje treba čuvati najduže mesec dana u zamrzivaču, na temperaturi  $-20^\circ\text{C}$ , pre početka eksperimenata.



**Slika 4.3.5.** Grafički prikaz izračunavanja ukupne debljine SC linearnom regresionom analizom zavisnosti recipročne vrednosti TEGV od kumulativne debljine uklonjenog SC, na primeru jednog uha

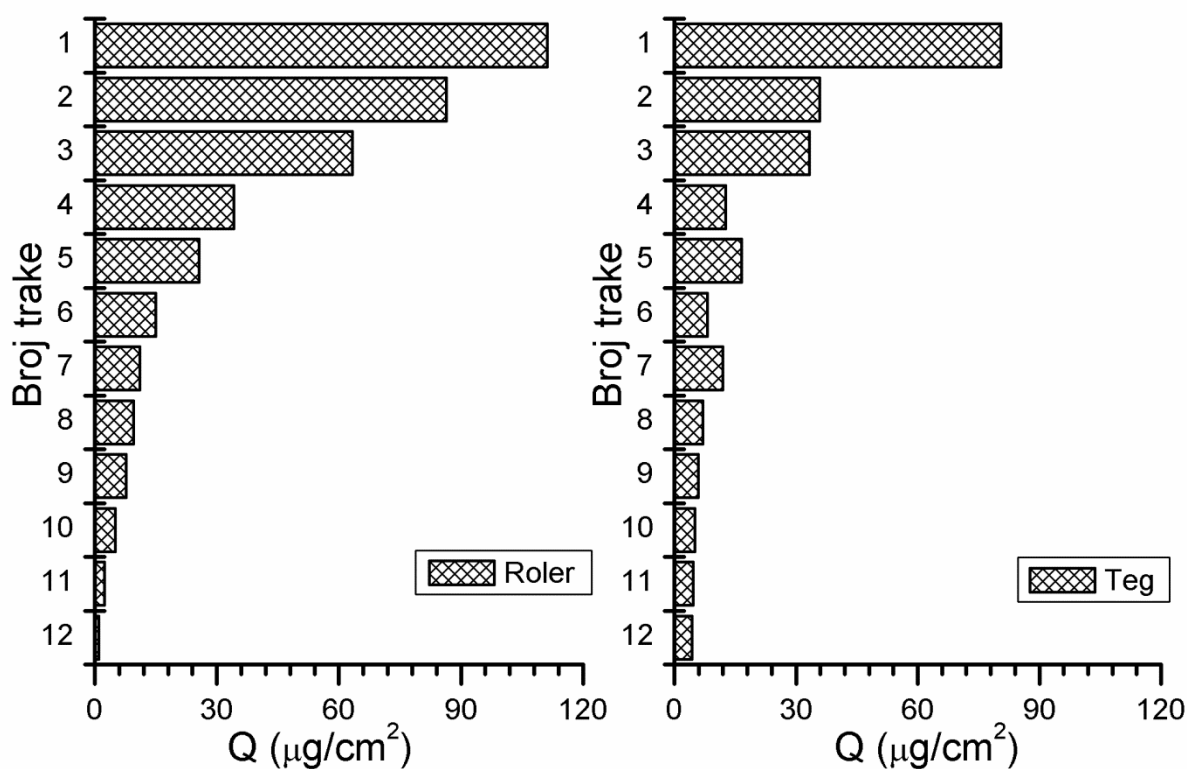
U studijama koje imaju za cilj procenu dermalne raspoloživosti lekovite supstance primenom *tape stripping* metode, između ostalog, neophodno je definisati vreme kontakta kože sa ispitivanom formulacijom. Iako, generalno, vreme kontakta zavisi od farmakokinetičkog profila ispitivane lekovite supstance (Pantelić, 2013), u slučaju *tape stripping*-a na koži uha svinje, dodatno treba imati na umu da produženo čuvanje svinjskih ušiju na sobnoj

temperaturi, usled odsustva cirkulacije, neizbežno dovodi do dehidracije tkiva tokom eksperimenta. Suviše kratko vreme aplikacije uzoraka može da dovede do lažno niskih penetracionih profila lekovite supstance, što ne odgovara in vivo uslovima. Produženo vreme kontakta, sa druge strane, može podstaći nefiziološku dehidraciju tkiva i bočno širenje (engl., *lateral spreading*). Smanjenje stepena hidratisanosti kože, praćeno smanjenjem vrednosti TEGV, može za posledicu imati smanjenje difuzije lekovite supstance u/kroz kožu, čime se poništava pozitivan efekat dužeg perioda aplikacije (Klang i sar., 2012b). Stoga, praćena je promena vrednosti TEGV tokom 5h čuvanja ušiju na sobnoj temperaturi (slika 4.3.6). Utvrđeno je da se vrednost TEGV značajno smanjuje nakon 4h od momenta postizanja tačke pogodne za otpočinjanje eksperimenta (vrednost TEGV u opsegu  $10 - 20 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ). Na osnovu navedenog može se zaključiti da dužinu trajanja eksperimenta treba ograničiti na maksimalno 4h. Zapravo, izolovano uho svinje je dobar model za humanu kožu u kratkoročnim studijama, dok se smatra manje pogodnim za duže periode aplikacije, posebno u slučaju visoko lipofilnih lekovitih supstanci (sink uslovi se ne mogu postići usled nedostatka kožne cirkulacije, što za posledicu ima smanjenje penetracije lekovite supstance u kožu) (Klang i sar., 2012b).



**Slika 4.3.6.** Promena vrednosti transepidermalnog gubitka vode kože uha svinje tokom 5h od postizanja vrednosti pogodne za otpočinjanje eksperimenta

Na kraju, tokom razvoja metode, uočeno je da pritisak koji se vrši na adhezivnu traku tokom *tape stripping*-a, može biti značajan izvor varijabilnosti, jer određuje masu uklonjenog SC svakom trakom. U literaturi su opisani različiti načini vršenja pritiska, kao što je pritisak prsta, roler, teg konstantne mase, uređaj na bazi opruge i slično. Pritisak prsta je najmanje pogodan, jer je teško obezbediti adekvatnu reproducibilnost prilikom aplikacije. Stoga, na slici 4.3.7 predstavljeni su penetracioni profili aceklofenaka (količina aceklofenaka po jedinici površine svake uklonjene adhezivne trake), dobijeni variranjem dizajna uređaja za vršenje pritiska na adhezivnu traku tokom *tape stripping* procedure (pritisak rolera vs. pritisak tega identične mase 300 g).



**Slika 4.3.7.** Količina aceklofenaka po jedinici površine svake od 12 uklonjenih adhezivnih traka, određena variranjem dizajna uređaja za vršenje pritiska tokom *tape stripping* procedure na koži uha svinje (pritisak rolera vs. pritisak tega)

Dobijeni rezultati jasno ukazuju da je značajno veća količina aceklofenaka ekstrahovana iz SC nakon primene rolera, uz jasan trend opadanja količine aceklofenaka sa povećanjem broja uklonjenih adhezivnih traka. Merenjem TEGV uočeno je da se vrednost ovog biofizičkog parametra, u oba ispitivana slučaja, postepeno povećava tokom sukcesivnog narušavanja barijerne funkcije SC, ali je značajnije povećanje uočeno nakon primene pritiska rolera

(vrednost TEGV nakon 12. trake na koju je izvršen pritisak rolera, odnosno tega iznosila je  $54,1 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  odnosno  $37,2 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , respektivno). Navedena zapažanja bila su u potpunosti u skladu sa rezultatima gravimetrijske analize, koja je potvrdila da se veća masa (debljina) SC kože uha svinje uklanja nakon primene pritiska rolera na adhezivnu traku. Imajući na umu sprovedena ispitivanja in vivo, na humanim dobrovoljcima (Breternitz i sar., 2007), može se zaključiti da i u in vitro uslovima primena rolera obezbeđuje bolji kontakt adhezivne trake sa površinom kože u odnosu na teg. Tokom prevlačenje rolera po koži uha svinje, koža se rasteže, prisutne bore i brazde nestaju, što za posledicu ima ravnanje površine kože tokom kontakta sa adhezivnom trakom. Drugim rečima, primena rolera omogućava uklanjanje korneocita u brazdama i borama na površini kože uha svinje. Za razliku od rolera, primenom tega ne mogu se efikasno ukloniti ovi delovi SC na početku *tape stripping* procedure, već kasnije, sa povećanjem broja uklonjenih adhezivnih traka (na slici 4.3.7 jasno se može uočiti veći sadržaj aceklofenaka u poslednjim trakama pod pritiskom tega). Na osnovu navedenog, može se zaključiti da je roler, uređaj izbora za vršenje pritiska na adhezivnu traku, u cilju efikasnog i reproducibilnog uklanjanja SC.

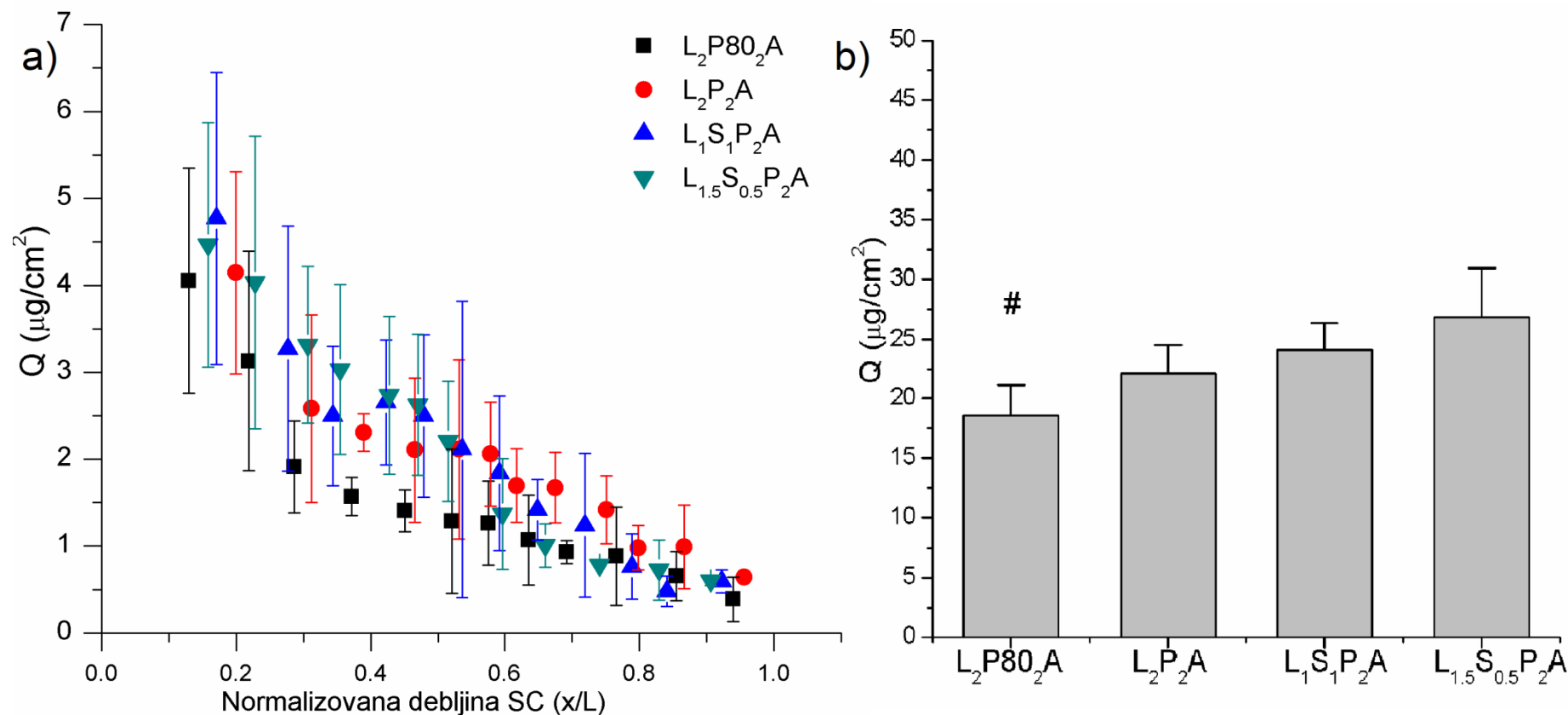
Takođe, kako sam postupak ekstrakcije lekovite supstance iz adhezivnih traka uklonjenih sa površine kože uha svinje može biti značajan izvor varijabilnosti, tokom razvoja metode ispitivana je mogućnost primene protokola razvijenog od strane Pantelić (2013) za ekstrakciju model lekovitih supstanci iz adhezivnih traka uklonjenih sa humanih dobrovoljaca. Naime, etanolni rastvor aceklofenaka poznate koncentracije ( $10 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ) nanet je na trake uklonjene sa površine netretirane kože uha svinje. Po isparavanju etanola, primenjen je prethodno opisan postupak ekstrakcije (uključujući sonikaciju tokom 15 min i centrifugiranje pri 4000 rpm tokom 5 min), pri čemu su dobijeni bistri eluati, pogodni za određivanje sadržaja opisanom UHPLC-MS/MS metodom. Dobijene su visoke vrednosti *recovery*-ja ( $95,8 \pm 2,9\%$ ), što potvrđuje pogodnost opisanog protokola za ekstrakciju aceklofenaka iz adhezivnih traka, uprkos prisustvu slojeva SC kože uha svinje.

#### **4.3.2.2 In vitro vs. in vivo *tape stripping* u proceni dermalne raspoloživosti aceklofenaka iz nanoemulzija – *infinite dose* uslovi**

*Tape stripping* na koži uha svinje razvijenog protokola inicijalno je korišćen za ispitivanje penetracionih profila aceklofenaka iz nanoemulzija opisanih u okviru prve faze eksperimentalnog rada, uključujući i referentni uzorak ( $\text{L}_2\text{P80}_2\text{A}$ ), stabilizovan smešom lecitina (2%) i polisorbata 80 (2%). Ispitivanje je sprovedeno pod *infinite dose* uslovima,

primenom količine uzoraka koja značajno prevazilazi količinu koja bi se primenjivala u realnim uslovima, od strane pacijenata. U slučaju primene male količine ispitivanih formulacija ( $\leq 10 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ , Selzer i sar., 2013), može doći do brojnih fizičkih promena u samom nosaču nakon primene na kožu, što dodatno utiče na penetraciju lekovitih supstanci u kožu. Stoga, kako je cilj in vitro *tape stripping* studije, između ostalog, bio da se proceni da li je razvijeni protokol dovoljno diskriminatoran da ukaže na potencijalne razlike u efikasnosti nanoemulzija različitog sastava međupovršinskog filma, primena *finite dose* uslova bi dodatno komplikovala poređenje dobijenih rezultata.

Analizom dobijenih penetracionih profila (slika 4.3.8), primećena je prilično velika interindividualna varijabilnost u pogledu sadržaja aceklofenaka duž SC kod svih ispitivanih formulacija. Ipak, uočen je jasan trend povećanja količine aceklofenaka u SC iz razvijenih nanoemulzija na bazi saharoznih estara u odnosu na referentni uzorak, pri čemu je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) detektovana samo između  $L_{1,5}S_{0,5}P_2A$  i  $L_2P_{80}A$  formulacije. Dodatno, na osnovu prosečne količine aceklofenaka koja je penetrirala u SC, razvijene nanoemulzije mogu se grupisati na sledeći način:  $L_2P_2A < L_1S_1P_2A < L_{1,5}S_{0,5}P_2A$ . Međutim, važno je napomenuti da nije detektovana statistički značajna razlika između razvijenih formulacija (uprkos razlikama u sastavu smeše surfaktanata), verovatno kao posledica velike interindividualne varijabilnosti koja je maskirala eventualno prisutne razlike. Nesumnjivo je da rezultati dobijeni in vitro, primenom *tape stripping* metode na koži uha svinje, ukazuju na potencijal saharoznih estara da poboljšaju penetraciju aceklofenaka u SC. Svakako, odgovarajuće in vivo studije su bile neophodne, kako bi se potvrdili nalazi dobijeni in vitro, odnosno, procenila pogodnost razvijenog protokola za sprovođenje komparativnih studija namenjenih proceni penetracije lekovite supstance u SC iz različitih nosača.



**Slika 4.3.8** a) Komparativni prikaz penetracionih profila aceklofenaka iz odabranih optimalnih nanoemulzija na bazi saharoznih estara (L<sub>2</sub>P<sub>2</sub>A, L<sub>1</sub>S<sub>1</sub>P<sub>2</sub>A, L<sub>1.5</sub>S<sub>0.5</sub>P<sub>2</sub>A) i referentne nanoemulzije kostabilizovane polisorbitom 80 (L<sub>2</sub>P80<sub>2</sub>A) dobijenih primenom *tape stripping* metode na koži uha svinje, 2h nakon aplikacije ispitivanih formulacija, pri *infinite dose* uslovima, b) ukupna količina aceklofenaka koja je penetrirala u SC (debljine L); # p < 0,05 u poređenju sa, L<sub>1.5</sub>S<sub>0.5</sub>P<sub>2</sub>A formulacijom. Rezultati predstavljaju srednju vrednost ± SD (n=4)

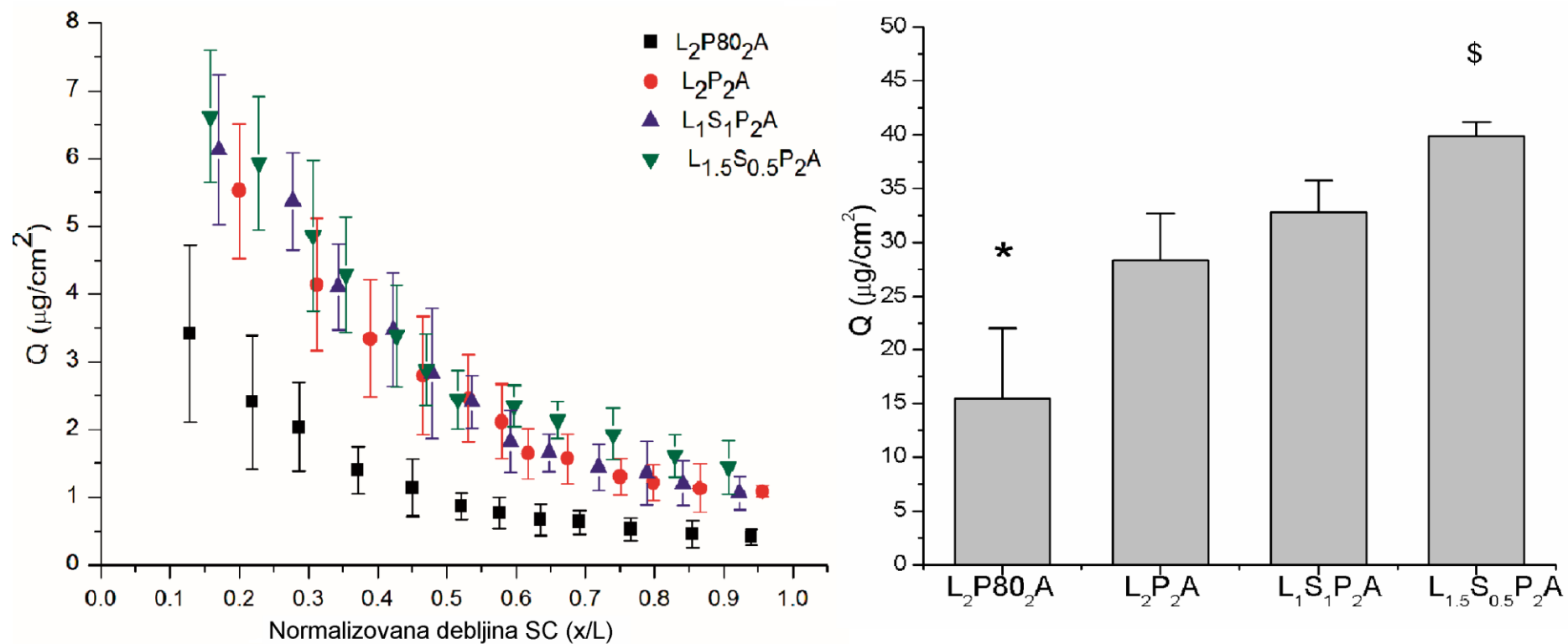


Penetracioni profili aceklofenaka dobijeni in vivo, na humanim dobrovoljcima, 2h nakon primene ispitivanih uzoraka nanoemulzija pri *infinite dose* uslovima, predstavljeni su na slici 4.3.9. Iako *steady state* nije postignut tokom odabranog perioda vremena, rezultati dobijeni in vivo nedvosmisleno potvrđuju rezultate dobijene in vitro – formulacije nanoemulzija na bazi saharoznih estara značajno su povećale penetraciju aceklofenaka u SC (statistički značajno veći sadržaj aceklofenaka u svim slojevima SC) u odnosu na referenti uzorak. Ovi nalazi su bili prilično neočekivani, imajući na umu studiju publikovanu od strane Hoeller i sar. (2009), koja je pokazala da se primenom lecitinskih nanoemulzija sa polisorbatom 80 kao koemulgatorom postiže značajno poboljšanje u isporuci fludrokortizon acetata kroz kožu, u poređenju sa nanoemulzijom kostabilizovanom primenom saharoza laurata. Uočena razlika se ne može pripisati jednostavno različitim saharoznim estrima korišćenim za izradu nanoemulzija, jer, štaviše, postoje određeni dokazi koji ukazuju da su saharozni estri sa kraćim lancem masne kiseline (npr. saharoza laurat) efikasniji kao penetracioni inhenseri u odnosu na saharozne estre sa dužim lancem (npr. SP, SS) (Csóka i sar., 2007). Svakako, treba imati na umu da efekat saharoznih estara zavisi od brojnih faktora, kao što je primenjena koncentracija, karakteristike lekovite supstance i nosača, mesto primene, kao i eksperimentalni uslovi (Ganem-Quintanar i sar., 1998). U tom smislu, važno je istaći da je studija Hoeller i sar. (2009) sprovedena primenom Franz-ovih difuzionih ćelija i abdominalne kože svinje, te do sada, potencijal SP i njegove smeše sa SS u poboljšanju isporuke aceklofenaka u/kroz kožu, primenom *tape stripping* metode, nije ispitivan. Dobijeni rezultati su delimično podržani studijom Nakada i sar. (1988), koja je pokazala da je SP efikasniji od saharoza laurata i ostalih ispitivanih saharoznih estara u povećanju apsorpcije humanog kalcitonina kroz oralnu mukozu pacova in vivo.

Međutim, iako je potvrđeno da saharozni estri povećavaju permeabilnost kože, zahvaljujući sposobnosti da ekstrahuju i/ili fluidizuju lipidne delove kože (Ayala-Bravo i sar., 2003), uočeno povećanje penetracije aceklofenaka u SC ne može se pripisati isključivo saharoznim estrima, jer fosfolipidi i same karakteristike sistema (mala veličina, deformabilnost uljanih kapi) mogu da doprinesu konačnom efektu primene razvijenih nanonosaa. Takođe, ne treba zaboraviti ni uočene razlike u brzini oslobađanja aceklofenaka iz razvijenih nanoemulzija. Drugim rečima, najmanja količina aceklofenaka u SC 2h nakon aplikacije referentnog uzorka može biti jednostavno posledica uočene najmanje brzine oslobađanja aceklofenaka. Kao rezultat, mogu se izdvojiti tri mehanizma koja mogu da doprinesu poboljšanju penetracije aceklofenaka iz razvijenih nanoemulzija na bazi saharoznih estara: 1) mala veličina kapi koja obezbeđuje veliku površinu, blizak i produžen kontakt sa kožom, uz istovremeno visok

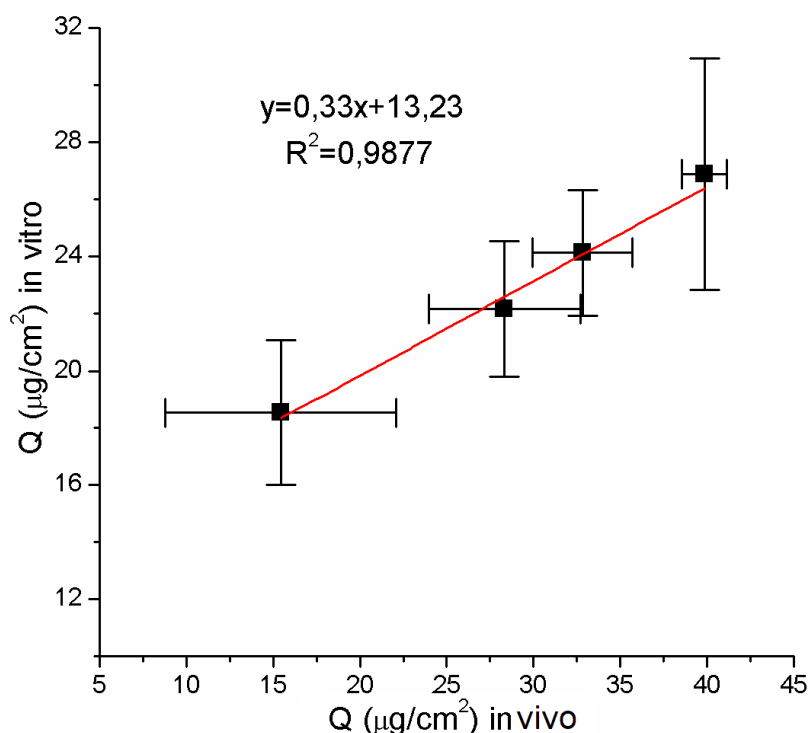
koncentracioni gradijent za difuziju u/kroz kožu, 2) bolje oslobađanje aceklofenaka iz uljanog jezgra, odnosno međusloja koji se sastoji iz fosfolipida iz jajeta i saharoznih estara, kao i 3) narušavanje strukture lipidnog dvosloja SC, kombinacijom fosfolipida i saharoznih estara, kao potencijalnih penetracionih inhensera.

Takođe, uporednom analizom rezultata dobijenih za različite formulacije nanoemulzija na bazi saharoznih estara, potvrđeno je da je najveća količina aceklofenaka penetrirala u SC iz  $L_{1,5}S_{0,5}P_2A$  formulacije ( $39,85 \pm 1,29 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) ( $p < 0,05$ ), zatim iz  $L_1S_1P_2A$  ( $32,84 \pm 2,88 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i na kraju  $L_2P_2A$  ( $28,32 \pm 4,39 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Međutim, rezultati dobijeni primenom *tape stripping* metode nisu bili u potpunosti u skladu sa nalazima in vitro ispitivanja oslobađanja aceklofenaka iz ovih uzoraka ( $L_2P_2A > L_{1,5}S_{0,5}P_2A > L_1S_1P_2A$ ). S obzirom da su sve ispitivane nanoemulzije posedovale slične vrednosti fizičko-hemijskih parametara koji se smatraju ključnim za isporuku lekovite supstance u/kroz kožu (veličinu kapi, zeta potencijal, pH vrednost i viskozitet), logično je pretpostaviti da su interakcije surfaktanata primenjenih za stabilizaciju sa lipidnim strukturama SC, odgovorne za uočene razlike u penetraciji aceklofenaka iz razvijenih nanoemulzija. Naime, najveći stepen penetracije aceklofenaka u SC iz  $L_{1,5}S_{0,5}P_2A$  formulacije mogao bi se potencijalno pripisati maloj količini (0,5%) SS u smeši sa LE80 i SP, koji, čini se, da interaguju sinergistički u modifikaciji barijerne funkcije SC, omogućavajući značajno efikasniju difuziju aceklofenaka u kožu. Drugim rečima, na osnovu dobijenih rezultata moglo bi se pretpostaviti da je SS sa umerenom lipofilnošću (HLB vrednost  $\sim 9$ ) efikasniji kao penetracioni inhenser u odnosu na SP sa visokom HLB vrednošću  $\sim 15$ . Interesantno, povećanje sadržaja SS u smeši ( $L_1S_1P_2A$  formulacija) uslovalo je manju penetraciju aceklofenaka u kožu (ali veću u odnosu na formulaciju bez SS), verovatno usled smanjenja sadržaja lecitina. Kao što je opisano u uvodu, fosfolipidi mogu da povećaju fluidnost lipida kože i tako doprinesu poboljšanju penetracije lekovite supstance u/kroz kožu (Klang i Valenta, 2011). Međutim, treba naglasiti da je brzina oslobađanja aceklofenaka iz  $L_1S_1P_2A$  bila najmanja. Na osnovu navedenog, može se zaključiti da je sastav smeše surfaktanata upotrebljenih za stabilizaciju nanoemulzija ključni faktor odgovoran za razlike u penetracionim profilima aceklofenaka iz razvijenih nanoemulzija.



**Slika 4.3.9** a) Komparativni prikaz penetracionih profila aceklofenaka iz odabranih optimalnih nanoemulzija na bazi saharoznih estara (L<sub>2</sub>P<sub>2</sub>A, L<sub>1</sub>S<sub>1</sub>P<sub>2</sub>A, L<sub>1.5</sub>S<sub>0.5</sub>P<sub>2</sub>A) i referentne nanoemulzije kostabilizovane polisorbatom 80 (L<sub>2</sub>P80<sub>2</sub>A), dobijenih primenom *tape stripping* metode in vivo, na humanim dobrovoljcima, 2h nakon aplikacije ispitivanih formulacija, pri *infinite dose* uslovima; b) ukupna količina aceklofenaka koja je penetrirala u SC (debljine L); # p < 0,05 u poređenju sa svim formulacijama na bazi saharozni estara § p < 0,05 poređenju sa L<sub>2</sub>P<sub>2</sub>A i L<sub>1</sub>S<sub>1</sub>P<sub>2</sub>A formulacijama. Rezultati predstavljaju srednju vrednost ± SD (n=4)

Na kraju, poređenjem rezultata dobijenih *in vitro*, na koži uha svinje, sa rezultatima dobijenim *in vivo*, na humanim dobrovoljcima, može se jasno uočiti da su ispitivanja u *in vitro* uslovima udružena sa većom varijabilnošću, verovatno kao posledica poteškoća u kontrolisanju starosti i pola svinje, kao i načina njihove ishrane. Međutim, treba napomenuti da su vrednosti za dubinu penetracije i ukupnu količinu aceklofenaka koja je penetrirala u SC iz različitih formulacija nanoemulzija bile komparabilne između oba modela. Štaviše, kada je ukupna količina aceklofenaka koja je penetrirala u SC kože uha svinje predstavljena u zavisnosti od ukupne količine aceklofenaka određene u SC humanih dobrovoljaca, uočena je visoka korelacija između dobijenih podataka ( $r^2=0,9877$ ) (slika 3.4.10), što potvrđuje pogodnost kože uha svinje za sprovođenje komparativnih studija čiji je cilj poređenje penetracije leka u kožu iz različitih formulacija. Međutim, važno je napomenuti da regulatorne agencije trenutno ne prihvataju primenu *in vitro* *tape stripping* metode (nije izvesno da će prihvatiti ni u skorijoj budućnosti) u proceni bioekvivalencije preparata za primenu na kožu (Leal i sar., 2017). Svakako, zahvaljujući zadovoljavajućoj korelaciji sa rezultatima dobijenim *in vivo*, *in vitro* *tape stripping* metoda je pogodna tokom razvoja i optimizacije formulacije.

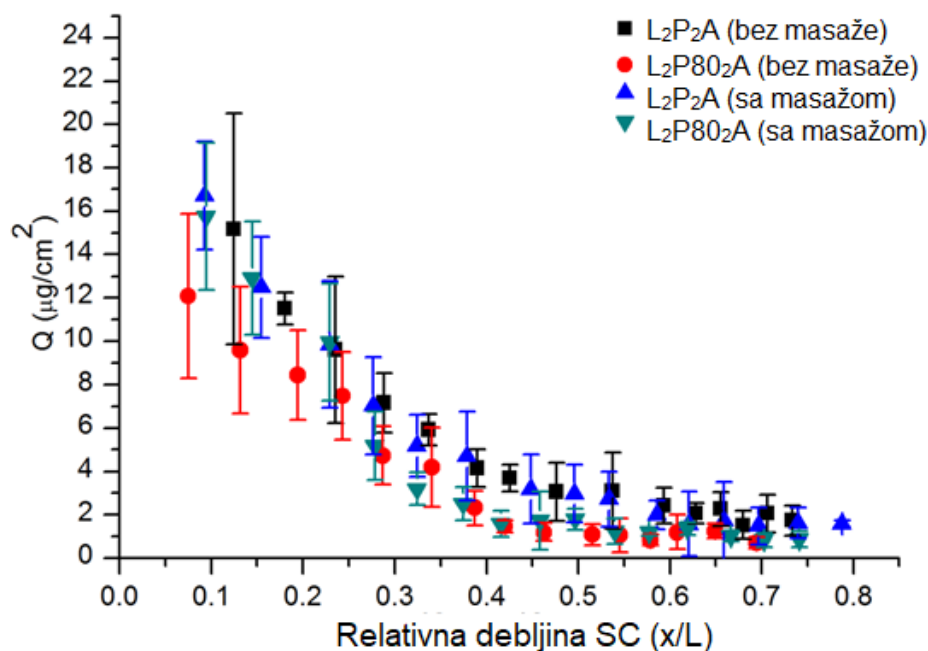


**Slika 4.3.10.** Korelacija ukupne količine aceklofenaka koja je penetrirala u SC kože uha svinje ( $Q$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) *in vitro*) i ukupne količine aceklofenaka prisutne u SC humanih dobrovoljaca ( $Q$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) *in vivo*), 2 h nakon aplikacije ispitivanih formulacija nanoemulzija.

#### 4.3.2.3 In vitro diferencijalni *stripping* u proceni dermalne raspoloživosti aceklofenaka iz nanoemulzija – *finite dose* uslovi

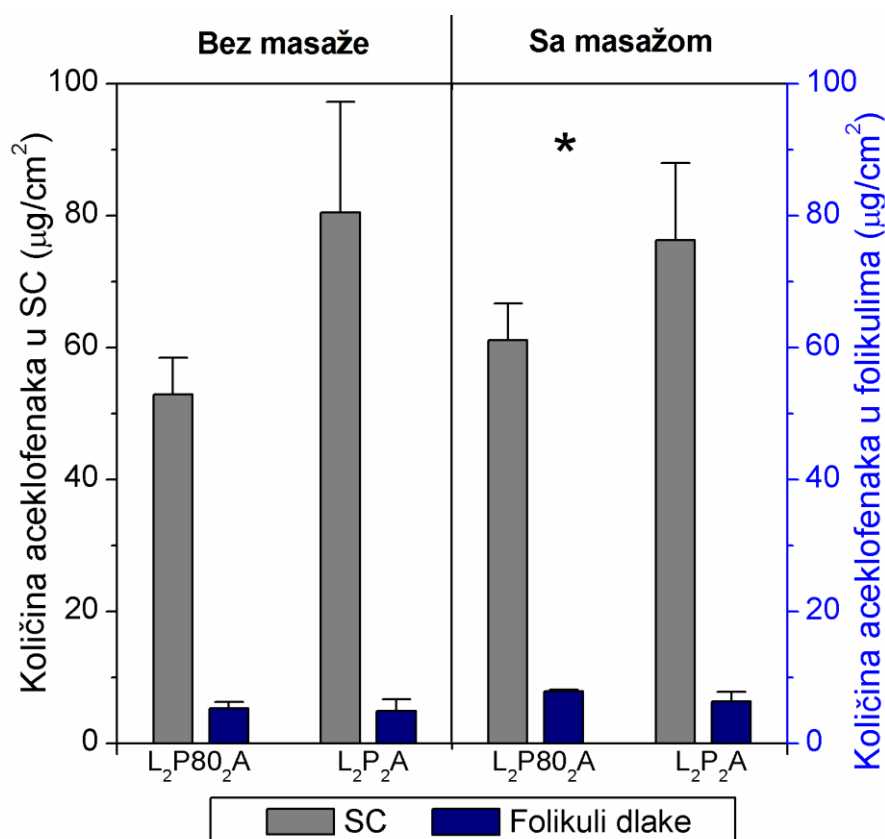
U narednom delu ove faze istraživanja, sprovedeno je određivanje penetracionih profila aceklofenaka pri *finite dose* uslovima, primenom količine koja bi se mogla primenjivati u realnim uslovima, in vivo, od strane pacijenata. Dobro je poznato da nakon primene nanoemulzija na kožu, u „*in-use*“ uslovima, usled isparavanje vode, može doći do promena u strukturi koje dalje mogu da utiču na penetraciju lekovitih supstanci u/kroz kožu. Štaviše, ovaj efekat je od posebnog značaja kod razvijenih nanoemulzija na bazi saharoznih estara, usled opisanih gelirajućih osobina SP i SS (Szüts i sar., 2010). Dodatno, imajući na umu da se primenom *tape stripping* metode ne može odrediti frakcija lekovite supstance koja penetrira u folikule dlake, nakon uklanjanja SC, sprovedena je cijanoakrilatna biopsija kože u cilju kvantifikacije sadržaja aceklofenaka u folikulima. U tom smislu, važno je istaći da su rezultati preliminarne studije pokazali da je 15 traka dovoljno da se ukloni aceklofenak koji je penetrirao u SC (nakon 15. trake, količina aceklofenaka uklonjena sa test-mesta tretiranih ispitivanim nanoemulzijama je bila zanemarljiva). Otuda, količina aceklofenaka ekstrahovana iz cijanoakrilatnih biopsija može se definisati kao količina prisutna u folikulima dlake. Interesantno je napomenuti da se u literaturi kombinacija *tape stripping* metode i cijanoakrilatne biopsije površine kože označava još i kao diferencijalni *stripping*. Za razliku od *tape stripping* metode, koja se smatra minimalno invazivnom i bezbolnom, cijanoakrilatna biopsija površine kože može da dovede do značajnog oštećenja kožne barijere, te nije pogodna za rutinsku primenu in vivo, na humanim dobrovoljcima, tokom razvoja formulacije. Stoga, u ovoj studiji, diferencijalni *stripping* je sproveden na koži uha svinje. Uprkos određenim razlikama u građi folikula dlake kod ljudi i kože uha svinje, Raber i sar. (2014) su dokazali odličnu in vitro-in vivo korelaciju između oba modela, što potvrđuje pogodnost kože uha svinje za kvantifikaciju sadržaja lekovite supstance u folikulima dlake. Međutim, kao glavni nedostatak kože uha svinje tokom diferencijalnog *stripping*-a navodi se odsustvo fizioloških pokreta dlake, koji mogu da podstaknu transport nanokapi u folikule (Patzelt i sar., 2008). Problem se može rešiti primenom masaže kože prilikom aplikacije uzoraka (Mathes i sar., 2016b; Raber i sar., 2014)

Penetracioni profili aceklofenaka kroz SC kože uha svinje, određeni 1h nakon primene ispitivanih nanoemulzija, sa i bez masaže kože prilikom aplikacije, predstavljeni su na slici 4.3.11.



**Slika 4.3.11.** Komparativni prikaz penetracionih profila aceklofenaka iz odabrane nanoemulzije na bazi saharoza palmitata (L<sub>2</sub>P<sub>2</sub>A) i referentne nanoemulzije (L<sub>2</sub>P80<sub>2</sub>A), dobijenih primenom *tape stripping* metode in vitro, na koži uha svinje, 1h nakon aplikacije ispitivanih formulacija, sa i bez masaže kože, pri *finite dose* uslovima (n=4)

Analizom dobijenih penetracionih profila jasno je uočeno da je aceklofenak penetrirao u SC kože uha svinje u većem stepenu iz nanoemulzija na bazi saharoznih estara u odnosu na referentni uzorak, pri čemu zbog varijabilnosti dobijenih podataka i relativno malog broja sprovedenih ponavljanja (n=4) dobijena razlika nije bila statistički značajna (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Interesantno, sličan zaključak izveden je nakon određivanja penetracionih profila pri *infinite dose* uslovima. Međutim, u slučaju formulacija nanoemulzija na bazi saharoznih estara, nije detektovana razlika u dobijenim penetracionim profilima pri *finite dose* uslovima (zbog preglednosti grafika izostavljene su formulacije L<sub>1,5</sub>S<sub>0,5</sub>P<sub>2</sub>A i L<sub>1</sub>S<sub>1</sub>P<sub>2</sub>A). Uočen gubitak razlika mogao bi se pripisati promenama u strukturi nanoemulzija i formiranju karakterističnog filma na površini kože (vidljiv golim okom). Usled gelirajućeg efekta oba saharozna estera upotrebljena za stabilizaciju nanoemulzija, formirani film se verovatno ponaša kao rezervoar koji direktno određuje brzinu oslobađanja aceklofenaka. Interesantno, masaža kože primenjena prilikom aplikacije uzoraka nije značajno uticala na penetracione profile aceklofenaka u SC (slika 4.3.11).



**Slika 4.3.12.** Ukupna količina aceklofenaka koja je penetrirala u SC i folikule dlake kože uha svinje, sa i bez masaže primenjene tokom aplikacije ispitivanih uzoraka nanoemulzija, pri *finite dose* uslovima (srednja vrednost  $\pm$  SD, n = 4); \* p < 0,05 u poređenju sa vrednošću dobijenom bez primene masaže.

Primetno, količina aceklofenaka koja je penetrirala u folikule dlake bila je značajno niža u odnosu na količinu aceklofenaka u SC, pri čemu nije uočena statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ) između formulacija (slika 4.3.12). Dobijen nalaz je bio delimično očekivan s obzirom da nije bilo značajnih razlika između ispitivanih nanoemulzija u pogledu fizičko-hemijskih parametara koji se smatraju ključnim za efikasnu isporuku u folikule dlake (veličina kapi, površinsko naelektrisanje (Patzelt i sar., 2011)). Trominutna masaža kože uha svinje tokom aplikacije ispitivanih uzoraka uslovlila je povećanje količine aceklofenaka u folikulima dlake iz svih ispitivanih formulacija, pri čemu je statistički značajno povećanje uočeno jedino u slučaju L<sub>2</sub>P80<sub>2</sub>A formulacije. Ovo zapažanje potvrđuje da imitiranje fizioloških pokreta dlake masažom kože tokom aplikacije uzoraka podstiče transport nanokapi u folikule dlake (Mathes i sar., 2016b). Takođe, može se pretpostaviti da prisustvo polisorbata 80 na međupovršini olakšava preuzimanje nanokapi u folikule dlake. Međutim, uzimajući u obzir sve dobijene rezultate, izgleda da je intercelularni put dominantan za difuziju aceklofenaka, odnosno, da je

relativno mali doprinos transfolikularnog puta u ukupnoj isporuci aceklofenaka u/kroz kožu iz razvijenih nanoemulzija. Drugim rečima, poboljšana isporuka aceklofenaka u SC kože uha svinje iz nanoemulzija na bazi saharoznih estara u odnosu na referentni uzorak prevažodno potiče od (i) narušavanja barijerne funkcije SC pod dejstvom fosfolipida i saharoznih estara i/ili (ii) poboljšanog oslobađanja aceklofenaka.

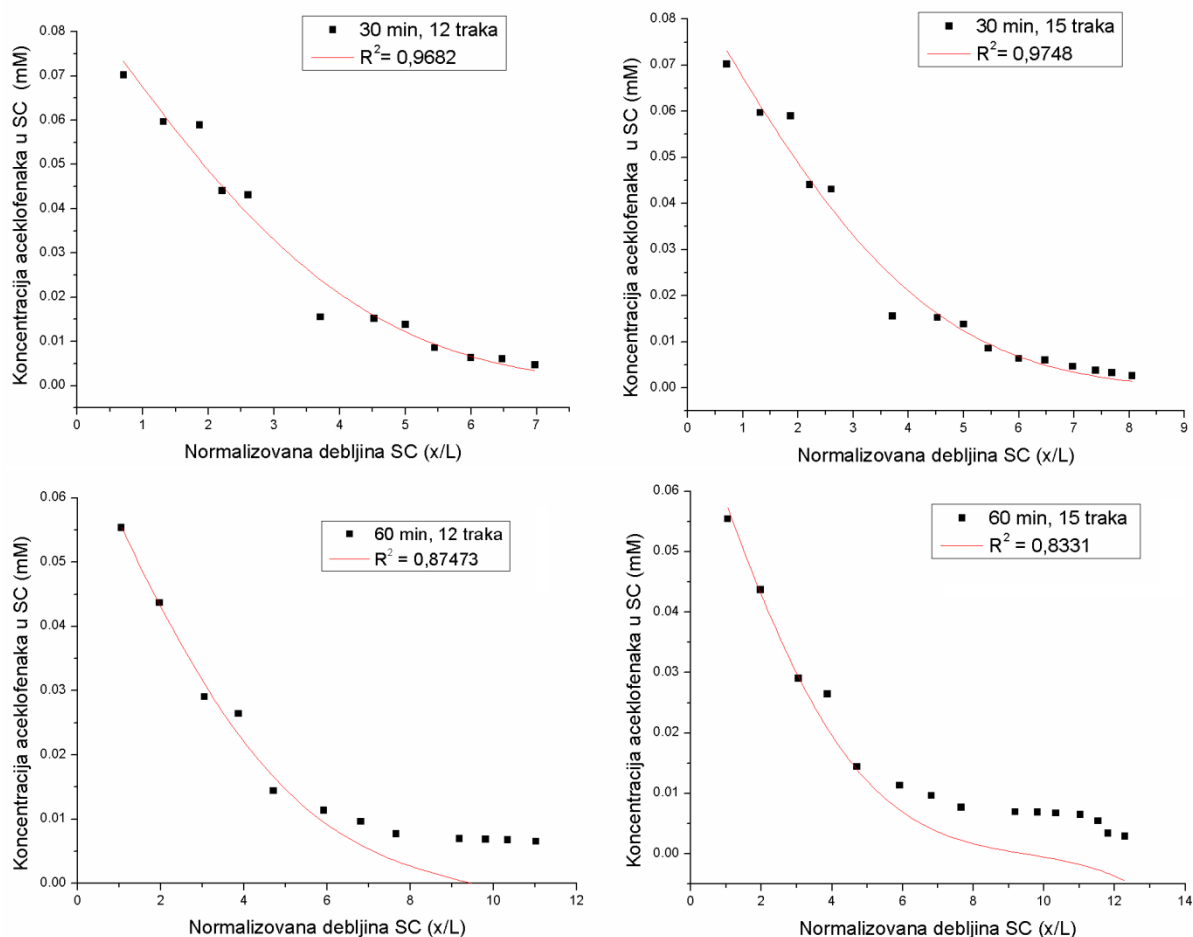
#### **4.3.2.4 In vivo tape stripping u proceni dermalne raspoloživosti aceklofenaka iz mikrostrukturiranih emulzionih sistema –infinite dose uslovi**

U drugom delu ove faze istraživanja, sprovedeno je određivanje penetracionih profila aceklofenaka u SC nakon primene ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema izrađenih suspendovanjem aceklofenaka u prethodno razvijene podloge, in vivo, na humanim dobrovoljcima, pod *infinite dose* uslovima. U cilju (i) mehanističkog razumevanja fenomena koji su uključeni u penetraciju aceklofenaka u SC, kao i (ii) procene obima i (iii) brzine isporuke aceklofenaka u kožu iz različitih formulacija, dodatno je sprovedena matematička analiza (fitovanje u matematičku jednačinu koja opisuje II Fick-ov zakon difuzije ) dobijenih profila koncentracije aceklofenaka u SC za svakog ispitanika. Drugim rečima, izračunate vrednosti odgovarajućih dermofarmakokinetičkih parametara ( $K$ ,  $D/L^2$ , AUC) korišćene su da se objektivno uporedi biološka raspoloživost aceklofenaka iz različitih formulacija, kao i da se proceni da li dodatak korastvarača/potencijalnih penetracionih inhensera utiče na isporuku aceklofenaka u/kroz kožu povećanjem preuzimanja u SC ili olakšavanjem difuzije kroz barijeru.

Međutim, vrlo važan aspekt prilikom određivanja vrednosti dermofarmakokinetičkih parametara (prevažodno  $K$  i  $D/L^2$ ) je odabir dužine kontakta ispitivane formulacije sa kožom. Ovaj period mora biti dovoljan za postizanje merljivih koncentracija lekovite supstance u SC, ali ne preterano dugačak, kako bi se sprečilo postizanje *steady-state*. Ukoliko se postigne *steady-state*, profil unutar membrane postaje linearan, odnosno gube se informacije o parametru koji karakteriše brzinu difuzije lekovite supstance kroz SC ( $D/L^2$ ) (jednačina 3.3.5 se u tom slučaju jednostavno konvertuje u oblik:  $C_x = K \cdot C_v \cdot [1 - x/L]$ ) (Herkenne i sar., 2007; Wiedersberg i Nicoli, 2012). Stoga, prvobitno je sprovedena preliminarna studija variranjem vremena kontakta formulacije S-IpaA sa kožom i broja uklonjenih adhezivnih traka kako bi se odredilo najbolje uklapanje (engl., *the best fits*) jednačine 3.3.5 (najveći koeficijent korelacije) u dobijene eksperimentalne rezultate. Na osnovu penetracionih profila predstavljenih na slici 4.3.13, može se jasno uočiti da je



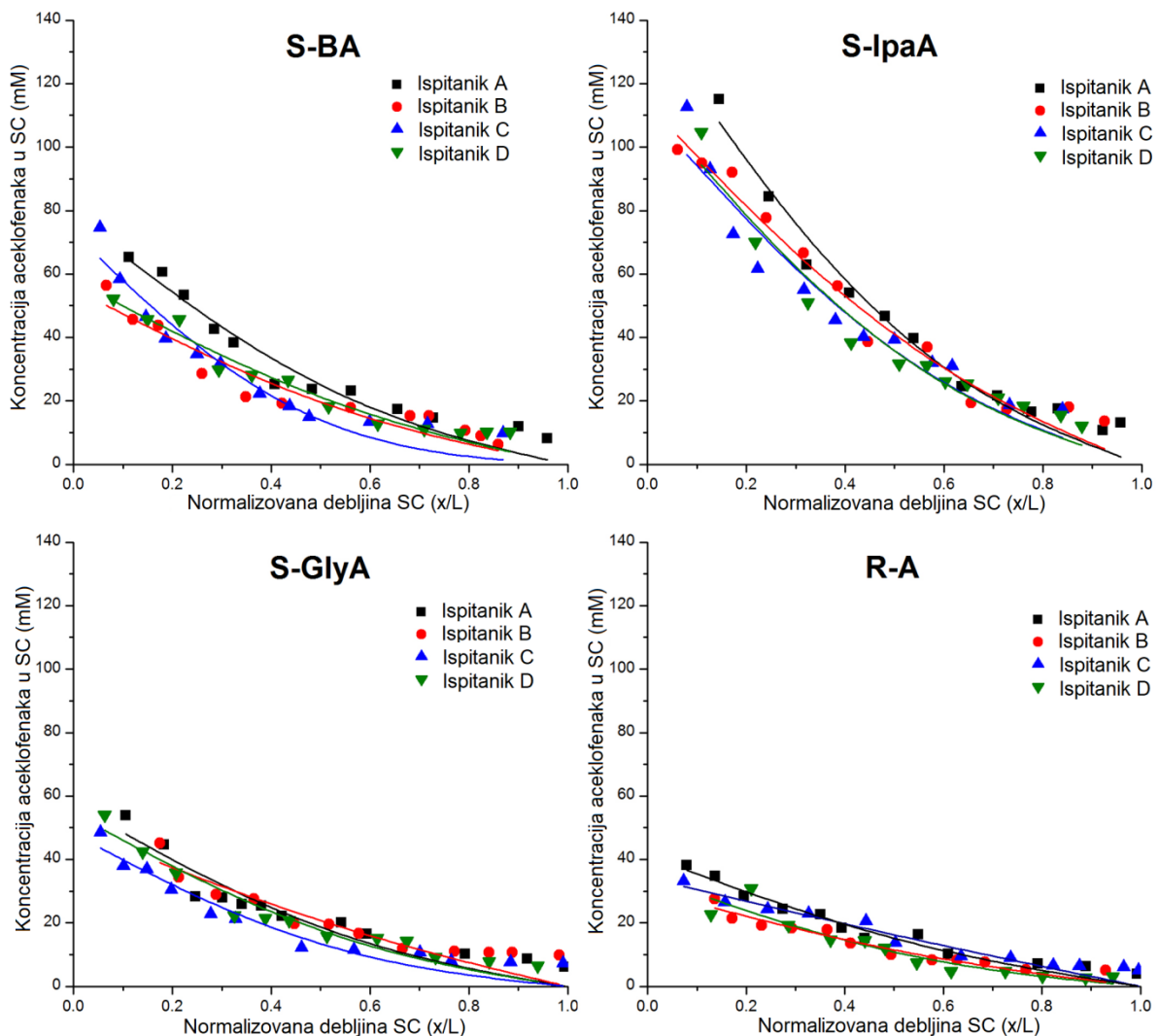
povećanje vremena kontakta (sa 30 na 60 min) uslovalo smanjenje vrednosti  $R^2$  (usled postepenog približavanja linearnosti). Takođe, nešto veća vrednost  $R^2$  je dobijena nakon uklanjanja 15 adhezivnih traka (slika 4.3.13), te je 15 traka korišćeno u daljim eksperimentima za uklanjanje slojeva SC iz ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema.



**Slika 4.3.13.** Profili zavisnosti koncentracije aceklofenaka u SC (mM) od relativne debljine SC, dobijeni variranjem vremena kontakta (30/60 min) odabrane formulacije (S-IpaA) sa kožom i broja uklonjenih adhezivnih traka (12/15 traka). Linije predstavljene na grafiku predstavljaju najbolje uklapanje (engl., *the best fits*) jednačine 3.3.5 za svaki set podataka.

Dalje, profili zavisnosti koncentracije aceklofenaka od relativne/normalizovane debljine SC, dobijeni nakon aplikacije ispitivanih uzoraka kod 4 zdrava dobrovoljca, primenom odabranih eksperimentalnih uslova (30 min, 15 adhezivnih traka), predstavljani su na slici 4.3.14. Prvo, može se primetiti da je interindividualna varijabilnost dobijenih podataka prilično mala, što potvrđuje da je primenjena metodologija robustna i reproducibilna, uprkos relativno malom broju ponavljanja (Herkenne i sar., 2007; Russell i Guy, 2009; Wiedersberg i Nicoli, 2012).

Drugo, jasno je da ispitivani uzorci nisu jednako isporučili aceklofenak u SC – značajno veća količina aceklofenaka penetrirala je u SC iz uzoraka na bazi APG emulgatora u poređenju sa referentnim uzorkom. Dodatno, poređenjem penetracionih profila aceklofenaka iz uzoraka stabilizovanih APG emulgatorom, može se primetiti da je u pogledu isporuke aceklofenaka u SC, najefikasnija formulacija sa izopropanolom (S-IpaA), dok se formulacija sa glicerolom (S-GlyA) nije značajno razlikovala u odnosu na osnovnu APG formulaciju (S-BA), bez korastvarača/penetracionog inhensera.



**Slika 4.3.14.** Profili zavisnosti koncentracije aceklofenaka u SC (mM) od relativne debljine SC za svakog ispitanika, dobijeni 30 min nakon aplikacije aceklofenaka u različitim podlogama na bazi APG emulgatora (S-BA, S-IpaA, S-GlyA) i odabranoj referentnoj podlozi farmakopejskog kvaliteta (R-A). Linije predstavljene na grafiku predstavljaju najbolje uklapanje jednačine 3.3.5 za svaki set podataka.

Kako bi se dobio uvid u mehanizme odgovorne za različitu isporuku aceklofenaka iz ispitivanih uzoraka, u tabeli 4.3.3 su sumirane vrednosti SC-nosač partitionog koeficijenta (K), parametra koji opisuje brzinu difuzije ( $D/L^2$ ), kao i izračunate vrednosti koeficijenta permeabilnosti ( $K_p$ ) aceklofenaka kroz SC. Statistička analiza dobijenih podataka ukazala je na odsustvo značajnih razlika (ANOVA,  $p > 0,05$ ) između ispitivanih formulacija u pogledu vrednosti kinetičkog parametra ( $D/L^2$ ). Takođe, vrednost klasičnog difuzionog vremena odlaganja (engl., *lag-time*) ( $t_{lag}$  približno 40 min), izračunata preko odnosa  $L^2/6D$  (Herkenne i sar., 2007) ukazuje da je približno identično vreme ( $\sim 1,5$  h) potrebno za postizanje *steady-state* transporta aceklofenaka kroz SC iz ispitivanih uzoraka. Drugim rečima, dobijeni rezultati ukazuju da brzina apsorpcije aceklofenaka kroz SC ne zavisi od sastava/mikrostrukture nosača, kao i da dodatak izopropanola/glicerola, kao korastvarača i penetracionih inhensera, nije značajno ubrzao ni usporio difuziju aceklofenaka kroz SC.

**Tabela 4.3.3.** Parametri koji opisuju transport aceklofenaka kroz SC, određeni 30 min nakon aplikacije ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema (srednja vrednost  $\pm$  SD, n=4)

Uzorak	K	$D/L^2$ ( $h^{-1}$ )	$10^4 K_p$ (cm/h)	AUC (mM)
S-BA	2,35 $\pm$ 0,40	0,254 $\pm$ 0,076	5,56 $\pm$ 2,61	33,16 $\pm$ 5,61
S-IpaA	4,25 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>	0,268 $\pm$ 0,030	10,37 $\pm$ 2,78 <sup>a</sup>	59,99 $\pm$ 6,84 <sup>a</sup>
S-GlyA	1,86 $\pm$ 0,15	0,287 $\pm$ 0,085	4,99 $\pm$ 1,95	26,21 $\pm$ 2,12
R-A	1,25 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	0,302 $\pm$ 0,041	3,42 $\pm$ 0,69	17,56 $\pm$ 2,28 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa S-BA, S-GlyA, R-A

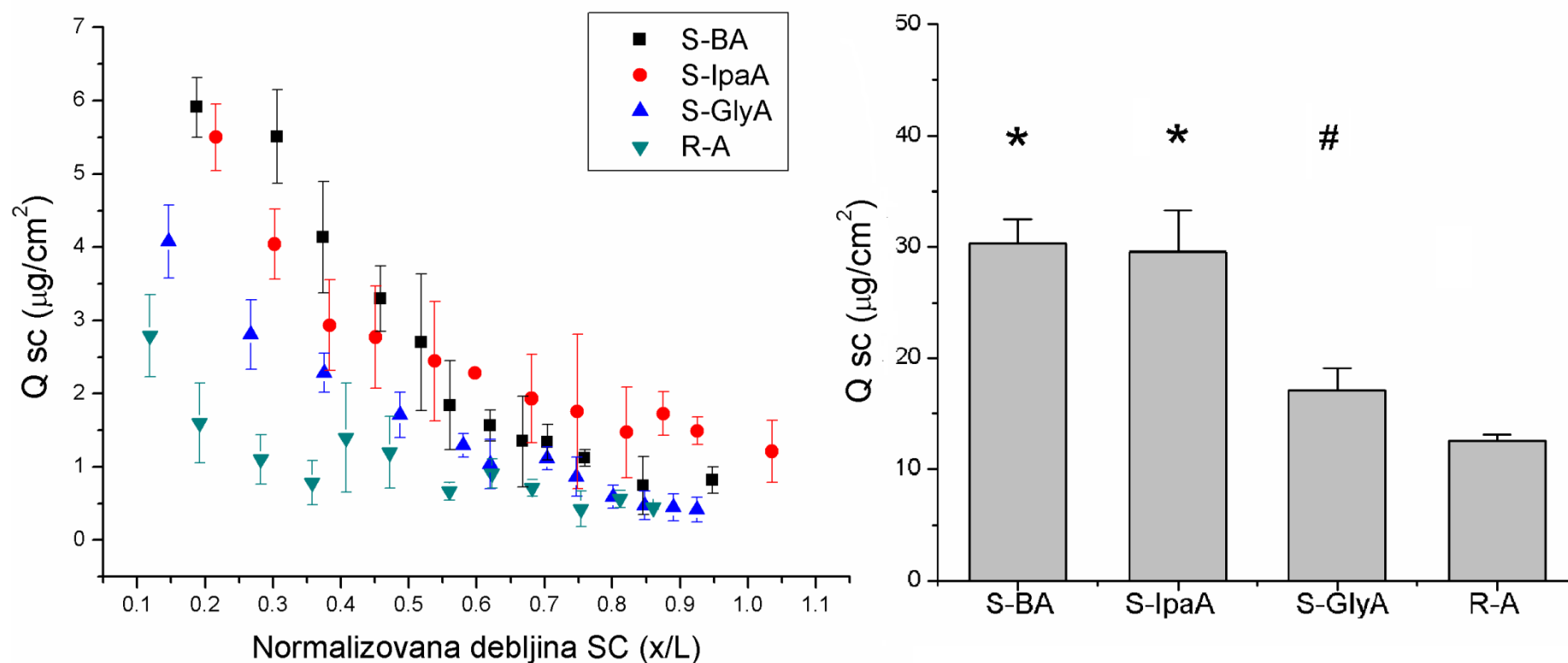
<sup>b</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa S-BA, S-IpaA, S-GlyA

Sa druge strane, detaljnom analizom dobijenih penetracionih profila (slika 4.3.14), kao i odgovarajućih podataka predstavljenih u tabeli 4.3.3, može se jasno uočiti da su vrednosti SC-nosač partitionog koeficijenta (K) (tabela 4.3.3) prevashodno određene sastavom/mikrostrukturom ispitivanih podloga. Među uzorcima na bazi APG emulgatora, najveći SC-nosač partitioni koeficijent dobijen je za uzorak sa izopropanolom (S-IpaA), što ukazuje na značajno veći afinitet aceklofenaka za SC u odnosu na ovu podlogu. Stoga, može se pretpostaviti da je izopropanol penetrirao u SC u određenoj količini, i tako omogućio preuzimanje aceklofenaka u većem stepenu. Uprkos pretpostavci da izopropanol poboljšava isporuku lekovitih supstanci u/kroz kožu povećanjem fluidnosti lipidnog matriksa

(narušavanjem strukture lipidnih dvoslojeva) (Brinkmann i Müller-Goymann, 2003), rezultati ove studije, kao i studije publikovane od strane Lui i sar. (2009), ukazuju da je delovanje izopropanola kao penetracionog inhensera bazirano, pre svega, na poboljšanju rastvorljivosti lekovite supstance i njene particije u SC. Sa druge strane, dodatak glicerola (S-GlyA) nije značajno (ANOVA,  $p > 0,05$ ) uticao na vrednost SC-nosač particionog koeficijenta (K) u poređenju sa osnovnom APG podlogom (tabela 4.3.3). Imajući na umu predloženi mehanizam delovanja glicerola kao penetracionog inhensera (prevažodno povećanjem vlažnosti kože (Chrit i sar., 2006)), odsustvo značajnog efekta na isporuku aceklofenaka u kožu moglo bi se pripisati kratkom vremenu kontakta ispitivanih formulacija sa kožom (30 min), koje je verovatno nedovoljno da bi se ostvario merljiv efekat glicerola u poređenju sa kontrolnom formulacijom – osnovni APG uzorak (S-BA).

Sa druge strane, treba primetiti da su se razlike između ispitivanih formulacija delimično izgubile, kada se posmatraju vrednosti koeficijenta permeabilnosti ( $K_p$ ) izračunate na osnovu vrednosti K i  $D/L^2$ , primenom jednačine 3.3.6 (tabela 4.3.3). Statistička analiza je pokazala da je u slučaju uzorka sa izopropanolom (S-IpaA) dobijena najveća vrednost koeficijenta permeabilnosti (statistički značajno veća (ANOVA,  $p < 0,05$ ) u odnosu na ostale uzorke), pri čemu nisu detektovane značajne razlike između ostalih formulacija u pogledu vrednosti ovog parametra.

Pored parametara koji opisuju particiju i brzinu difuzije aceklofenaka kroz SC, dodatno je određena vrednost površine ispod profila zavisnosti koncentracije aceklofenaka od relativne debljine SC (AUC), kako bi se dobio uvid u lokalnu biološku raspoloživost aceklofenaka iz ispitivanih formulacija (Russell i Guy, 2009). S obzirom da AUC direktno zavisi od SC-nosač particionog koeficijenta, nije iznenađujuće što dobijene vrednosti za AUC prate trend uočen za vrednosti K. Drugim rečima, kao što se može videti u tabeli 4.3.3, značajno veća količina aceklofenaka (ANOVA,  $p < 0,05$ ) penetrirala je u SC iz formulacije sa izopropanolom (S-IpaA) u poređenju sa ostalim ispitivanim formulacijama, dok je referentni uzorak izrađen sa konvencionalnom podlogom farmakopejskog kvaliteta bio najmanje efikasan u pogledu isporuke aceklofenaka u kožu. Na kraju, može se zaključiti da je protokol korišćen za određivanje penetracionih profila i njihovu matematičku analizu dovoljno diskriminatoran da ukaže na razlike u isporuci aceklofenaka u/kroz kožu iz uzoraka istog tipa/farmaceutskog oblika (hidrofilni kremovi), koji se razlikuju u mikrostrukturi (APG vs. referentna podloga) ili variranim korastvaračima (izopropanol i glicerol).



**Slika 4.3.15** a) Komparativni prikaz penetracionih profila aceklofenaka iz ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema na bazi APG emulgatora (S-BA, S-IpaA, S-GlyA) i referentnog uzorka izrađenog sa konvencionalnom podlogom farmakopejskog kvaliteta(R-A), dobijenih primenom *tape stripping* metode na koži uha svinje, 1h nakon aplikacije ispitivanih formulacija, pri *finite dose* uslovima, b) ukupna količina aceklofenaka koja je penetrirala u SC iz ispitivanih formulacija; \*  $p < 0,05$  u poređenju sa S-GlyA i R-A formulacijom, #  $p < 0,05$  u poređenju sa R-A formulacijom. Rezultati predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  SD (n=4)

#### 4.3.2.5 In vitro *tape stripping* u proceni dermalne raspoloživosti aceklofenaka iz mikrostrukturiranih emulzionih sistema –*finite dose* uslovi

Kako bi se procenio uticaj promena u strukturi ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema koje nastaju kao posledica isparavanja vode/rastvarača u realnim „*in use*“ uslovima primene, dodatno je sprovedeno određivanje penetracionih profila pri *finite dose* uslovima. Ispitivanje je sprovedeno na koži uha svinje, kako bi se rezultati dobijeni primenom konvencionalnih (mikrostrukturiranih) emulzionih sistema mogli porediti sa rezultatima dobijenim primenom razvijenih nanoemulzija.

Prvo, jasno se može primetiti da je količina aceklofenaka koja je penetrirala u SC kože uha svinje iz ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema (slika 4.3.15) značajno manja od količine aceklofenaka koji je penetrirao u SC iz ispitivanih nanoemulzija (kako iz nove formulacije na bazi SP, tako i referentne nanoemulzije sa polisorbitom 80) (slika 4.3.12). Rezultati ove studije nedvosmisleno potvrđuju da se zahvaljujući izrazito maloj veličini kapi, primenom nanoemulzija postiže poboljšana isporuka lekovite supstance u/kroz kožu u poređenju sa konvencionalnim (mikrostrukturiranim) emulzionim sistemima. Dalje, penetracioni profili predstavljeni na slici 4.3.15, nisu u potpunosti u skladu sa profilima dobijenim pri *infinite dose* uslovima (slika 4.3.14). Među ispitivanim uzorcima, pri *infinite dose* uslovima, najveći stepen isporuke aceklofenaka u SC postignut je primenom podloge sa izopropanolom (S-IpaA), dok pri *finite dose* uslovima, nije uočena značajna razlika između ove podloge i osnovne APG podloge (S-BA), bez korastvarača/penetracionog inhensera. Uočeno neslaganje bi se moglo objasniti činjenicom da nakon primene na kožu relativno malih količina uzorka ( $5 \text{ mg/cm}^2$ ), izopropanol isparava, što za posledicu ima rekristalizaciju aceklofenaka usled narušene mikrostrukture ove formulacije. Drugim rečima, formiranje kristala nerastvornog aceklofenaka moglo bi se smatrati odgovornim za smanjenje penetracije u SC. Sa druge strane, nezavisno od dizajna studije (*infinite vs. finite dose* uslovi), referentni uzorak, okarakterisan najmanjom vrednošću Cs, specifičnim reološkim profilom (najveća vrednost prinosnog napona i viskoziteta pri smicanju) i najmanjom brzinom oslobađanja aceklofenaka, praćen je najmanjim stepenom penetracije aceklofenaka u SC.

Na kraju, poređenjem rezultata dobijenih primenom *tape stripping* metode sa rezultatima in vitro ispitivanja oslobađanja, može se primetiti određeno neslaganje u dobijenim zaključcima – redosled formulacija u pogledu efikasnosti oslobađanja nije bio u skladu sa redosledom penetracije u SC, pri čemu je količina aceklofenaka oslobođena iz ispitivanih uzoraka kroz veštačku polikarbonatnu membranu bila značajno veća od količine koja je penetrirala u SC

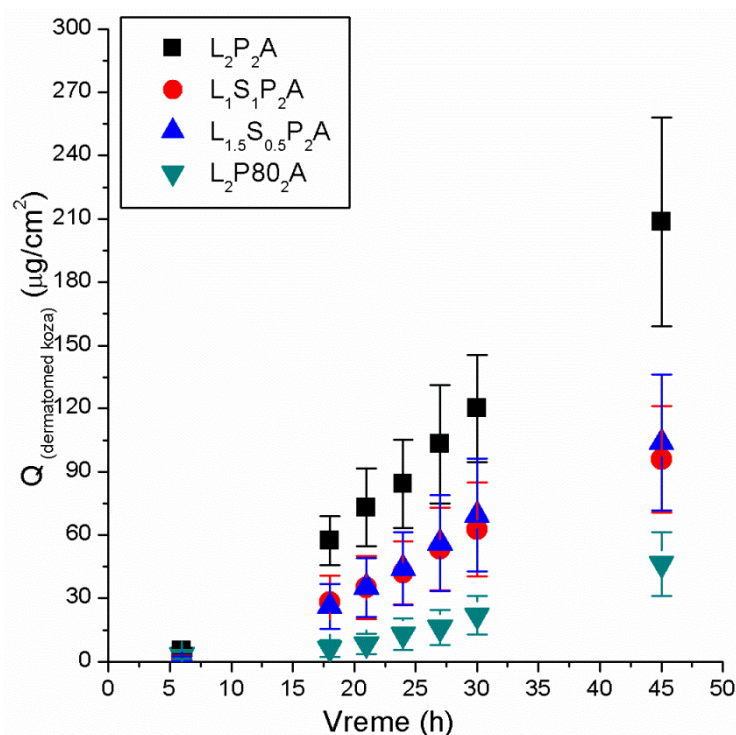
tokom istog perioda vremena. Stoga, rezultati svih sprovedenih ispitivanja (bilo da se radi o nanoemulzijama ili mikrostrukturiranim emulzionim sistemima) potvrđuju da je *in vitro* ispitivanje oslobađanja pogodno za kontrolu kvaliteta preparata za primenu na koži (npr. za procenu variranja konzistencije između različitih serija), ali se ne može koristiti za predviđanje biološke raspoloživosti lekovite supstance *in vivo*. Drugim rečima, primenom veštačkih membrana se ne mogu detektovati kompleksne interakcije između komponenti formulacije i kože, te je neophodna primena biološki relevantnih membrana kako bi se detektovale eventualno prisutne razlike među formulacijama (Leal i sar., 2017).

#### **4.3.6 In vitro ispitivanje permeacije aceklofenaka primenom Franz-ovih difuzionih ćelija**

Kao što je naglašeno u uvodnom delu, tokom poslednjih godina *in vitro* ispitivanje permeacije kroz izolovanu humanu kožu primenom Franz-ovih difuzionih ćelija prepoznato je kao važan deo metodologije za procenu bioekvivalencije preparata za primenu na koži, odnosno za detekciju eventualno prisutnih razlika u isporuci lekovite supstance kroz SC, epidermis i/ili dermis iz različitih formulacija aplikovanih na površini kože. S obzirom da je mesto delovanja aceklofenaka potkožno tkivo, ispod mesta aplikacije, od posebnog značaja je bilo uporediti rezultate dobijene *in vitro* ispitivanjem permeacije sa rezultatima dobijenim primenom *tape stripping* metode. Iako određene studije ukazuju da je sadržaj lekovite supstance u SC u direktnoj vezi sa sadržajem u dubljim slojevima kože/potkožnom tkivu, još uvek nema dovoljno dokaza o primeni *tape stripping* metode u proceni biološke raspoloživosti/bioekvivalencije lekova namenjenih za lečenje bolesti/povreda skeletno-mišićnog sistema putem kože (Cordery i sar., 2017). Stoga, kako bi se detektovale potencijalno značajne razlike u brzini i obimu isporuke aceklofenaka kroz kožu iz ispitivanih formulacija, inicijalno je sprovedeno *in vitro* ispitivanje permeacije primenom *dermatomed* kože uha svinje debljine 1 mm (redukovana debljina dermisa).

Profili zavisnosti kumulativne količine aceklofenaka koja je permeirala kroz *dermatomed* kožu uha svinje od vremena (t) za svaku od ispitivanih formulacija nanoemulzija predstavljeni su na slici 4.3.16, a odgovarajući parametri su sumirani u tabeli 4.3.4. Kao što se može videti sa slike 4.3.16, stepen permeacije aceklofenaka kroz kožu direktno je zavisio od prirode surfaktanata upotrebljenih za stabilizaciju nanoemulzija. Najmanja količina aceklofenaka permeirala je kroz kožu iz referentne nanoemulzije stabilizovane smešom lecitina iz jajeta i polisorbata 80, koja je ujedno praćena najnižom vrednošću stacionarnog fluksa i koeficijenta

permeacije (tabela 4.3.4). Sa druge strane, nanoemulzije na bazi saharoznih estara su značajno povećale (ANOVA,  $p < 0,05$ ) količinu aceklofenaka koja je permeirala kroz kožu nakon 45h, pri čemu je  $L_2P_2A$  formulacija praćena najvišim stepenom permeacije aceklofenaka (slika 4.3.16) i posledično, najvećim vrednostima *steady-state* fluksa i koeficijenta permeacije (tabela 4.3.4).



**Slika 4.3.16.** Uporedni prikaz in vitro permeacionih profila aceklofenaka iz ispitivanih nanoemulzija ( $L_2P_2A$ ,  $L_1S_1P_2A$ ,  $L_{1,5}S_{0,5}P_2A$ ,  $L_2P_{80}A$ ) kroz *dermatomed* kožu uha svinje debljine 1 mm. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD (n=5).

Inkorporiranje dodatnog surfaktanata (SS) dovelo je do značajnog smanjenja brzine permeacije aceklofenaka kroz kožu (nisu uočene statistički značajne razlike između  $L_1S_1P_2A$  i  $L_{1,5}S_{0,5}P_2A$  formulacija), verovatno kao posledica formiranja rigidnijeg mešanog filma na površini nanokapi i smanjenja količine aceklofenaka dostupne za difuziju u/kroz kožu. U tom smislu, važno je istaći da su dobijeni rezultati u potpunosti u skladu sa in vitro profilima oslobađanja aceklofenaka iz ispitivanih nanoemulzija, što ukazuje da je oslobađanje glavni faktor koji određuje isporuku aceklofenaka kroz kožu iz ispitivanih nanoemulzija. Međutim, ne treba zaboraviti ni rezultate dobijene primenom *tape stripping* metode, koji ukazuju da je najveća penetracija aceklofenaka u SC postignuta primenom  $L_{1,5}S_{0,5}P_2A$ . Drugim rečima, logično je pretpostaviti da interakcije surfaktanata upotrebljenih za stabilizaciju nanoemulzija sa lipidnim strukturama SC doprinose poboljšanoj isporuci aceklofenaka kroz kožu. Saharozni



estri povećavaju permeabilnost kože narušavanjem strukture gusto pakovanih lipida koji ispunjavaju intercelularni matriks SC, i na taj način olakšavaju difuziju lekovite supstance kroz kožu (Hoeller i sar., 2009; Szüts i Szabó-Révész, 2012). Međutim, imajući na umu da SS poseduje izraženije gelirajuće osobine u odnosu na SP (Szüts i sar., 2010), takođe je moguće pretpostaviti da dodatak SS produžava oslobađanje aceklofenaka iz odgovarajućih nanoemulzija. Film koji se obrazuje na površini membrane/kože u slučaju nanoemulzija sa SS u ovom slučaju deluje kao rezervoar aceklofenaka koji je praćen većim sadržajem u SC i nižom brzinom oslobađanja/permeacije. Svakako, mnogo detaljnija ispitivanja su neophodna kako bi se potvrdile navedene pretpostavke. Imajući na umu rezultate svih sprovedenih ispitivanja, nanoemulzije sa SS su isključene iz daljih ispitivanja (nisu korišćene u četvrtoj fazi istraživanja) usled kompromitovane dugoročne stabilnosti i smanjene brzine oslobađanja/permeacije aceklofenaka u poređenju sa formulacijom koja je sadržala samo lecitin iz jajeta i SP kao stabilizatore.

**Tabela 4.3.4.** Parametri dobijeni in vitro ispitivanjem permeacija aceklofenaka iz razvijenih formulacija nanoemulzija kroz *dermatomed* kožu uha svinje debljine 1 mm

Uzorci	Brzina permeacije ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ )	$Q_{45\text{h}}^{\text{\$}}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Koeficijent permeacije ( $\text{mg}/\text{cm}^2\text{h}$ )
L <sub>2</sub> P <sub>2</sub> A	5,76±1,32*	208,77±49,36*	0,58±0,13*
L <sub>1,5</sub> S <sub>0,5</sub> P <sub>2</sub> A	2,75±0,74	103,81±32,24	0,28±0,07
L <sub>1</sub> S <sub>1</sub> P <sub>2</sub> A	2,52±0,62	95,79±25,20	0,25±0,06
L <sub>2</sub> P80 <sub>2</sub> A	1,59±0,40 <sup>#</sup>	46,28±15,01 <sup>#</sup>	0,16±0,04 <sup>#</sup>

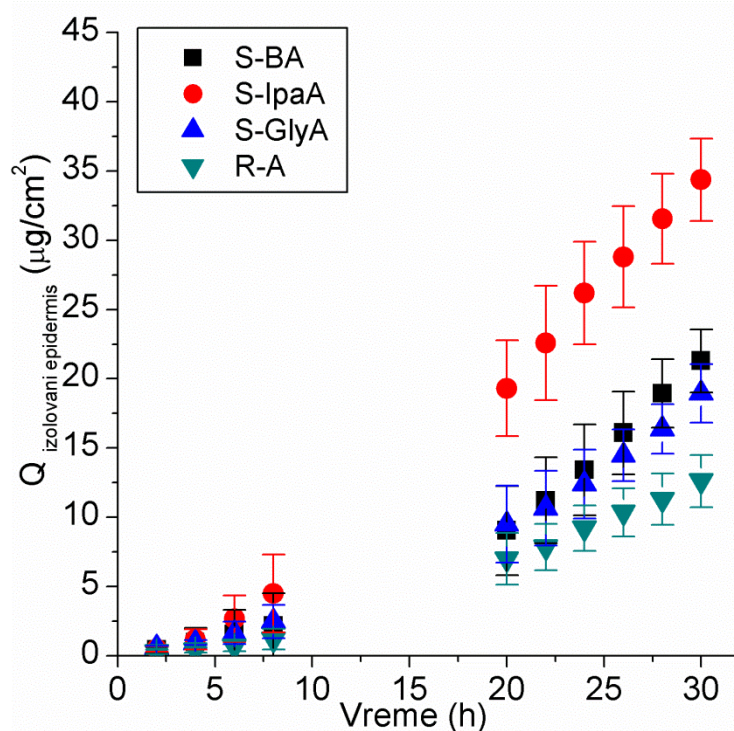
<sup>\\$</sup>  $Q_{45\text{h}}$  – količina aceklofenaka koja je permeirala kroz kožu na kraju eksperimenta

\*  $p < 0,05$  u poređenju sa L<sub>1,5</sub>S<sub>0,5</sub>P<sub>2</sub>A, L<sub>1</sub>S<sub>1</sub>P<sub>2</sub>A i L<sub>2</sub>P80<sub>2</sub>A formulacijama

<sup>#</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa L<sub>2</sub>P<sub>2</sub>A, L<sub>1,5</sub>S<sub>0,5</sub>P<sub>2</sub>A i L<sub>1</sub>S<sub>1</sub>P<sub>2</sub>A formulacijama

Što se tiče ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema izrađenih suspendovanjem aceklofenaka u odgovarajuće podloge, tokom preliminarne studije sa S-IpaA uzorkom (obećavajuća formulacija), uočeno je da je permeacija aceklofenaka kroz *dermatomed* kožu uha svinje značajno manja u odnosu na sve ispitivane formulacije nanoemulzije. Naime, količina aceklofenaka koja je permeirala kroz kožu na kraju eksperimenta iz S-IpaA formulacije iznosila je  $17,22 \pm 1,93 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , sa vrednošću stacionarnog fluksa  $0,74 \pm 0,11 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ , što definitivno potvrđuje da se primenom nanoemulzija kao nosača postiže

poboljšana isporuka lekovitih supstanci u/kroz kožu u odnosu na konvencionalne emulzione sisteme. Važno je napomenuti da je određivanje sadržaja aceklofenaka u eluatima dobijenim tokom in vitro ispitivanja permeacije kroz *dermatomed* kožu sprovedeno primenom HPLC metode. Stoga, kako bi se dobio uvid u eventualno prisutne razlike između ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema u pogledu isporuke aceklofenaka kroz kožu, zbog relativno niskih koncentracija aceklofenaka (posebno u početnim vremenskim tačkama) dobijenih primenom *dermatomed* kože i odgovarajućih analitičkih problema, in vitro ispitivanje permeacije dalje je sprovedeno primenom toplotom izolovanog epidermisa kože uha svinje kao membrane. Dobijeni in vitro permeacioni profili i odgovarajući parametri predstavljeni su na slici 4.3.17 i tabeli 4.3.5, respektivno.



**Slika 4.3.17.** Uporedni prikaz in vitro permeacionih profila aceklofenaka iz ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema (S-BA, S-IpaA, S-GlyA, R-A) kroz toplotom izolovani epidermis kože uha svinje. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD (n=5).

Prvo, poređenjem in vitro permeacionih profila (slika 4.3.17) sa in vitro profilima oslobađanja (slika 4.3.2), ponovno se jasno uočava da rezultati dobijeni primenom polikarbonatne membrane nisu bili u potpunosti u skladu sa rezultatima dobijenim primenom biološkog tkiva. Na osnovu ukupne količine aceklofenaka koja je permeirala kroz toplotom izolovani epidermis kože uha svinje nakon 30 h (tabela 4.3.5), ispitivane formulacije se mogu poređati

na sledeći način: S-IpaA>>S-BA>S-GlyA>>R-A. Među ispitivanim mikrostrukturiranim emulzionim sistemima, najmanja količina aceklofenaka permeirala je kroz kožu iz referentnog uzorka (kao najviskoznijeg), koji je ujedno praćen najnižom vrednošću stacionarnog fluksa i koeficijenta permeacije (tabela 4.3.5). Prema tome, moglo bi se zaključiti da je u slučaju referentnog uzorka oslobađanje ograničavajući faktor za permeaciju aceklofenaka kroz epidermalnu membranu.

**Tabela 4.3.5.** Parametri dobijeni in vitro ispitivanjem permeacije aceklofenaka iz ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema kroz toplotom izolovani epidermis kože uha svinje

Uzorci	Brzina permeacije ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ )	$Q_{30\text{h}}^{\$}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Koeficijent permeacije ( $\text{mg}/\text{cm}^2\text{h}$ )
S-BA	1,22±0,19	21,04±2,04	0,12±0,02
S-IpaA	1,50±0,08*	34,36±2,97*	0,15±0,01*
S-GlyA	0,96±0,10	18,95±2,12	0,10±0,01
R-A	0,57±0,09 <sup>#</sup>	12,62±1,88 <sup>#</sup>	0,06±0,01 <sup>#</sup>

<sup>\$</sup>  $Q_{30\text{h}}$  – količina aceklofenaka koja je permeirala kroz kožu na kraju eksperimenta

\*  $p < 0,05$  u poređenju sa  $L_{1.5}S_{0.5}P_2A$ ,  $L_1S_1P_2A$  i  $L_2P_80_2A$  formulacijama

<sup>#</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa  $L_2P_2A$ ,  $L_{1.5}S_{0.5}P_2A$  i  $L_1S_1P_2A$  formulacijama

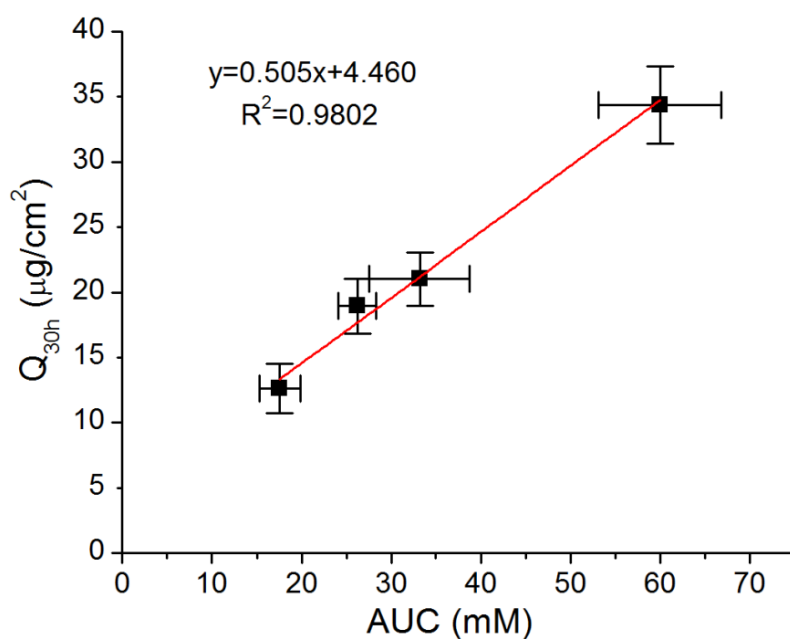
Sa druge strane, svi ispitivani uzorci na bazi APG emulgatora su značajno povećali količinu aceklofenaka koja je permeirala kroz epidermalnu membranu, pri čemu je najveća permeacija dobijena primenom S-IpaA uzorka, koji je, uprkos najmanjoj in vitro brzini oslobađanja (tabela 4.3.2), praćen najvećim vrednostima *steady-state* fluksa i koeficijenta permeacije (tabela 4.3.5). Imajući na umu da za formulacije tipa suspenzija (kao što su ispitivani uzorci), varijacije u rastvorljivosti lekovite supstance u nosaču ne utiču na permeaciju sve dok postoji dovoljno rastvorenog leka za zasićenje kožne barijere (Refai, 2001), najveći stepen permeacije aceklofenaka iz uzorka sa izopropanolom, mogao bi se prevashodno objasniti interakcijom komponenti podloge (posebno izopropanola) sa kožom. Drugim rečima, rezultati dobijeni in vitro ispitivanjem permeacije ukazuju da je izopropanol ključna komponenta u sastavu formulacije odgovorna za poboljšanu isporuku aceklofenaka kroz izolovani epidermis kože uha svinje. Imajući na umu rezultate dobijene in vivo, primenom *tape stripping* metode (*infinite dose* uslovi), može se zaključiti da dodatak izopropanola, kao penetracionog

inhensera u topikalne dermatološke formulacije, može poboljšati isporuku različitih lekovitih supstanci u/kroz kožu, dominantno povećanjem rastvorljivosti u SC (Lane, 2013).

Sa druge strane, dodatak glicerola kao penetracionog inhensera nije doveo do značajnih promena u permeaciji aceklofenaka kroz epidermalnu membranu – nisu uočene statistički značajne razlike (t-test,  $p > 0,05$ ) u vrednostima fluksa i koeficijenta permeacije između formulacije sa glicerolom i osnovne APG formulacije. Štaviše, analizom dobijenih permeacionih profila (slika 4.3.17), može se uočiti da je nešto veća količina aceklofenaka permeirala kroz epidermis kože uha svinje (posebno u poslednjim vremenskim tačkama) iz osnovne APG formulacije u poređenju sa formulacijom izrađenom uz dodatak glicerola. Sličan efekat uočen je i in vivo, analizom rezultata dobijenih primenom *tape stripping* metode (*infinite dose* uslovi). Međutim, jasno je da se odsustvo značajnog efekta glicerola na isporuku aceklofenaka kroz kožu ipak ne može pripisati kratkom vremenu kontakta ispitivanih formulacija sa kožom. Kako su tokom in vitro ispitivanja permeacije odabrane formulacije sve vreme bile u kontaktu sa kožom (30h), potencijalno objašnjenje za uočene fenomene treba tražiti u razlikama u mikrostrukturi između formulacije sa glicerolom i osnovne APG formulacije. Imajući na umu da su primenom termogravimetrijske analize detektovane određene razlike u načinu distribucije vode između ovih uzoraka, moguće je da postoje i određene razlike u distribuciji aceklofenaka unutar različitih frakcija vode, kao i u hidrofilnim i lipofilnim lamelama (iako nisu detektovane primenom konfokalne Raman spektroskopije, prevashodno usled pomenute ograničene osetljivosti ove metodologije). Takođe, nešto niži viskozitet uzorka S-BA mogao bi biti odgovoran za poboljšanu permeaciju aceklofenaka iz osnovne APG podloge u odnosu na podlogu sa glicerolom. Drugim rečima, stepen isporuke aceklofenaka kroz kožu iz ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema zavisi od reoloških karakteristika i specifičnog načina distribucije vode u mikrostrukturi (odabrani kao CQA) i posebno, nosač-koža interakcija, čija procena zahteva primenu biorelevantnog eksperimentalnog *setting*-a.

Na kraju treba naglasiti da je, za razliku od *dermatomed* kože koja se vrlo često koristi u dermatološkim ispitivanjima, značajno manji broj studija u literaturi baziran na primeni izolovanog epidermisa kože uha svinje kao membrane (npr. Bourdon i sar., 2016). Određeni autori smatraju da se primenom ove membrane dobijaju lažno veće vrednosti fluksa, jer tokom pripreme, dlake ostaju u dermisu, što za posledicu ima formiranje pora kroz koje lekovita supstanca može slobodo da difunduje (Barbero i Frasc, 2009). Takođe, kao što je već diskutovano u delu razvoja protokola za *tape stripping* na koži uha svinje, iako se generalno smatra da nema razlike u pogledu permeabilnosti između sveže kože i kože koja je

čuvana u zamrzivaču na -20 °C (Flaten i sar., 2015; OECD, 2004), određeni dokazi ukazuju da čuvanje u zamrzivaču dovodi do narušavanja barijernih osobina kože (Sintov i Botner, 2006). Stoga, kako bi se procenila pogodnost primene razvijenog protokola baziranog na toplotom izolovanom epidermisu kože uha svinje za poređenje različitih formulacija tokom razvoja novog leka ili prilikom preliminarne procene biološke ekvivalentnosti generičkih polučvrstih preparata za primenu na koži (ako su u istom farmaceutskom obliku), sprovedena je odgovarajuća korelaciona analiza sa podacima dobijenim in vivo, pomoću *tape stripping* metode.



**Slika 4.3.18.** Korelacija ukupne količine aceklofenaka koja je permeirala in vitro, kroz toplotom izolovani epidermis kože uha svinje ( $Q_{30h}$ ) i ukupne količine aceklofenaka prisutne u SC in vivo, podeljene volumenom ovog sloja (AUC)

Kada se grafički predstavi zavisnost kumulativne količine aceklofenaka koja je permeirala in vitro, kroz izolovani epidermis kože uha svinje nakon 30 h ispitivanja (pokazatelj sposobnosti formulacije da isporuči lek kroz kožu) od vrednosti AUC-a dobijene in vivo, uočava se visoka korelacija između ukupne količine aceklofenaka u SC in vivo i ukupne količine aceklofenaka koja je permeirala kroz kožu in vitro (slika 4.3.18). Formulacije sa komparativno većim sadržajem aceklofenaka u SC in vivo, udružene su sa boljom permeacijom aceklofenaka in vitro kroz izolovani epidermis kože uha svinje. Iako se primenom ovih metodologija ne može direktno proceniti koncentracija aceklofenaka na mestu delovanja, dobijeni rezultati ukazuju da su obe metode dovoljno diskriminatorne da ukažu na razlike u isporuci aceklofenaka

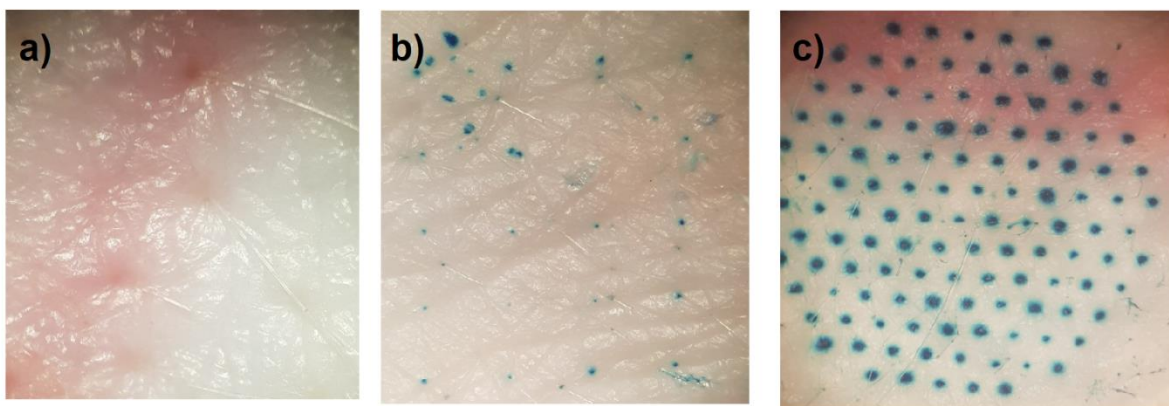
u/kroz kožu iz različitih formulacija. Štaviše, dobijena visoka in vitro-in vivo korelacija ukazuje da se primenom razvijenog protokola za in vitro ispitivanje permeacije sa izolovanim epidermisom kože uha svinje dobijaju isti zaključci u pogledu prisustva/odsustva bioekvivalencije polučvrstih preparata za primenu na koži koji nisu Q1/Q2/Q3 ekvivalenti, kao i primenom in vivo *tape stripping* metode. Takođe, dobijeni rezultati potvrđuju da čuvanje kože uha svinje u zamrzivaču ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) tokom mesec dana nema negativan uticaj na permeaciju aceklofenaka iz ispitivanih formulacija, odnosno da aceklofenak verovatno dominantno difunduje kroz lipidne dvoslojeve SC, za koje se smatra da se ne menjaju tokom procedure smrzavanja/odmrzavanja kože (Sintov i Botner, 2006).

## 4.4 Četvrta faza eksperimentalnog rada

### 4.4.1 Procena integriteta kožne barijere prilikom aplikacije čvrstih mikroigala

Imajući na umu ograničene literaturne podatke o mogućnosti primene nanoemulzija kao nosača za transdermalnu isporuku lekovitih supstanci (Klang i sar., 2015), poslednja faza eksperimentalnog rada ove doktorske disertacije bila je posvećena proceni isporuke aceklofenaka u sistemsku cirkulaciju nakon primene razvijenih nanoemulzija na kožu pacova. Usled izuzetnih barijernih svojstava kože, posebno interesantno je bilo proceniti i da li se predtretmanom kože čvrstim mikroiglama može značajno poboljšati isporuka aceklofenaka kroz kožu iz razvijenih nanoemulzija, odnosno, da li se kombinovanom primenom nanoemulzija i mikroigala može obezbediti efikasna i produžena (trans)dermalna isporuka aceklofenaka kao model NSAID. U tu svrhu, odabrana je formulacija stabilizovana lecitinom iz jajeta (2%) i saharaza palmitatom (2%), pre svega zahvaljujući dugoročnoj fizičko-hemijskoj stabilnosti i poboljšanoj isporuci aceklofenaka kroz *dermatomed* kožu in vitro. Ponovo, kao referentni uzorak korišćena je nanoemulzija stabilizovana smešom lecitina iz jajeta i polisorbata 80. Mikrostrukturirani emulzioni sistemi isključeni su iz daljih ispitivanja, jer su eksperimenti sprovedeni tokom treće faze istraživanja (in vitro ispitivanje oslobađanja/permeacije, in vitro/in vivo *tape stripping*) nedvosmisleno ukazali na superiornost nanoemulzionih sistema u poboljšanju isporuke aceklofenaka u/kroz kožu.

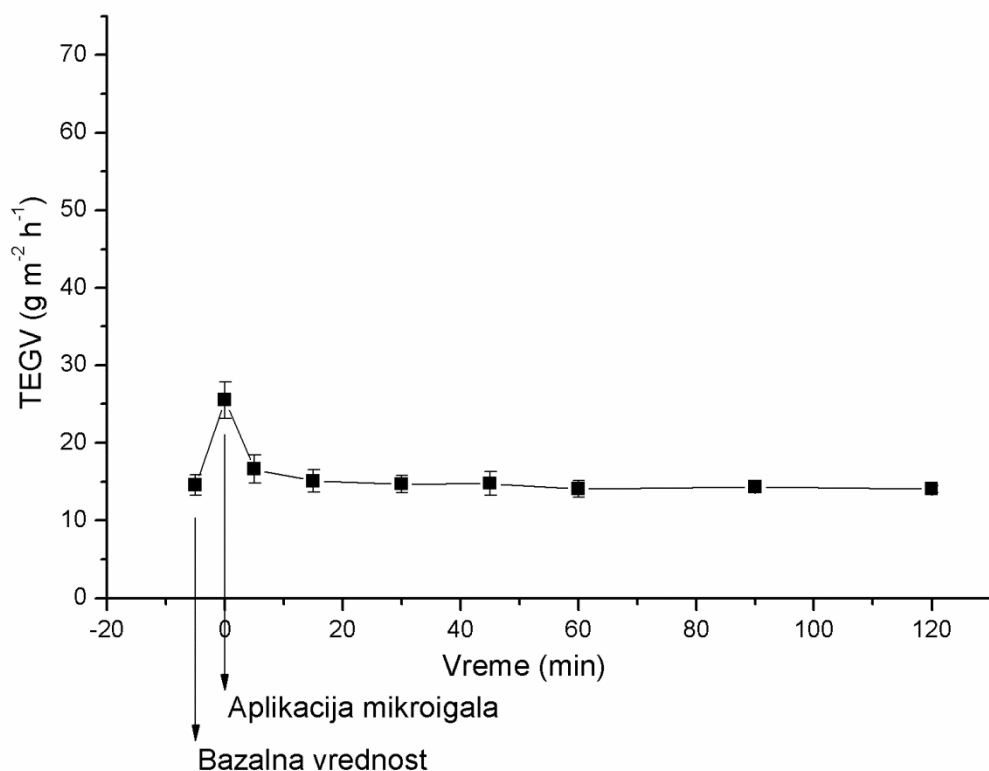
Kao što je već naglašeno u uvodnom delu, nakon aplikacije i uklanjanja čvrstih mikroigala, formiraju se mikropore u spoljašnjim slojevima kože ispunjene vodom, kroz koje lekovita supstanca, u zavisnosti od fizičko-hemijskih osobina, može pasivno da difunduje u/kroz kožu. Slično nanočesticama, može se pretpostaviti da intaktne nanokapi mogu da penetriraju u mikropore formirane u koži, omogućavajući tako efikasnu intradermalnu/transdermalnu isporuku inkorporirane lekovite supstance. Međutim, kako efikasnost isporuke leka zavisi ne samo od karakteristika nanonosača, već i od dizajna mikroigala, prvobitno je procenjen uticaj dva tipa čvrstih mikroigala (ImmuPatch silikonske mikroigale vs. AdminPatch<sup>®</sup> 600 mikroigle od čelika, obe dužine 500 µm) različitog materijala, oblika vrha i gustine na integritet kožne barijere u studiji bojenja kože metilenskim plavim i merenjem TEGV.



**Slika 4.4.1.** Mikrografije uzoraka kože uha svinje pre (a) i nakon aplikacije ImmuPatch silikonskih mikroigala dužine 500  $\mu\text{m}$  (b) odnosno, AdminPatch<sup>®</sup> 600 mikroigala od čelika dužine 500  $\mu\text{m}$  (c). Bojenje mikropora formiranih u koži po aplikaciji mikroigala sprovedeno je rastvorom metilenskog plavog.

Metilensko plavo je hidrosolubilna boja, čiji vodeni rastvor je intenzivno plavo obojen. Nakon aplikacije na kožu tretiranu mikroiglama, metilensko plavo difunduje u mikropore ispunjene vodom, koji se posledično boje plavo. Ostatak intaktne kože je nepermeabilan za metilensko plavo, odnosno ne boji se plavom bojom. Kao što se može jasno videti na slici 4.4.1, nakon aplikacije ImmuPatch silikonskih mikroigala primenom posebno dizajniranog aplikatora, formirano je 20 mikropora (4 x 5), što odgovara broju mikroigala na korišćenom *patch*-u. Sa druge strane, nakon aplikacije AdminPatch<sup>®</sup> 600 mikroigala i bojenja tretirane kože metilenskim plavim, uočava se značajno veći broj mikropora, što je u skladu sa značajno većim brojem mikroigala po jedinici površine (187 mikroigala na 1  $\text{cm}^2$ ). Dodatno, treba primetiti da su mikropore formirane u koži nakon aplikacije AdminPatch<sup>®</sup> 600 mikroigala značajno većeg dijametara i intenzivnije plave boje u odnosu na mikropore formirane primenom ImmuPatch silikonskih mikroigala. S obzirom da je način aplikacije mikroigala u oba slučaja bio identičan (pomoću specijalno dizajniranog aplikatora koji obezbeđuje konstantnu silu aplikacije od  $\sim 2$  N), na osnovu izgleda mikropora može se pretpostaviti da se primenom AdminPatch<sup>®</sup> 600 mikroigala postiže efikasnije narušavanje barijerne funkcije SC. Stoga, dalje je sprovedeno merenje TEGV, biofizičkog parametra kojim se direktno prati gubitak vode kroz SC, te je njegovo određivanje korisno za procenu integriteta kožne barijere.

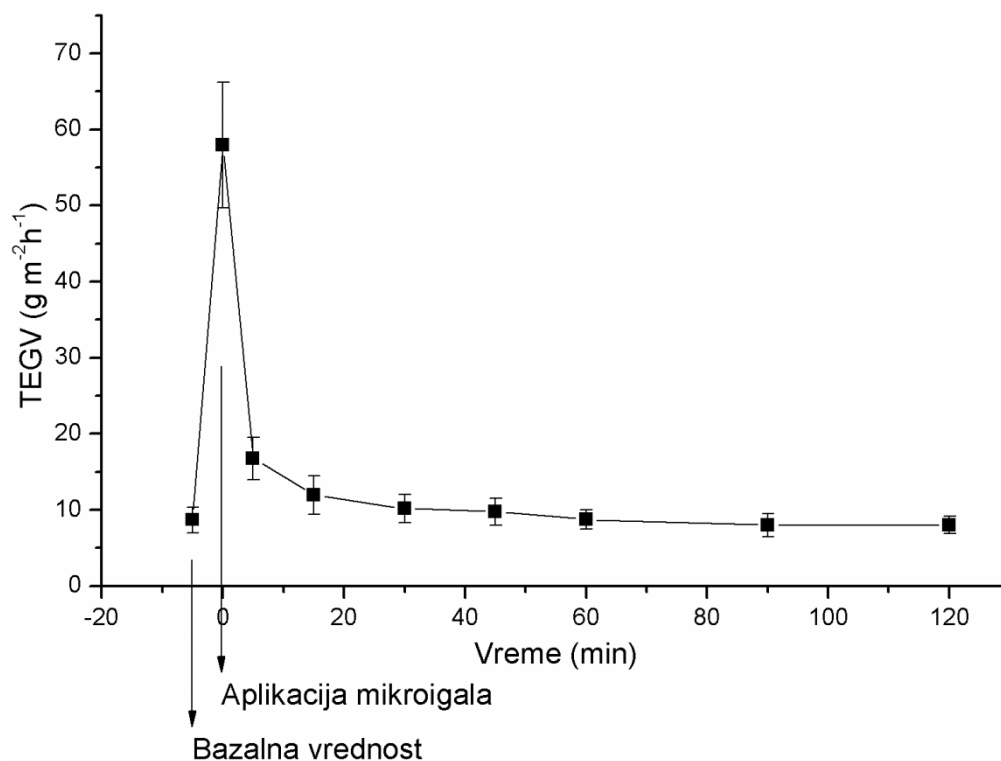




**Slika 4.4.2.** Vrednosti transepidermalnog gubitka vode (TEGV) kože uha svinje pre i nakon aplikacije ImmuPatch silikonskih mikroigala dužine 500  $\mu\text{m}$

Merenjem TEGV neposredno nakon aplikacije ImmuPatch silikonskih mikroigala uočeno je određeno povećanje ( $\sim 2$  puta) vrednosti ovog parametra u odnosu na intaktnu kožu (slika 4.4.2). Međutim, uprkos relativno značajnom skoku TEGV neposredno nakon aplikacije mikroigala, vrednost TEGV se vratila nakon 30 min na inicijalnu/bazalnu vrednost, što ukazuje na zatvaranje mikropora formiranih u koži. Sa druge strane, aplikacija AdminPatch<sup>®</sup> 600 mikroigala, praćena je značajno većim povećanjem vrednosti TEGV ( $\sim 6$  puta) u odnosu na intaktnu kožu (slika 4.4.3), što je u skladu sa vizuelnim izgledom mikropora formiranih u koži (slika 4.4.1). Interesantno, iako je uočeno značajno povećanje vrednosti TEGV nakon aplikacije AdminPatch<sup>®</sup> 600, u roku od 30 min vrednost ovog parametra se vratila na početne/bazalne vrednosti. Slično, Banks i sar. (2010) su merenjem TEGV kože zamoraca (bez dlake) tretirane čvrstim mikroiglama od čelika dužine 750  $\mu\text{m}$  utvrdili da se mikropore zatvaraju u roku od 15 do 30 min, ukoliko se ispitivanje vrši bez okluzije (što je i u ovoj studiji bio slučaj). Iako se smatra da se sa povećanjem gustine mikroigala (broja mikroigala po jedinici površine) povećava rizik od pojave „*bed of nails*“ efekta i nemogućnosti formiranja mikropora (Kalluri i Banga, 2011), na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su AdminPatch<sup>®</sup> 600 mikroigle, u odabranim eksperimentalnim uslovima

značajno efikasnije u narušavanju barijerne funkcije SC u odnosu na ImmuPatch silikonske mikroigle. Stoga, komercijalno dostupne čvrste mikroigle (AdminPatch<sup>®</sup> mikroigle) dužine 500  $\mu\text{m}$  su korišćene u daljem toku eksperimenata, kako bi se formirale pore u površinskim slojevima kože pre aplikacije ispitivanih nanoemulzija, ali ujedno i sprečio kontakt sa kapilarima lokalizovanim u dermisu i receptorima za bol. Za razliku od ImmuPatch silikonskih mikroigala, AdminPatch<sup>®</sup> 600 mikroigle su izrađene od čelika koji je biokompatibilan i koji se već decenijama koristi za proizvodnju igala (npr. hipodermijske igle). Dodatno, zahvaljujući dobrim mehaničkim karakteristikama čelika, rizik od slučajnog lomljenja vrha mikroigala prilikom aplikovanja u kožu je relativno mali (Kim i sar., 2012; Maaden i sar., 2012).



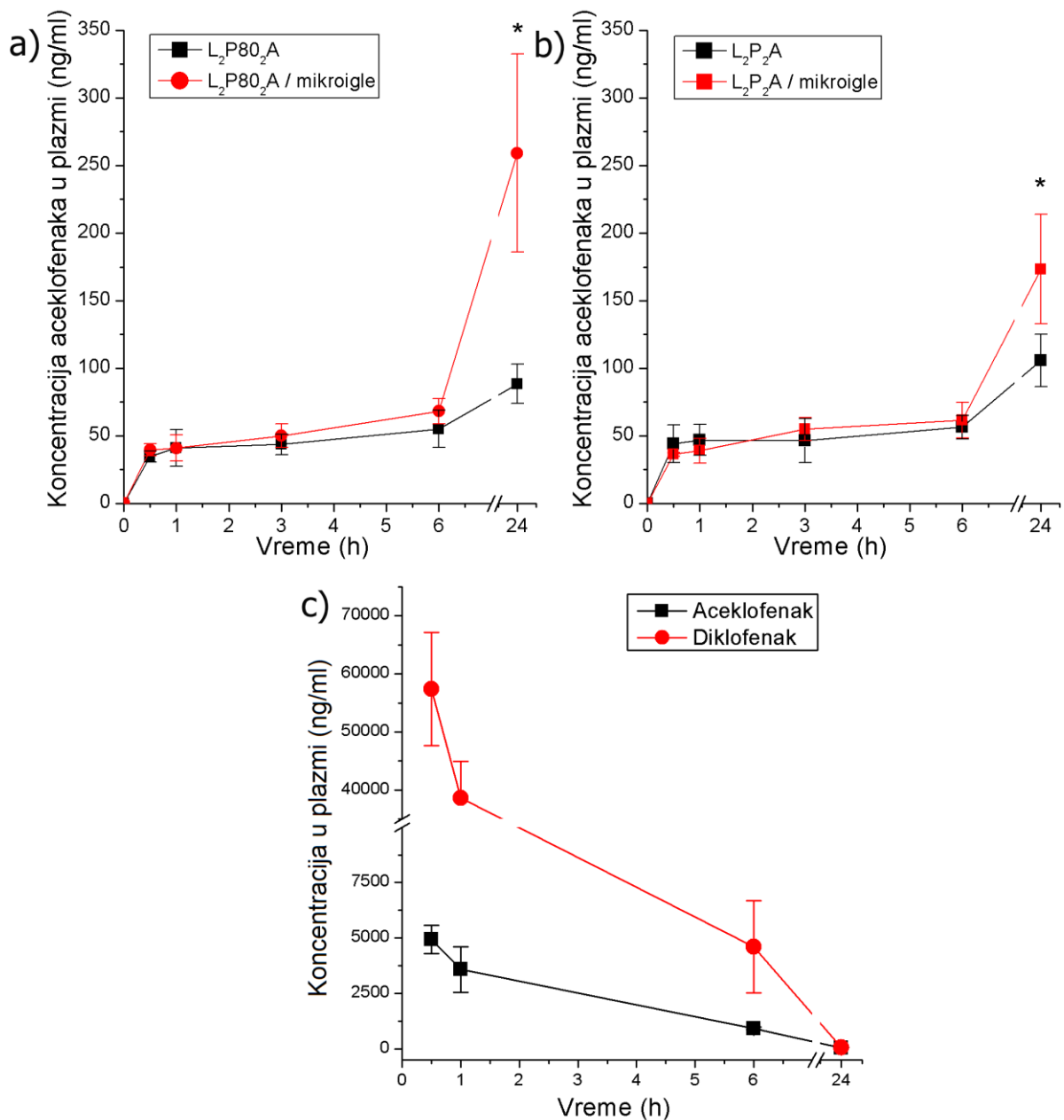
**Slika 4.4.3.** Vrednosti transepidermalnog gubitka vode (TEGV) kože uha svinje pre i nakon aplikacije AdminPatch<sup>®</sup> 600 mikroigala od čelika dužine 500  $\mu\text{m}$

#### 4.4.2 In vivo farmakokinetička studija

Kako bi se ispitalo da li se aceklofenak može uspešno isporučiti u sistemsku cirkulaciju iz razvijenih nanoemulzija, sa i bez predtretmana kože čvrstim mikroiglama (fizičko narušavanje barijerne funkcije SC), kao i da se proceni uticaj sastava stabilisućeg sloja na ulje–voda

međupovršini, pre svega vrste koemulgatora, na stepen/obim i brzinu isporuke aceklofenaka kroz kožu in vivo, sprovedena je farmakokinetička studija na pacovima *Wistar* soja. Pored procene koncentracije aceklofenaka u plazmi tokom vremena, nakon žrtvovanja životinja, sprovedeno je i određivanje ukupne količine aceklofenaka deponovane u koži na kraju eksperimenta. S obzirom da je in vitro ispitivanje permeacije aceklofenaka sprovedeno korišćenjem *dermatomed* kože uha svinje kao membrane, razumno je očekivati da se i in vivo studija sprovede na svinjama, posebno jer se svinja smatra dobrim animalnim modelom za in vivo farmakokinetička ispitivanja (Jung i Maibach, 2015). Međutim, ova vrsta ispitivanja je tehnički teško izvodljiva u standardnim laboratorijama za rad sa eksperimentalnim životinjama. Sa druge strane, iako se korišćenje izolovane kože pacova generalno ne preporučuje za in vitro ispitivanje permeacije zbog značajnih razlika u odnosu na humanu kožu (veća gustina dlaka, razlike u debljini SC, lipidnom profilu, sadržaju vode) (Flaten i sar., 2015; Godin i Touitou, 2007), pacovi se vrlo često koriste u in vivo farmakokinetičkim studijama za procenu efikasnosti transdermalne isporuke, pre svega zbog male veličine, jednostavnog rukovanja i relativno niske cene (Choi i sar., 2012). Dodatno, važno je napomenuti da su Yu i sar. (2014) uočili dobru linearnu korelaciju ( $r > 0,9$ ) između dobijenih vrednosti AUC-a u plazmi pacova i ukupne količine metronidazola koja je permeirala kroz kožu uha svinje iz nanoemulzija in vitro, te su pacovi odabrani za procenu efikasnosti isporuke aceklofenaka iz razvijenih nanoemulzija u sistemsku cirkulaciju.

Profili koncentracija aceklofenaka u plazmi nakon transdermalne primene ispitivanih nanoemulzija (L<sub>2</sub>P<sub>2</sub>A, L<sub>2</sub>P80<sub>2</sub>A), sa i bez predtretmana kože čvrstim mikroglama, kao i nakon intravenske primene rastvora aceklofenaka, prikazani su na slici 4.4.4, a izračunate vrednosti odgovarajućih farmakokinetičkih parametara predstavljene su u tabeli 4.4.1.



**Slika 4.4.4.** Farmakokinetički profili aceklofenaka u plazmi nakon transdermalne primene odabranih nanoemulzija aceklofenaka (L<sub>2</sub>P<sub>2</sub>A, L<sub>2</sub>P80<sub>2</sub>A), sa i bez predtretmana kože mikroiglama (a i b); Farmakokinetički profili aceklofenaka i njegovog metabolita diklofenaka u plazmi nakon intravenske primene rastvora aceklofenaka kod pacova (c). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD (n=3); \* p < 0,05 u poređenju sa vrednošću koncentracije aceklofenaka u plazmi dobijene bez predtretmana kože čvrstim mikroiglama

Kao što grafik prikazuje (slika 4.4.4), nakon primene ispitivanih nanoemulzija na kožu pacova (L<sub>2</sub>P<sub>2</sub>A, L<sub>2</sub>P80<sub>2</sub>A) došlo je do blagog, postepenog povećanja koncentracije aceklofenaka u plazmi u početnim vremenskim tačkama (0,5 – 6h nakon primene na površinu kože), pri čemu

su maksimalne koncentracije postignute tek nakon 24h (tabela 4.4.1), što ukazuje na sporu isporuku aceklofenaka u sistemsku cirkulaciju. Imajući na umu predloženu lokalizaciju aceklofenaka u ispitivanim nanoemulzijama, odložena apsorpcija mogla bi se objasniti vremenom neophodnim za oslobađanje aceklofenaka iz uljanog jezgra/međupovršine u vodenu fazu nanoemulzija kao i, posledično, za njegovu penetraciju/difuziju u/kroz kožu. Iako su prosečne koncentracije aceklofenaka u plazmi imale tendenciju da budu veće nakon primene na kožu L<sub>2</sub>P<sub>2</sub>A nanoemulzije, posebno u poslednjoj vremenskoj tački (24h nakon primene), nije uočena statistički značajna razlika (t-test,  $p > 0,05$ ) prilikom poređenja sa referentnim uzorkom kostabilizovanim polisorbatom 80 (L<sub>2</sub>P80<sub>2</sub>A) (slika 4.4.4). Takođe, nije uočena značajna razlika (t-test,  $p > 0,05$ ) u srednjim vrednostima za AUC<sub>0-24h</sub> između ove dve formulacije (tabela 4.4.1), što dalje ukazuje, da varijacije u tipu koemulgatora upotrebljenog za izradu nanoemulzija nisu uticale na biološku raspoloživost aceklofenaka in vivo. Kada se ovi rezultati uporede sa rezultatima dobijenim prilikom in vitro ispitivanja permeacije, jasno je da rezultati dobijeni korišćenjem kože uha svinje in vitro nisu u potpunosti u skladu sa rezultatima dobijenim in vivo, na pacovima, verovatno usled značajnih razlika u debljini kože i posebno gustini folikula dlake između kože svinje i pacova (Flaten i sar., 2015). Imajući na umu rezultate dobijene diferencijalnim *stripping*-om na koži uha svinje, logično je pretpostaviti da bi, usled veće gustine dlaka, veće preuzimanje nanokapi u folikule moglo biti odgovorno za poboljšanu isporuku aceklofenaka iz referentnog uzorka, odnosno, za gubitak jasnih razlika u pogledu isporuke aceklofenaka u sistemsku cirkulaciju iz ispitivanih uzoraka nanoemulzija.

Sa druge strane, aplikacija mikroigala dovela je do statistički značajnog povećanja (Mann–Whitney U test,  $p < 0,05$ ) maksimalnih koncentracija aceklofenaka u plazmi koje su postignute 24 h nakon primene na kožu pacova ispitivanih formulacija nanoemulzija (tabela 4.4.1). Interesantno, primenom mikroigala, nije uočeno povećanje koncentracije aceklofenaka u plazmi u početnim vremenskim tačkama (0,5 – 6h) (slika 4.4.4). Ovi rezultati ukazuju da nanokapi sa inkorporiranim aceklofenakom mogu da penetriraju u mikropore formirane u SC i vijabilnom epidermisu, ali istovremeno potvrđuju da je oslobađanje aceklofenaka iz uljanog jezgra/međupovršine važan faktor koji određuje brzinu isporuke aceklofenaka iz nanoemulzija u sistemsku cirkulaciju. Interesantno, veće povećanje srednje vrednosti za AUC<sub>0-24h</sub> u plazmi je uočeno prilikom kombinovanja predtretmana kože mikroiglama i L<sub>2</sub>P80<sub>2</sub>A formulacije u odnosu na kombinaciju mikroigle – L<sub>2</sub>P<sub>2</sub>A formulacija.

**Tabela 4.4.1.** Farmakokinetički parametri aceklofenaka dobijeni nakon primene odabranih nanoemulzija (L<sub>2</sub>P<sub>2</sub>A, L<sub>2</sub>P80<sub>2</sub>A) na kožu pacova, sa i bez predtretmana kože čvrstim mikroiglama od čelika (AdminPatch<sup>®</sup> mikroigle) kao i nakon intravenske primene rastvora aceklofenaka kod pacova Wistar soja (srednja vrednost ± standardna devijacija, n=3)

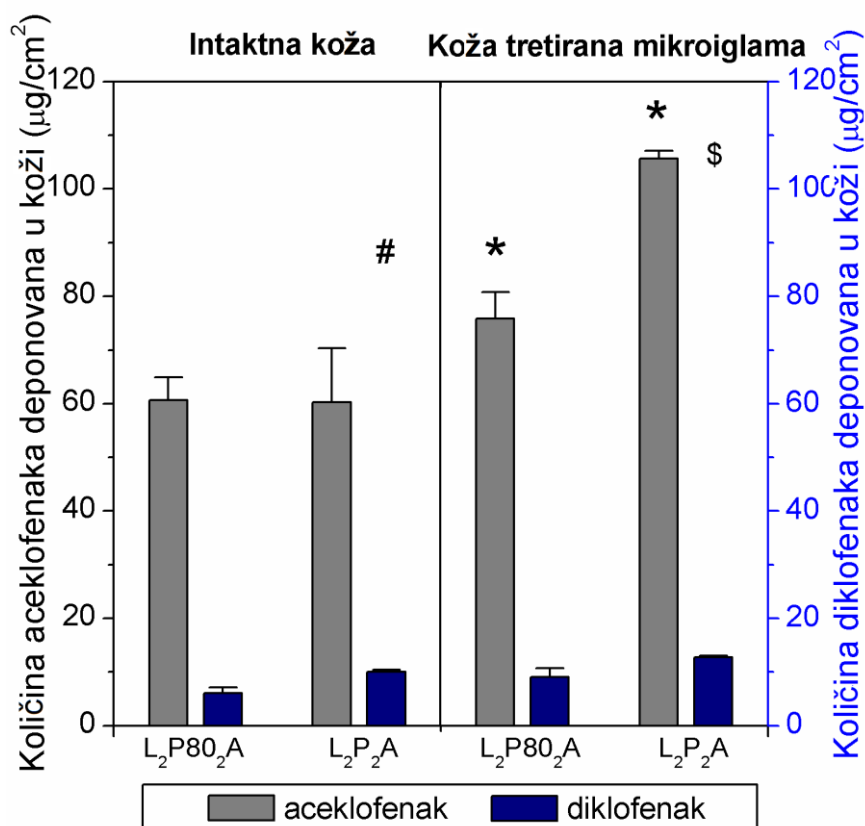
Farmakokinetički parametar	Put primene				
	Intaktna koža		Koža tretirana mikroiglama		Intravenski rastvor
	L <sub>2</sub> P <sub>2</sub> A	L <sub>2</sub> P80 <sub>2</sub> A	L <sub>2</sub> P <sub>2</sub> A	L <sub>2</sub> P80 <sub>2</sub> A	
C <sub>max</sub> (ng/ml)	105,69±19,53	88,38±14,46	173,37±40,50*	259,23±73,18*	5390,03±725,86 <sup>a</sup>
t <sub>max</sub> (h)	24±0	24±0	24±0	24±0	0
AUC <sub>0-24h</sub> (h ng/ml)	1648,58±267,22	1541,37±79,40	2399,19±351,38*	3234,81±650,87*	22149,32±2602,86
F <sub>abs</sub> (%)	7,44	6,96	10,83	14,60	/

C<sub>max</sub> – maksimalna koncentracija aceklofenaka u plazmi; t<sub>max</sub> – vreme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije aceklofenaka u plazmi; AUC<sub>0-24h</sub> ukupna površina ispod krive koncentracije aceklofenaka u plazmi do poslednje vremenske tačke (24 h); F<sub>abs</sub> – apsolutna biološka raspoloživost aceklofenaka (transdermalna naspram intravenske primene); <sup>a</sup> Ekstrapolisana koncentracija aceklofenaka u vremenu t = 0; \* p < 0,05 u poređenju sa vrednošću odgovarajućeg farmakokinetičkog parametra dobijenog bez predtretmana kože čvrstim mikroiglama.

Naime, kao što se može videti iz tabele 4.4.1, vrednost za  $AUC_{0-24h}$  prilikom primene nanoemulzije sa polisorbitom 80 kao koemulgatorom bila je 2,1 puta veća nakon aplikacije mikroigala u odnosu na intaktnu kožu, dok je u slučaju nanoemulzije sa SP kao koemulgatorom, nakon predtretmana kože mikroiglama, detektovano povećanje od svega 1,4 puta. Otuda, logično je pretpostaviti da je sastav stabilizujućeg filma glavni faktor koji određuje interakciju nanokapi sa okolnim tkivom u mikrokanalima formiranim u koži nakon uklanjanja mikroigala, odnosno, tip koemulgatora upotrebljen za stabilizaciju nanoemulzija pre svega određuje stepen i brzinu transdermalne isporuke leka iz nanoemulzija nakon predtretmana kože mikroiglama (Coulman i sar., 2009)

Kako bi se dobio potpuni uvid u farmakokinetiku aceklofenaka nakon transdermalne primene nanoemulzija, sa i bez predtremana kože čvrstim mikroiglama, sprovedeno je i određivanje farmakokinetičkog profila diklofenaka, glavnog metabolita aceklofenaka kod pacova (Noh i sar., 2015). Generalno, rezultati do sada publikovanih studija ukazuju da su nakon oralne/intravenske/subkutane primene rastvora aceklofenaka, koncentracije diklofenaka u plazmi značajno veće u odnosu na koncentracije aceklofenaka u gotovim svim odabranim vremenskim tačkama (Noh i sar., 2015; Todosijević i sar., 2015). Međutim, u ovoj studiji, koncentracije diklofenaka u plazmi, u početnim vremenskim tačkama (0,5 – 6h nakon primene na površinu kože), bile su ispod limita kvantifikacije (5 ng/mL), za obe ispitivane formulacije, nezavisno od predtretmana kože mikroiglama. Takođe, srednje vrednosti koncentracije diklofenaka u plazmi 24 h nakon primene nanoemulzija na intaktnu kožu bile su i dalje značajno manje u odnosu na koncentracije aceklofenaka. Međutim, statistički značajno veća (Mann–Whitney U test,  $p < 0,05$ ) koncentracija diklofenaka u plazmi postignuta je nakon primene  $L_2P_2A$  nanoemulzije ( $115,98 \pm 69,64$  ng/l) u odnosu na  $L_2P_{80_2}A$  formulaciju ( $17,18 \pm 18,82$  ng/ml). Dodatno, predtretman kože mikroiglama doveo je do značajnih varijacija u koncentracijama diklofenaka u plazmi 24 h nakon primene ispitivanih uzoraka – značajno veće povećanje (Mann–Whitney U test,  $p < 0,05$ ) uočeno je nakon kombinovanja perforacije površinskih slojeva kože čvrstim mikroiglama sa  $L_2P_2A$  formulacijom ( $267,06 \pm 48,27$  ng/ml) u poređenju sa  $L_2P_{80_2}A$  nanoemulzijom ( $60,68 \pm 29,70$  ng/ml). Interesantno je istaći da je nakon intravenske primene rastvora aceklofenaka, određena vrednost za  $AUC_{0-24h}$  diklofenaka ( $174168,6 \pm 43042,1$  h ng/ml) bila 8 puta veća u odnosu na odgovarajuću vrednost za aceklofenak ( $22149,3 \pm 2602,9$  h ng/ml). Otuda, potpuno je očigledno da je odnos koncentracija aceklofenaka i diklofenaka u plazmi značajno promenjen nakon primene ispitivanih nanoemulzija na kožu pacova, verovatno usled zaobilaženja intenzivnog metabolizma u jetri (Wermeling i sar., 2008). Štaviše, dobijeni

rezultati istovremeno ukazuju i da je doprinos metabolizma aceklofenaka u koži pacova od strane esteraza lociranih u epidermalnim ćelijama i oko folikula dlake u dermisu relativno mali (Todosijević, 2017).



**Slika 4.4.5.** Količine aceklofenaka i diklofenaka deponovane u koži pacova pune debljine, sa i bez predtretmana kože mikroiglama, 24h nakon primene ispitivanih uzoraka nanoemulzija na površinu kože (L<sub>2</sub>P<sub>2</sub>A, L<sub>2</sub>P80<sub>2</sub>A) (srednja vrednost ± standardna devijacija, n=3); p < 0,05 u poređenju sa količinom aceklofenaka deponovanom u koži pacova iz odgovarajuće nanoemulzije (L<sub>2</sub>P<sub>2</sub>A, L<sub>2</sub>P80<sub>2</sub>A), bez predtretmana kože mikroiglama; # p < 0,05 u poređenju sa količinom diklofenaka deponovanom u koži pacova nakon primene referentnog uzorka (L<sub>2</sub>P80<sub>2</sub>A), bez predtretmana kože mikroiglama; \$ p < 0,05 u poređenju sa količinom diklofenaka deponovanom u koži iz odgovarajuće nanoemulzije (L<sub>2</sub>P<sub>2</sub>A), bez predtretmana kože mikroiglama.

Apsolutna biološka raspoloživost aceklofenaka (transdermalni vs. intravenski put primene) iz svih ispitivanih nanoemulzija bila je manja od 7,5%, što ukazuje da se aceklofenak i njegov aktivni metabolit diklofenak, verovatno akumuliraju u koži i/ili difunduju u dublja tkiva pre nego u sistemsku cirkulaciju. Zaista, određivanjem ukupne količine aceklofenaka



deponovane u koži pacova 24h nakon primene ispitivanih nanoemulzija na intaktnu kožu, može se uočiti da je značajna količina aceklofenaka deponovana u koži pune debljine, ali nije uočena statistički značajna razlika (t-test,  $p > 0,05$ ) između ispitivanih formulacija (slika 4.4.5). U zavisnosti od sastava stabilisućeg filma, odnosno tipa koemulgatora, količina diklofenaka nastala pod dejstvom esteraza kože 24h nakon primene testiranih nanoemulzija, bila je 6 do 10 puta manja u odnosu na količinu diklofenaka (slika 4.4.5). Dodatno, količina diklofenaka deponovana u koži pacova nakon primene razvijene L<sub>2</sub>P<sub>2</sub>A formulacije je bila statistički značajno veća (t-test,  $p < 0,05$ ) u odnosu na količinu detektovanu prilikom primene referentnog uzorka (L<sub>2</sub>P80<sub>2</sub>A), što je bilo u skladu sa značajno većom koncentracijom diklofenaka uočenom u sistemske cirkulaciji (videti iznad).

Sa druge strane, predtretman kože čvrstim mikroiglama doveo je do značajnog (t-test,  $p < 0,05$ ) povećanja vrednosti za količine aceklofenaka i diklofenaka deponovane u koži nakon primene obe ispitivane nanoemulzije, pri čemu je značajnije povećanje uočeno prilikom kombinovanja sa formulacijom u kojoj je SP korišćen kao koemulgator (L<sub>2</sub>P<sub>2</sub>A) (slika 4.4.5). Suprotno, značajno veća apsolutna biološka raspoloživost aceklofenaka je postignuta prilikom kombinovanja perforacije kože čvrstim mikroiglama i nanoemulzije sa polisorbatom 80 kao koemulgatorom (14,60%) u odnosu na kombinaciju mikroigala sa nanoemulzijom kostabilizovanom SP (10,83%) (tabela 4.4.1). Otuda, može se zaključiti da se kombinacijom mikroigala i nanoemulzije sa SP kao koemulgatorom mogu postići veće koncentracije leka u koži/potkožnom tkivu. Sa druge strane, imajući na umu da su Noh i sar. (2015) pokazali da apsolutna biološka raspoloživost aceklofenaka 12 h nakon primene određenog rastvora oralnim putem iznosi približno 15%, dobijeni rezultati ukazuju na značajan potencijal kombinacije čvrstih mikroigala i nanoemulzije sa polisorbatom 80 za poboljšanu isporuku NSAIL u sistemske cirkulaciju, i time, efikasno lečenje različitih bolesti skeletno-mišićnog sistema transdermalnim putem. Međutim, pre donošenja dubljih zaključaka, treba imati na umu da su maksimalne koncentracije aceklofenaka detektovane u poslednjoj odabranoj vremenskoj tački (faza eliminacije nije detektovana), te su stoga, dodatne studije neophodne kako bi se u potpunosti sagledala sudbina aceklofenaka in vivo, sa i bez predtretmana kože mikroiglama, kao i da se utvrdi da li dobijeni rezultati imaju klinički značaj.

## 5. ZAKLJUČAK

### Zaključak prve faze eksperimentalnog rada

- Nakon odgovarajućih preliminarnih ispitivanja i odabira biokompatibilnih i funkcionalnih ekscipijena, primenom metodologije eksperimentalnog dizajna formulisane su i uspešno izrađene (metodom tople (50°C) HPH metode) nanoemulzije kao perspektivni nosači za (trans)dermalnu primenu NSAID. Razvijene formulacije, sa i bez prisustva aceklofenaka, kao model NSAID, sadržale su smešu ricinusovog ulja i MCT u odnosu 1:1 kao uljanu fazu, ultračistu vodu kao vodenu fazu, lecitin iz jajeta kao emulgator i solubilizator, dok su saharoza palmitat P-1670 (SP) i/ili saharoza stearat S-970 (SS) korišćeni kao koemulgatori.
- Primena sveobuhvatnog kombinovanog smeša-proces eksperimentalnog dizajna omogućila je istovremenu analizu efekata komponenti smeše surfaktanata (lecitin iz jajeta, SP i SS), procesnih faktora (pritisak i broj ciklusa homogenizacije), prisustva/odsustva aceklofenaka i njihovih interakcija na CQA nanoemulzija (veličina kapi i PI), kao i istovremenu optimizaciju sastava formulacije i uslova izrade nanoemulzija. Drugim rečima, numerička i grafička optimizacija (sprovedene pomoću eksperimentalnog dizajna) omogućile su pravilan odabir sastava smeše surfaktanata i uslova izrade koji rezultuju nanoemulzijama aceklofenaka željenih karakteristika (najmanja veličina kapi i uska distribucija kapi po veličini). Takođe, utvrđen je visok stepen korelacije između predviđenih i stvarnih (eksperimentalno određenih) vrednosti za posmatrane odgovore sistema, što potvrđuje da je razvijeni kombinovani eksperimentalni dizajn pogodan „alat“ za procenu i optimizaciju sastava formulacije i postupka izrade/proizvodnje nanoemulzija.
- Detaljna fizičko-hemijska karakterizacija odabranih optimalnih formulacija nanoemulzija aceklofenaka pokazala je zadovoljavajući nanometarski opseg veličina kapi (~180 nm,  $D_{max} < 420$  nm), relativno usku raspodelu veličina ( $PI < 0,15$ ), relativno visok zeta potencijal (-39 mV do -52 mV), nizak viskozitet (2,6–4,4 mPa•s) i relativno nisku pH vrednost (3,28–4,19). Interesantno, dodatak aceklofenaka doveo je do određenih promena u vrednostima praćenih parametara, prevažodno do smanjenja veličine kapi optimalnih formulacija nanoemulzija u odnosu na odgovarajuće placebo uzorke, verovatno usled akumulacije u ulje-voda međusloju i smanjenja međupovršinskog napona (potvrđeno merenjem dinamičkog međupovršinskog

napona). Sa druge strane, vrednost zeta potencijala u prisustvu aceklofenaka direktno je zavisila od sastava smeše surfaktanata. Aceklofenak nije uticao na površinsko naelektrisanje optimalnih nanoemulzija koje su sadržale maksimalni ispitivani sadržaj SP (2%) u smeši upotrebljenoj za stabilizaciju, uprkos niskih pH vrednosti ovih uzoraka, dok je doveo do značajnog smanjenja vrednosti negativnog zeta potencijala nanoemulzije sa maksimalnim ispitivanim sadržajem SS (2%). Uočena pojava se može pripisati sternom (zaštitnom) efektu hidrofilnih monoestara saharoze, koji su prisutni u značajno većem procentu u uzorcima stabilizovanim sa 2% SP u smeši.

- Analiza razblaženih uzoraka ispitivanih nanoemulzija primenom AFM tehnike potvrdila je homogenu distribuciju sfernih nanokapi sa srednjim dijametrom približno 180–200 nm, bez prisustva većih kapi, agregata i kristala nerastvornog aceklofenaka. Sa druge strane, karakterizacija nerazblaženih uzoraka sušenih u vakumu ukazala je na formiranje struktura nalik na planarne slojeve i terase, koje potiču od slabe tečnokristalne, i posebno lamelarne gel faze. Logično je očekivati da se opisane strukture mogu formirati na koži nakon aplikacije i isparavanja dela vodene faze iz uzoraka, što dalje može uticati na efikasnost isporuke aceklofenaka u/kroz kožu.
- Rezultati dobijeni DSC metodom ukazali su na odsustvo pika karakterističnog za topljenje aceklofenaka na termogramima odgovarajućih nanoemulzija (nezavisno od tehnike pripreme uzoraka), što potvrđuje da je aceklofenak molekularno dispergovan, odnosno, rastvoren u uljanoj fazi nanoemulzija. Analizom dobijenih FTIR spektara nije uočena pojava novih ili pomeranje postojećih pikova, koji bi potencijalno mogli da ukažu na degradaciju aceklofenaka ili na formiranje novih veza. Drugim rečima, rezultati dobijeni FTIR spektroskopijom potvrđuju odsustvo značajnih hemijskih interakcija aceklofenaka i korišćenih ekscipijenasa u odabranim, optimalnim nanoemulzijama.
- Među nanoemulzijama dobijenim u okviru eksperimentalnog prostora kombinovanog smeša-proces eksperimentalnog dizajna, na osnovu rezultata preliminarne studije stabilnosti tokom tri meseca čuvanja na sobnoj temperaturi, kao obećavajuće odabrane su tri formulacije nanoemulzija koje su sadržale maksimalni ispitivani sadržaj SP u smeši upotrebljenoj za stabilizaciju. Međutim, rezultati ispitivanja dugoročne stabilnosti ukazali su da fizičko-hemijska stabilnost razvijenih nanoemulzija u velikoj meri zavisi od uslova čuvanja i sastava smeše surfaktanata upotrebljenih za stabilizaciju. Uprkos inicijalnoj hipotezi da bi sinergistički efekat između SP i SS mogao da doprinese formiranju nanoemulzija sa poboljšanom dugoročnom fizičkom

stabilnošću, dobijeni rezultati ukazuju da je dodatak SS, kao surfaktanta sa umerenom lipofilnošću kompromitovao stabilnost nanoemulzija. Drugim rečima, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je čuvanje u frižideru ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ), kao i prisustvo hidrofilnog saharoznog estera (kao što je SP) neophodno za postizanje zadovoljavajuće dugoročne fizičko-hemijske stabilnosti, ekvivalente referentnoj nanoemulziji koja je stabilizovana smešom lecitina iz jajeta i polisorbata 80.

- Rezultati merenja ključnih biofizičkih parametara kože nakon primene ispitivanih nanoemulzija aceklofenaka na kožu humanih dobrovoljaca, u tzv. studiji pod okluzijom, ukazali su da razvijene nanoemulzije na bazi saharoznih estera imaju zadovoljavajući bezbednosni profil, komparabilan referentnoj nanoemulziji, izrađenoj primenom široko korišćenog emulgatora u farmaceutskoj industriji, kakav je polisorbit 80, uprkos prisustvu lekovite supstance (aceklofenaka) sa nepovoljnim iritacionim profilom.

Opšti zaključak prve faze eksperimentalnog rada je da se mogu uspešno izraditi nanoemulzije sa aceklofenakom, kao model lekovitom supstancom iz grupe NSAID, zadovoljavajućih fizičko-hemijskih karakteristika, dugoročne stabilnosti i bezbednosnog profila primenom biokompatibilnih emulgatora kao što su lecitin iz jajeta i saharozni esteri. Na objektivni način (karakterizacija sprovedena uporedo sa referentnom nanoemulzijom na bazi lecitina i polisorbata 80) demonstrirana je superiornost hidrofilnog saharoznog estera (SP) u odnosu na saharozni ester umerene lipofilnosti (SS) u obezbeđivanju fizičko-hemijske stabilnosti nanoemulzija aceklofenaka, uz očuvanje zadovoljavajuće podnošljivosti na koži. Takođe, iako prilično kompleksan, kombinovani meša-proces eksperimentalni dizajn je pogodan „alat“ za razvoj i optimizaciju sastava formulacije i postupka izrade/proizvodnje nanoemulzija.

### **Zaključak druge faze eksperimentalnog rada**

- Rezultati druge faze eksperimentalnog rada su nedvosmisleno pokazali da je koncept koji se intenzivno razvija tokom poslednjih nekoliko godina za procenu ekvivalentnosti mikrostrukture generičkog sa odgovarajućim referentnim preparatom, pogodan za detekciju razlika u mikrostrukтури između nedavno razvijenih „ready to use“ podloga na bazi mešanog APG emulgatora (cetearil alkohol i cetearil glukozid), izrađenih variranjem korastvarača/penetracionih inženjera (izopropanol, glicerol) i

konvencionalno korišćene podloge u magistralnoj praksi (nejonski hidrofilni krem) definisanog farmakopejskog kvaliteta.

- Rezultati polarizacione mikroskopije uzoraka na bazi APG emulgatora potvrdili su prisustvo anizotropnih kapi mikrometarskih dimenzija, nasumično raspoređenih u kontinualnoj vodenoj fazi, sa ostacima lamelarne gelske mreže, koja u vidu koncentričnih krugova okružuje veće kapi ili folikule manjih. Interesantno, uprkos malim varijacijama u sastavu (dodatak korastvarača, izopropanola ili glicerola, na račun smanjenja ukupnog sadržaja vode u preparatu) nisu uočene značajne razlike u mikrostrukturi različitih APG uzoraka sa aceklofenakom kao model supstancom. Sa druge strane, značajne razlike u sastavu referentne podloge u odnosu na ispitivane APG uzorke praćene su značajnim razlikama u izgledu mikrostrukture pod mikroskopom (relativno gust matriks, bez jasno vidljivih uljanih kapi). Kristali nerastvornog aceklofenaka značajno su vidljiviji u referentnom uzroku, što ukazuje da podloge na bazi APG emulgatora mogu da rastvore inicijalno suspendovan aceklofenak u određenom (većem) procentu, prevažhodno zahvaljujući specifičnoj mikrostrukturi (ispitivanje uniformnosti sadržaja aceklofenaka potvrdilo je zadovoljavajuću homogenost svih uzoraka).
- Rezultati dobijeni primenom konfokalne Raman spektroskopije bili su u potpunosti u skladu sa rezultatima polarizacione mikroskopije, što ukazuje da je ova tehnika pogodna za dobijanje detaljnijeg uvida u mikrostrukturu i prostornu distribuciju lekovite supstance i ekscipijenasu u ispitivanim uzorcima. Međutim, važno je istaći da prisustvo aceklofenaka nije detektovano u spektrima izvan kristala (u spektru sloja emulgatora/vodene/uljane faze), što ukazuje na određeno ograničenje ove metodologije (koncentracije supstanci potrebne za detekciju primenom konfokalne Raman spektroskopije su značajno više u odnosu na druge analitičke metode).
- Analiza atributa kvaliteta koje se smatraju potencijalno kritičnim za terapijske performanse potvrdila je prisustvo značajnih razlika u mikrostrukturi ispitivanih uzoraka. Naime, date razlike u sastavu ispitivanih podloga uslovile su značajne varijacije u količini aceklofenaka rastvorenoj u ispitivanim podlogama (saturaciona koncentracija), reološkim karakteristikama i načinu distribucije vode u sistemu, što je u potpunosti u skladu sa razlikama uočenim primenom polarizacione mikroskopije i konfokalne Raman spektroskopije. Izuzetak predstavlja pH vrednost, gde nisu detektovane značajne razlike koje bi mogle da dovedu do značajnih varijacija u in vivo performansama ispitivanih uzoraka. Interesantno, iako primenom

mikroskopskih/spektroskopskih tehnika nisu detektovane značajne razlike u mikrostrukturi, male varijacije u sastavu APG podloga (dodatak korastvarača, izopropanola ili glicerola, na račun smanjenja ukupnog sadržaja vode u preparatu) praćene su značajnim promenama u vrednostima praćenih CQA (uticaj izopropanola je bio izraženiji u odnosu na glicerol).

- Uočeno reološko ponašanje uzoraka izrađenih primenom podloga na bazi APG emulgatora, sa umerenom tiksotropijom i relativno niskim vrednostima prinosnog napona, generalno se smatra poželjnim, jer omogućava lako, ravnomerno i homogeno nanošenje inkorporirane lekovite supstance i obrazovanje kontinuiranog filma koji dobro adherira na površinu kože. Drugim rečima, podloge na bazi APG emulgatora poseduju povoljne aplikativne osobine, što je svakako vrlo značajno sa aspekta zadovoljenja zahteva savremenih pacijenata.
- Sveobuhvatnom karakterizacijom tokom tri meseca čuvanja na sobnoj temperaturi potvrđena je dobra fizičko-hemijsku stabilnost podloga na bazi APG emulgatora, komparabilna sa referentom podlogom farmakopejskog kvaliteta, u prisustvu aceklofenaka kao model lekovite supstance. Umesto uobičajenog roka upotrebe do mesec dana za hidrofilne kremove izrađene u apotekama, zahvaljujući zadovoljavajućoj fizičko-hemijskoj stabilnosti, preparati izrađeni sa razvijenim APG podlogama mogu se koristiti tokom tri meseca, kao alternativa preparatima izrađenim sa podlogama farmakopejskog kvaliteta. Svakako, treba razmotriti i mikrobiološku stabilnost, odnosno uključivanje konzervanasa u sastav podloge, kako bi se sprečila mikrobiološka kontaminacija tokom čuvanja i upotrebe.

Opšti zaključak druge faze eksperimentalnog rada je da su razlike u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema izrađenih suspendovanjem aceklofenaka u podloge na bazi APG emulgatora (uz variranje korastvarača) i podlogu farmakopejskog kvaliteta, praćene značajnim razlikama u mikrostrukturi. Međutim, dobijeni rezultati jasno ukazuju da za pouzdanu procenu nivoa sličnosti/razlika između test i referentog preparata, nije dovoljno sprovesti samo vizuelizaciju mikrostrukture. Detaljna analiza CQA, kao što su reološki parametri, način distribucije vode u sistemu, pH vrednost, udeo rastvorenog leka) je neophodna kako bi se detektovale eventualno prisutne, male razlike u mikrostrukturi ispitivanih uzoraka.

## Zaključak treće faze eksperimentalnog rada

- In vitro ispitivanje oslobađanja aceklofenaka kroz sintetsku (polikarbonatnu) membranu iz uzoraka razvijenih tokom prve i druge faze eksperimentalnog rada, sprovedeno primenom modifikovanih Franz-ovih difuzionih ćelija, ukazalo je na značajne razlike u profilima oslobađanja, koje prevashodno potiču od razlika u sastavu i mikrostrukturi. Usled izrazito male veličini kapi nanoemulzija i relativno velikog odnosa površine i zapremine kapi, značajno bolje oslobađanje aceklofenaka uočeno je iz nanoemulzija u odnosu na ispitivane mikrostrukturirane emulzione sisteme. Među nanoemulzijama, značajno veća brzina oslobađanja aceklofenaka postignuta je primenom saharoznih estara kao koemulgatora (posebno primenom SP kao jedinog koemulgatora) u odnosu na polisorbit 80, verovatno kao posledica razlika u strukturi upotrebljenih kosurfaktanata i njihovom prostornom pakovanju na površini nanokapi. Sa druge strane, uočene razlike u reološkom ponašanju i/ili načinu distribucije vode u sistemu imale su presudnu ulogu u oslobađanju aceklofenaka iz mikrostrukturiranih emulzionih sistema – značajno bolje oslobađanje detektovano je iz formulacija na bazi APG emulgatora, u odnosu na referentni uzorak izrađen sa podlogom farmakopejskog kvaliteta.
- Uporedno ispitivanje in vitro brzine oslobađanja aceklofenaka iz razvijenih uzoraka primenom imerzionih (VanKel Enhancer) ćelija ukazalo je da ovaj tip difuzionih ćelija nije pogodan za procenu uticaja malih promena u sastavu formulacije/mikrostrukturi na oslobađanje lekovite supstance. Svakako, ne može se zanemariti i mogućnost promena u samoj strukturi ispitivanih uzoraka (posebno nanonosaa) tokom eksperimenata, usled specifičnog dizajna samih imerzionih ćelija.
- Kako aceklofenak oslobođen iz nosaa primenjenog na površini kože prvo mora da penetrira kroz SC, kao osnovu barijeru za difuziju lekovitih supstanci u/kroz kožu, uspešno je razvijen protokol *tape stripping* metode na koži uha svinje za analizu penetracionih profila odabirom: (1) odgovarajuće metode za procenu integriteta kožne barijere (merenje TEGV), (2) uslova i dužine čuvanja ušiju nakon žrtvovanja svinje (najduže mesec dana u zamrzivaču, na temperaturi  $-20^{\circ}\text{C}$ ), (3) maksimalne dužine kontakta ispitivane formulacije sa kožom (ne duže od 4h zbog dehidracije tkiva), (4) načina vršenja pritiska na adhezivnu traku tokom *tape stripping* procedure (roler) i (5) postupka ekstrakcije aceklofenaka iz uklonjenih slojeva SC.

- Korelacionom analizom rezultata dobijenih *in vitro*, na koži uha svinje, sa rezultatima dobijenim *in vivo*, na humanim dobrovoljcima, utvrđeno je da, uprkos nešto većoj interindividualnoj varijabilnosti podataka dobijenih *in vitro* (usled problema u kontrolisanju starosti i pola svinja, kao i načina njihove ishrane), postoji visok nivo korelacije, što potvrđuje pogodnost razvijenog protokola *tape stripping* metode na koži uha svinje za procenu efikasnosti penetracije lekovite supstance u kožu tokom procesa razvoja i optimizacije formulacije.
- Primenom *in vitro* i *in vivo tape stripping* metode utvrđeno je da je sastav smeše surfaktanata upotrebljenih za stabilizaciju ključni faktor koji određuje razlike u penetracionim profilima aceklofenaka iz razvijenih nanoemulzija, pod *infinite dose* uslovima. Uočeno poboljšanje dermalne raspoloživosti aceklofenaka iz nanoemulzija na bazi saharoznih estara u odnosu na referentni uzorak sa polisorbatom 80, kao uobičajeno korišćenim kostabilizatorom lecitinskih nanoemulzija, može se pripisati sinergističkom efektu nekoliko faktora: 1) maloj veličini kapi koja obezbeđuje veliku površinu, blizak i produžen kontakt sa kožom, uz istovremeno visok koncentracioni gradijent za preuzimanje leka u kožu, 2) boljem oslobađanju aceklofenaka iz uljanog jezgra, odnosno međusloja koji se sastoji iz fosfolipida iz jajeta i saharoznih estara, kao i 3) narušavanju strukture lipidnog dvosloja SC, kombinacijom fosfolipida i saharoznih estara, kao potencijalnih penetracionih inhensera.
- Analizom penetracionih profila dobijenih pri *finite dose* uslovima, potvrđen je trend povećanja količine aceklofenaka koja penetrira u SC iz nanoemulzija baziranih na saharoznim estrima u odnosu na referentnu nanoemulziju sa polisorbatom 80 (bez značajnog uticaja masaže kože primenjene tokom aplikacije uzoraka). Rezultati cijanoakrilatne biopsije površine kože ukazali su na relativno mali doprinos transfolikularnog puta u ukupnoj penetraciji aceklofenaka iz nanoemulzija. Takođe, izgleda da prisustvo polisorbata 80 na međupovršini olakšava preuzimanje nanokapi u folikule dlake pod dejstvom masaže kože, koja imitira fiziološko kretanje dlake.
- Ispitivanjem penetracionih profila iz mikrostrukturiranih emulzionih sistema i njihovom matematičkom analizom (fitovanje u matematičku jednačinu koja opisuje II Fick-ov zakon difuzije) pri *infinite dose* uslovima utvrđena je značajno bolja dermalna raspoloživost aceklofenaka iz uzoraka na bazi APG emulgatora (posebno iz formulacije sa izopropanolom) u odnosu na referentni uzorak izrađen sa konvencionalnom podlogom farmakopejskog kvaliteta. Uočene razlike se mogu pripisati prevashodno razlikama u sastavu/specifičnoj mikrostrukturi i posledično,



razlikama u afinitetu aceklofenaka za SC u odnosu na nosač primenjen na površini kože (razlike u dobijenim AUC vrednostima prevashodno potiču od razlika u SC-nosač partitionom koeficijentu). Sa druge strane, sastav/karakteristike ispitivanih podloga nisu uticale na brzinu apsorpcije aceklofenaka (dodatak izopropanola/glicerola, kao korastvarača i penetracionih inhensera, nije značajno ubrao ni usporio difuziju aceklofenaka kroz SC).

- Analizom penetracionih profila dobijenih pri *finite dose* uslovima i poređenjem sa rezultatima dobijenim primenom nanoemulzija, utvrđeno je da su, u uslovima koji oslikavaju realne uslove primene, zahvaljujući maloj veličini kapi i specifičnom sastavu, ispitivani nanoemulzioni sistemi značajno efikasniji u odnosu na konvencionalne (mikrostrukturirane) emulzione sisteme u pogledu isporuke aceklofenaka u/kroz kožu. Takođe, interesantno, promena eksperimentalnih uslova (*infinite*→*finite dosing*) uslovlila je određene promene u penetraciji aceklofenaka u SC, verovatno usled promena u strukturi ispitivanih uzoraka (prevashodno, formulacija sa izopropanolom kao najefikasnija pri *infinite dose* uslovima, usled isparavanja izopropanola i potencijalne kristalizacije aceklofenaka, pri *finite dose* uslovima se nije značajno razlikovala od uzorka izrađenog sa osnovnom APG podlogom).
- Rezultati dobijeni in vitro ispitivanjem permeacije aceklofenaka kroz *dermatomed* kožu uha svinje debljine 1 mm iz ispitivanih nanoemulzija bili su u potpunosti u skladu sa in vitro profilima oslobađanja, što ukazuje da je oslobađanje glavni faktor koji određuje isporuku aceklofenaka kroz kožu iz nanoemulzija (nanoemulzije sa saharoznim estrima su značajno efikasnije u pogledu isporuke aceklofenaka kroz kožu u odnosu nanoemulziju sa polisorbitom 80).
- Za razliku od nanoemulzija, in vitro permeacioni profili aceklofenaka kroz toplotom izolovani epidermis kože uha svinje iz konvencionalnih mikrostrukturiranih emulzionih sistema nisu bili u potpunosti u skladu sa in vitro profilima oslobađanja. Stepem isporuke aceklofenaka kroz kožu direktno zavisi od reoloških karakteristika, specifičnog načina distribucije vode u mikrostrukturi i posebno, nosač-koža interakcija, za čiju detaljnu procenu je neophodna primena biorelevantnog eksperimentalnog *setting*-a.
- Korelacionom analizom potvrđen je visok nivo korelacije između količine aceklofenaka u SC in vivo i ukupne količine aceklofenaka koja je permeirala kroz kožu in vitro, što ukazuje na pogodnost primene toplotom izolovanog epidermisa kože

uha svinje kao membrane za procenu prisustva/odsustva bioekvivalencije polučvrstih preparata za primenu na koži koji nisu Q1/Q2/Q3 ekvivalentni.

Rezultati sprovedenih ispitivanja tokom treće faze eksperimentalnog rada ukazuju na superiornost ispitivanih nanoemulzija u pogledu isporuke aceklofenaka u/kroz kožu u odnosu na konvencionalne (mikrostrukturirane) emulzione sisteme, koji se mogu izraditi u uslovima apoteke suspendovanjem aceklofenaka u odgovarajuće podloge, istovremeno ističući značaj pravilnog odabira sastava smeše surfaktanata upotrebljenih za izradu nanoemulzija, kako za postizanje odgovarajuće fizičko-hemijske stabilnosti, tako i za efikasnu isporuku inkorporirane lekovite supstance u/kroz kožu. U tom smislu, dodatno treba istaći da dobijeni rezultati ukazuju da su saharozni estri (posebno SP) obećavajući funkcionalni ekscipijensi za formulaciju nanoemulzija, kao nosača NSAIL za primenu na koži. Sa druge strane, iako „*ready-to-use*“ podloge namenjene širokoj primeni u izradi magistralnih lekova zaslužuju posebno „*drvo odluke*“ (engl., *decision tree*) za procenu kvaliteta i biološke raspoloživosti inkorporiranih lekovitih supstanci, pristup baziran na proceni CQA i in vitro/in vivo performansi može da pruži adekvatne dokaze o ekvivalentnosti, odnosno izostanku iste. Poboljšana isporuka aceklofenaka u/kroz kožu, poželjno reološko ponašanje i unapređene organoleptičke karakteristike čine podloge na bazi APG emulgatora (sa/bez korastvarača) boljim izborom u izradi magistralnih lekova u odnosu na podloge farmakopejskog kvaliteta izrađene primenom tradicionalnih nejonskih emulgatora.

### **Zaključak četvrte faze eksperimentalnog rada**

- Merenjem TEGV i bojenjem kože uha svinje vodenim rastvorom metilenskog plavog pre i nakon tretmana kože različitim tipovima čvrstih mikroigala, utvrđeno je da su komercijalno dostupne AdminPatch<sup>®</sup> 600 mikroigle izrađene od čelika dužine 500 μm efikasnije u narušavanju barijerne funkcije SC u odnosu na ImmuPatch silikonske mikroigle iste dužine. Usled značajno veće gustine (broja mikroigala po jedinici površine), primena AdminPatch<sup>®</sup> 600 mikroigala praćena je formiranjem većeg broja mikropora (vidljivo nakon bojenja kože metilenskim plavim) i značajnim porastom vrednosti TEGV neposredno nakon aplikacije
- Sprovođenjem *in vivo* farmakokinetičkih ispitivanja i određivanjem ukupne količine aceklofenaka deponovane u koži pacova *Wistar* soja omogućena je procena efikasnosti isporuke aceklofenaka u kožu, odnosno kroz kožu u sistemsku cirkulaciju iz razvijenih nanoemulzija, sa i bez predtretmana kože čvrstim mikroiglama,

uključujući i procenu uticaja sastava stabilizujućeg sloja nanoemulzija na in vivo farmakokinetiku aceklofenaka, čime je dobijen uvid u značajan potencijal kombinovane primene nanoemulzija i čvrstih mikroigala u lečenju različitih bolesti skeletno-mišićnog sistema putem kože.

- In vivo farmakokinetička studija odabranih nanoemulzija aceklofenaka pokazala je blago, postepeno povećanje koncentracije aceklofenaka u plazmi, sa maksimalnim vrednostima tek 24 h nakon primene ispitivanih nanoemulzija na kožu, što ukazuje na sporu isporuku aceklofenaka u sistemsku cirkulaciju, verovatno usled vremena neophodnog za oslobađanje aceklofenaka iz uljanog jezgra/međupovršine u vodenu fazu nanoemulzija kao i, posledično, za njegovu penetraciju/difuziju u/kroz kožu.
- Za razliku od rezultata dobijenih in vitro ispitivanjem brzine oslobađanja/permeacije koji su ukazali na superiornost nanoemulzije stabilizovane SP, varijacije u tipu koemulgatora upotrebljenog za izradu nanoemulzija nisu uticale na biološku raspoloživost aceklofenaka in vivo. Kako je gustina folikula dlake veća u koži pacova u odnosu na kožu uha svinje, veće preuzimanje nanokapi u folikule potencijalno može biti odgovorno za poboljšanu isporuku aceklofenaka iz referentne nanoemulzije, odnosno, za gubitak jasnih razlika u pogledu isporuke aceklofenaka u sistemsku cirkulaciju iz ispitivanih uzoraka nanoemulzija.
- Aplikacija AdminPatch<sup>®</sup> 600 čvrstih mikroigala od čelika dovela je do značajnog povećanja maksimalnih koncentracija aceklofenaka u plazmi postignutih 24 h nakon primene ispitivanih nanoemulzija, bez značajnog uticaja na isporuku aceklofenaka u početnim vremenskim tačkama. Ovi rezultati ukazuju da nanokapi sa aceklofenakom mogu da penetriraju u mikropore formirane u SC i vijabilnom epidermisu, ali istovremeno potvrđuju da je oslobađanje aceklofenaka iz uljanog jezgra/međupovršine važan faktor koji određuje brzinu isporuke aceklofenaka iz nanoemulzija u sistemsku cirkulaciju.
- Za razliku od intaktne kože, tip koemulgatora upotrebljen za stabilizaciju nanoemulzija direktno je uticao na stepen i brzinu transdermalne isporuke aceklofenaka nakon predtretmana kože mikroiglama (biološka raspoloživost aceklofenaka iz nanoemulzije sa polisorbatom 80 bila je 2,1 puta veća, odnosno 1,4 puta veća iz nanoemulzija sa SP u odnosu na intaktnu kožu). Logično se nameće zaključak da je sastav stabilizujućeg filma glavni faktor koji određuje interakciju nanokapi sa okolnim tkivom u mikroporama formiranim u koži nakon uklanjanja mikroigala.

- Neočekivano, koncentracije diklofenaka, kao glavnog metabolita aceklofenaka kod pacova, bile su značajno manje u plazmi od koncentracija aceklofenaka nakon primene ispitivanih nanoemulzija, sa i bez predtretmana kože čvrstim mikroiglama, verovatno usled zaobilaženja intenzivnog metabolizma u jetri. Dobijeni rezultati istovremeno ukazuju na relativno mali doprinos metabolizma aceklofenaka u koži pacova od strane esteraza lociranih u epidermalnim ćelijama i oko folikula dlake u dermisu.
- Određivanjem ukupne količine aceklofenaka deponovane u koži pacova 24h nakon primene ispitivanih nanoemulzija na intaktnu kožu, utvrđeno je da je značajna količina aceklofenaka deponovana u koži pune debljine, bez značajnih razlika između ispitivanih formulacija. Predtretman kože čvrstim mikroiglama doveo je do značajnog povećanja količine aceklofenaka i diklofenaka deponovane u koži nakon primene obe ispitivane nanoemulzije, pri čemu je značajnije povećanje primenom nanoemulzije sa SP kao koemulgatorom. Sa druge strane, značajno veća apsolutna biološka raspoloživost aceklofenaka je postignuta kombinovanjem perforacije kože čvrstim mikroiglama i nanoemulzije sa polisorbatom 80 kao koemulgatorom (14,60%) u odnosu na kombinaciju mikroigala sa nanoemulzijom kostabilizovanom SP (10,83%).

Na osnovu dobijenih rezultata, kao opšti zaključak četvrte faze eksperimentalnog rada može se izdvojiti da kombinacija čvrstih mikroigala i nanoemulzije sa SP kao koemulgatorom omogućava postizanje veće koncentracije lekovite supstance u koži/potkožnom tkivu. Sa druge strane, dobijeni rezultati ukazuju na značajan potencijal kombinacije čvrstih mikroigala i nanoemulzije sa polisorbatom 80 za poboljšanu isporuku aceklofenaka u sistemske cirkulaciju, i time, za mogućnost lečenja različitih bolesti koštano-mišićnog sistema transdermalnim putem. Na kraju, prikazani nalazi, posmatrani zajedno, ukazuju da efikasnost isporuke lekovite supstance u/kroz kožu primenom nanoemulzija, sa i bez predtretmana kože mikroiglama, zavisi od karakteristika lekovite supstance, samog nosača (sastav/fizičko-hemijski parametri), karakteristika mikroigala, ali i odabira eksperimentalnih uslova. Iako dobijeni rezultati nedvosmisleno ukazuju na poboljšanje isporuke aceklofenaka u/kroz kožu primenom kombinovanog pristupa baziranog na primeni mikroigala i nanoemulzija, dodatne studije su neophodne kako bi se procenilo da li dobijeni nalazi imaju klinički značaj, odnosno, da li imaju značajan uticaj na terapijsku efikasnost aceklofenaka i mogućnost primene u lokalnoj/sistemske terapiji bolesti/povreda skeletno-mišićnog sistema.

## 6. REFERENCE

- Abdayem, R., Roussel, L., Zaman, N., Pirot, F., Gilbert, E., Haftek, M., 2015. Deleterious effects of skin freezing contribute to variable outcomes of the predictive drug permeation studies using hydrophilic molecules. *Exp. Dermatol.* 24, 972–974.
- Aramaki, K., Hayashi, T., Katsuragi, T., Ishitobi, M., Kunieda, H., 2001. Effect of adding an amphiphilic solubilization improver, sucrose distearate, on the solubilization capacity of nonionic microemulsions. *J. Colloid. Interface Sci.* 236, 14–19.
- Arora, A., Prausnitz, M.R., Mitragotri, S., 2008. Micro-scale devices for transdermal drug delivery. *Int. J. Pharm.* 364, 227–236.
- Ayala-Bravo, H.A., Quintanar-Guerrero, D., Naik, A., Kalia, Y.N., Cornejo-Bravo, J.M., Ganem-Quintanar, A., 2003. Effects of sucrose oleate and sucrose laureate on in vivo human stratum corneum permeability. *Pharm. Res.* 20, 1267–1273.
- Bal, S.M., Caussin, J., Pavel, S., Bouwstra, J.A., 2008. In vivo assessment of safety of microneedle arrays in human skin. *Eur. J. Pharm. Sci.* 35, 193–202.
- Bae, D., Shin, J., Shin, G., Jin, F., Park, S., 2009. Effect of lecithin on dermal safety of nanoemulsion prepared from hydrogenated lecithin and silicone oil. *Bull. Korean Chem. Soc.* 30, 821–824.
- Banks, S.L., Pinninti, R.R., Gill, H.S., Paudel, K.S., Crooks, P.A., Brogden, N.K., Prausnitz, M.R., Stinchcomb, A.L., 2010. Transdermal delivery of naltrexol and skin permeability lifetime after microneedle treatment in hairless guinea pigs. *J. Pharm. Sci.* 99, 3072–3080.
- Banks, S.L., Pinninti, R.R., Gill, H.S., Crooks, P.A., Prausnitz, M.R., Stinchcomb, A.L., 2008. Flux across [corrected] microneedle-treated skin is increased by increasing charge of naltrexone and naltrexol in vitro. *Pharm. Res.* 25, 1677–1685.
- Banks, S.L., Paudel, K.S., Brogden, N.K., Loftin, C.D., Stinchcomb, A.L., 2011. Diclofenac enables prolonged delivery of naltrexone through microneedle-treated skin. *Pharm. Res.* 28, 1211–1219.
- Barbero, A.M., Frasch, H.F., 2009. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. *Toxicol. In Vitro* 23, 1–13.
- Bariya, S.H., Gohel, M.C., Mehta, T.A., Sharma, O.P., 2012. Microneedles: an emerging transdermal drug delivery system. *J. Pharm. Pharmacol.* 64, 11–29.
- Baspinar, Y., Keck, C.M., Borchert, H.H., 2010. Development of a positively charged prednicarbate nanoemulsion. *Int. J. Pharm.* 383, 201–208.

- Baspinar, Y., Borchert, H.H., 2012. Penetration and release studies of positively and negatively charged nanoemulsions--is there a benefit of the positive charge? *Int. J. Pharm.* 430, 247–252.
- Beetge, E., du Plessis, J., Müller, D.G., Goosen, C., van Rensburg, F.J., 2000. The influence of the physicochemical characteristics and pharmacokinetic properties of selected NSAID's on their transdermal absorption. *Int. J. Pharm.* 193, 261–264.
- Benita, S., Levy, M.Y., 1993. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. *J. Pharm. Sci.* 82, 1069–1079.
- Bergh, M., Magnusson, K., Nilsson, J.L.G., Karlberg, A.T., 1997. Contact allergenic activity of Tween<sup>®</sup> 80 before and after air exposure. *Contact Dermat.* 37, 9–18.
- Bergh, M., Shao, L.P., Hagelthorn, G., Gäfvert, E., Nilsson, J.L.G., Karlberg, A.T., 1998. Contact allergens from surfactants. Atmospheric oxidation of polyoxyethylene alcohols, formation of ethoxylated aldehydes and their allergenic activity. *J. Pharm. Sci.* 87, 276–282.
- Bhatnagar, S., Dave, K., Venuganti, V.V.K., 2017. Microneedles in the clinic. *J. Control. Release* 260, 164–182.
- Bhinge, J.R., Kumar, R.V., Sinha, V.R., 2008. A simple and sensitive stability-indicating RP-HPLC assay method for the determination of aceclofenac. *J. Chromat. Sci.* 46, 440–444.
- Bernardi, D.S., Pereira, T.A., Maciel, N.R., Bortoloto, J., Viera, G.S., Oliveira, G.C., Rocha-Filho, P.A., 2011. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. *J. Nanobiotechnol.* 9, 44.
- Bodenlenz, M., Tiffner, K.I., Raml, R., Augustin, T., Dragatin, C., Birngruber, T., Schimek, D., Schwagerle, G., Pieber, T.R., Raney, S.G., Kanfer, I., Sinnerm, F., 2017. Open flow microperfusion as a dermal pharmacokinetic approach to evaluate topical bioequivalence. *Clin. Pharmacokinet.* 56, 91–98.
- Bourdon, F., Lecoœur, M., Leconte, L., Ultré, V., Kouach, M., Odou, P., Vaccher, C., Foulon, C., 2016. Evaluation of Pentravan<sup>®</sup>, Pentravan<sup>®</sup> Plus, Phytobase<sup>®</sup>, Lipovan<sup>®</sup> and Pluronic lecithin organogel for the transdermal administration of antiemetic drugs to treat chemotherapy-induced nausea and vomiting at the hospital. *Int. J. Pharm.* 515, 774–787.
- Braddy, A.C., Davit, B.M., Stier, E.M., Conner, D.P., 2015. Survey of international regulatory bioequivalence recommendations for approval of generic topical dermatological drug products. *AAPS J.* 17, 121–133.

- Branvold, A., Carvalho, M., 2014. Pain management therapy: the benefits of compounded transdermal pain. *J. Gen. Practice* 2, 6.
- Breternitz, M., Flach, M., Prässler, J., Elsner, P., Fluhr, J.W., 2007. Acute barrier disruption by adhesive tapes is influenced by pressure, time and anatomical location: integrity and cohesion assessed by sequential tape stripping. A randomized, controlled study. *Br. J. Dermatol.* 156, 231–240.
- Brinkmann, I., Müller-Goymann, C.C., 2003. Role of isopropyl myristate, isopropyl alcohol and a combination of both in hydrocortisone permeation across the human stratum corneum. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 16, 393–404.
- Brune, K., Patrignani, P., 2015. New insights into the use of currently available nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J. Pain Res.* 8, 105–118.
- Bunjes, H., Unruh, T., 2007. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 379–402.
- Buszello, K., Harnisch, S., Müller, R.H., Müller, B.W., 2000. The influence of alkali fatty acids on the properties and the stability of parenteral O/W emulsions modified with Solutol HS15<sup>®</sup>. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 49, 143–149.
- Calderilla-Fajardo, S.B., Cázares-Delgadillo, J., Villalobos-García, R., Quintanar-Guerrero, D., Ganem-Quintanar, A., Robles, R., 2006. Influence of sucrose esters on the in vivo percutaneous penetration of octyl methoxycinnamate formulated in nanocapsules, nanoemulsion, and emulsion. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 32, 107–113.
- Calder, P., Jensen, G., Koletzko, B., Singer, P., Wanten, G., 2010. Lipid emulsions in parenteral nutrition of intensive care patients: current thinking and future directions. *Intensive Care Med.* 36, 735–749.
- Carrer, D.C., Vermehren, C., Bagatolli, L.A., 2008. Pig skin structure and transdermal delivery of liposomes: a two photon microscopy study. *J. Control. Release* 132, 12–20.
- Cevc, G., Vierl, U., 2010. Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. *J. Control. Release* 141, 277–299.
- Chang, R.K., Raw, A., Lionberger, R., Yu, L., 2013a. Generic development of topical dermatological products, Part II: quality by design for topical semisolid products. *AAPS J.* 15, 674–683.
- Chang, R.K., Raw, A., Lionberger, R., Yu, L., 2013b. Generic development of topical dermatologic products: formulation development, process development, and testing of topical dermatologic products. *AAPS J.* 15, 41–52.

- Chen, H., Khemtong, C., Yang, X., Chang, X., Gao, J., 2011. Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. *Drug Discov. Today* 16, 354–360.
- Choi, S.J., Decker, E.A., Henson, L., Popplewell, L.M., Xiao, H., McClements, D.J., 2011. Formulation and properties of model beverage emulsions stabilized by sucrose monopalmitate: influence of pH and lyso-lecithin addition. *Food Res. Int.* 44, 3006–3012.
- Choi, J., Choi, M.K., Chong, S., Chung, S.J., Shim, C.K., Kim, D.D., 2012. Effect of fatty acids on the transdermal delivery of donepezil: in vitro and in vivo evaluation. *Int. J. Pharm.* 422, 83–90.
- Choy, Y.B., Prausnitz, M.R., 2011. The rule of five for non-oral routes of drug delivery: ophthalmic, inhalation and transdermal. *Pharm. Res.* 28, 943–948.
- Chrit, L., Bastien, P., Sockalingum, G.D., Batisse, D., Leroy, F., Manfait, M., Hadjur, C., 2006. An in vivo randomized study of human skin moisturization by a new confocal Raman fiber-optic microprobe: assessment of a glycerol-based hydration cream. *Skin Pharmacol. Physiol.* 19, 207–215.
- Clares, B., Calpena, A.C., Parra, A., Abrego, G., Alvarado, H., Figueiro, J.F., Souto, E.B., 2014. Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: effect on skin permeation. *Int. J. Pharm.* 473, 591–598.
- <https://clinicaltrials.gov/> (poslednji pristup 4.6.2019.)
- 21 CFR 314.94, 2013. Code of Federal Regulations. Title 21—Food and drugs. Chapter I—Food and drug administration department of health and human services subchapter D—Drugs for human use. Part 314—Applications for FDA approval to market a new drug. Subpart C—Abbreviated Applications. Sec.314.94 Content and format of an abbreviated application, 2013.
- Cordery, S.F., Pensado, A., Chiu, W.S., Shehab, M.Z., Bunge, A.L., Delgado-Charro, M.B., Guy, R.H., 2017. Topical bioavailability of diclofenac from locally-acting, dermatological formulations. *Int. J. Pharm.* 529, 55–64.
- Cordero, J.A., Alarcon, L., Escribano, E., Obach, R., Domenech, J., 1997. A comparative study of the transdermal penetration of a series of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J. Pharm. Sci.* 86, 503–508.
- Cornell, J.A., 2002. Experiments with mixtures: Designs, models, and the analysis of mixture data, 3rd ed.. New York, John Wiley & Sons, Inc. pp. 354–437.



- Coulman, S.A., Anstey, A., Gateley, C., Morrissey, A., McLoughlin, P., Allender, C., Birchall, J.C., 2009. Microneedle mediated delivery of nanoparticles into human skin. *Int. J. Pharm.* 366, 190–200.
- Cruces, M.A., Plou, F.J., Ferrer, M., Bernabé, M., Ballesteros, A., 2001. Improved synthesis of sucrose fatty acid monoesters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78, 541–546.
- Csizmazia, E., Budai-Szűcs, M., Erős, I., Makai, Z., Szabó-Révész, P., Varju, G., Csányi, E., 2010. Thermoanalytical method for predicting the hydration effect permanency of dermal semisolid preparations. *J. Therm. Anal. Calorim.* 102, 313–316.
- Csóka, G., Marton, S., Zelko, R., Otomo, N., Antal, I., 2007. Application of sucrose fatty acid esters in transdermal therapeutic systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 65, 233–237.
- Das, S., Ng, W.K., Tan, R.B.H., 2014. Sucrose ester stabilized solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: I. Effect of formulation variables on the physicochemical properties, drug release and stability of clotrimazole-loaded nanoparticles. *Nanotechnology* 25, 105101.
- Dasgupta, S., Dey, S., Choudhury, S., Mazumder, B., 2013. Topical delivery of aceclofenac as nanoemulsion comprising excipients having optimum emulsification capabilities: preparation, characterization and in vivo evaluation. *Expert Opin. Drug Deliv.* 10, 411–420.
- Davis, S.P., Landis, B.J., Adams, Z.H., Allen, M.G., Prausnitz, M.R., 2004. Insertion of microneedles into skin: measurement and prediction of insertion force and needle fracture force. *J. Biomech.* 37, 1155–1163.
- DAC/NRF 2013. Deutscher Arzneimittel Codex, Neues Rezeptur Formularium (DAC/NRF), Stuttgart:Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH, Eschborn Deutscher Apotheker Verlag; 2013.
- DAB, 2006. Deutsches Arzneibuch 2006, Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 2006.
- Donnelly, R.F., Singh, T.R., Tunney, M.M., Morrow, D.I., McCarron, P.A., O'Mahony, C., Woolfson, A.D., 2009. Microneedle arrays allow lower microbial penetration than hypodermic needles in vitro. *Pharm. Res.* 26, 2513–2522.
- Duarah, S., Sharma, M., Wen, J., 2019. Recent advances in microneedle-based drug delivery: special emphasis on its use in paediatric population. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 136, 48–69.

- EFSA, 2012. Panel on plant protection products and their residues (PPR) - guidance on dermal absorption (scientific opinion). *EFSA J.* 10, 1–30.
- EMA, 2014a. Concept paper on the development of a guideline on quality and equivalence of topical products. European Medicine Agency. Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP). London, UK; Dec 2014.
- EMA, 2014b. Guideline on quality of transdermal patches. European Medicine Agency (EMA), 2014. Committee for Medicinal Products for Human use EMA/CHMP/QWP/608924/2014. London, UK; Oct 2014.
- EMA, 2018. Draft guideline on quality and equivalence of topical products. European Medicine Agency. Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP). European Medicine Agency. Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP); Jun 2018.
- Eskandar, N.G., Simovic. S., Prestidge, C.A., 2009. Nanoparticle coated submicron emulsions: sustained in-vitro release and improved dermal delivery of alltrans-retinol. *Pharm. Res.* 26, 1764–1775.
- European Council, 2001. Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council. In: *Off. J. Eur. Communities*.
- Fang, C.L., Aljuffali, I.A., Li, Y.C., Fang, J.Y., 2014. Delivery and targeting of nanoparticles into hair follicles. *Ther. Deliv.* 5, 991–1006.
- Fang, J.Y., Leu, Y.L., Chang, C.C., Lin, C.H., Tsai, Y.H., 2004. Lipid nano/submicron emulsions as vehicles for topical flurbiprofen delivery. *Drug Deliv.* 11, 97–105.
- Fattal, E., Vauthier, C., 2002. Nanoparticles as drug delivery systems. U: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Marcel Dekker, Inc., pp. 1864–1882.
- Fisher, A.C., Lee, S.L., Harris, D.P., Buhse, L., Kozlowski, S., Yu, L., Kopcha, M., Woodcock, J., 2016. Advancing pharmaceutical quality: An overview of science and research in the U.S. FDA's Office of Pharmaceutical Quality. *Int. J. Pharm.* 515, 390–402.
- Fiume, Z., 2001. Final report on the safety assessment of lecithin and hydrogenated lecithin. *Int. J. Toxicol.* 20, 21–45.
- Flaten, G.E., Palac, Z., Engesland, A., Filipović-Grčić, J., Vanić, Ž., Škalko-Basnet, N., 2015. In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 75, 10–24.

- Floury, J., Desrumaux, A., Lardières, J., 2000. Effect of high pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 1, 127–134.
- Fox, C.B., 2009. Squalene emulsions for parenteral vaccine and drug delivery. *Molecules* 14, 3286–3312.
- Friedman, D.I., Schwarz, J.S., Weisspapir, M., 1995. Submicron emulsion vehicle for enhanced transdermal delivery of steroidal and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J. Pharm. Sci.* 84, 324–329.
- Fullerton, A., Fischer, T., Lahti, A., Wilhelm, K.P., Takiwaki, H., Serup, J., 1996. Guidelines for measurement of skin colour and erythema. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis* 35, 1–10.
- Ganem-Quintanar, A., Quintanar-Guerrero, D., Falson-Rieg, F., Buri, P., 1998. Ex vivo oral mucosal permeation of lidocaine hydrochloride with sucrose fatty acid esters as absorption enhancers. *Int. J. Pharm.* 173, 203–210.
- Gao, R., Ren, T., Feng, J., Wang, J., Weng, Y., Yang, R., Tang, X., 2013. Improvement in the efficacy of dexketoprofen by its prodrug in lipid emulsion. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 115, 153–160.
- Gill, H.S., Denson, D.D., Burris, B.A., Prausnitz, M.R., 2008. Effect of microneedle design on pain in human volunteers. *Clin. J. Pain.* 24, 585–594.
- Godin, B., Touitou, E., 2007. Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 1152–1161.
- Gomaa, Y.A., Garland, M.J., McInnes, F.J., Donnelly, R.F., El-Khordagui, L.K., Wilson, C.G., 2014. Microneedle/nanoencapsulation mediated transdermal delivery: mechanistic insights. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 86, 145–155.
- Gupta, J., Gill, H.S., Andrews, S.N., Prausnitz, M.R., 2011. Kinetics of skin resealing after insertion of microneedles in human subjects. *J. Control. Release.* 154, 148–155.
- Gutiérrez, J.M., González, C., Maestro, A., Solè, I., Pey, C.M., Nolla, J., 2008. Nano-emulsions: new application and optimization of their preparation. *Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.* 13, 245–251.
- Haefele, T.F., Paulus, K., 2010. Confocal Raman microscopy in pharmaceutical development, in: Dieing, T., Hollricher, O., Toporski, J. (Eds.), *Confocal Raman Microscopy*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 165–202.
- Hafner, A., Lovrić, J., Lakoš, G.P., Pepić, I., 2014. Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. *Int. J. Nanomedicine* 9, 1005–1023.

- Haroutiunian, S., Drennan, D.A., Lipman, A.G., 2010. Topical NSAID Therapy for Musculoskeletal Pain. *Pain Med.* 11, 535–549.
- Herkenne, C., Naik, A., Kalia, Y.N., Hadgraft, J., Guy, R.H., 2007. Ibuprofen transport into and through the skin from topical formulations: in vitro – in vivo comparison. *J. Invest. Dermatol.* 127, 135–142.
- Herkenne, C., Naik, A., Kalia, Y.N., Hadgraft, J., Guy, R.H., 2006. Pig ear skin ex vivo as a model for in vivo dermatopharmacokinetic studies in man. *Pharm. Res.* 23, 1850–1856.
- Henry, J.V., Fryer, P.J., Frith, W.J., Norton, I.T., 2009. Emulsification mechanism and storage instabilities of hydrocarbon-in-water sub-micron emulsions stabilised with Tweens (20 and 80), Brij 96v and sucrose monoesters, *J. Colloid. Interface Sci.* 338, 201–206.
- Henry, S., McAllister, D.V., Allen, M.G., Prausnitz, M.R., 1998. Microfabricated microneedles: a novel approach to transdermal drug delivery. *J. Pharm. Sci.* 87, 922–925.
- Hippalgaonkar, K., Majumdar, S., Kansara, V., 2010. Injectable lipid emulsions—advancements, opportunities and challenges. *AAPS PharmSciTech* 11, 1526–1540.
- Hoeller, S., Sperger, A., Valenta, C., 2009. Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation. *Int. J. Pharm.* 370, 181–186.
- Holmberg, K., 2001. Natural surfactants. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 6, 148–159.
- Jacobi, U., Kaiser, M., Toll, R., Mangelsdorf, S., Audring, H., Otberg, N., Sterry, W., Lademann, J., 2007. Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Skin Res. Technol.* 13, 19–24.
- Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y., Bhandari, B., 2008. Re-coalescence of emulsion droplets during high energy emulsification. *Food Hydrocolloid.* 22, 1191–1202.
- Jana, S., Manna, S., Nayak, A.K., Sen, K.K., Basu, S.K., 2014. Carbopol gel containing chitosan-egg albumin nanoparticles for transdermal aceclofenac delivery. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 114, 36–44.
- Jung, E.C., Maibach, H.I., 2015. Animal models for percutaneous absorption, in: Shah, V.P., Maibach H.I., Jenner, J. (Eds), *Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence, and Penetration*. Springer, New York, NY, pp. 21–40.

- Jumaa, M., Müller, B.W., 1998a. The effect of oil components and homogenization conditions on the physicochemical properties and stability of parenteral fat emulsions. *Int. J. Pharm.* 163, 81–89.
- Jumaa, M., Kleinebudde, P., Müller, B.W., 1998b. Mixture experiments with the oil phase of parenteral emulsions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 46, 161–167.
- Jumaa, M., Kleinebudde, P., Müller, B.W., 1999. Physicochemical properties and hemolytic effect of different lipid emulsion formulations using a mixture of emulsifiers. *Pharm. Acta Helv.* 73, 293–301.
- Jumaa, M., Müller, B.W., 2000. Lipid emulsions as a novel system to reduce the hemolytic activity of lytic agents: mechanism of the protective effect. *Eur. J. Pharm. Sci.* 9, 285–290.
- Jumaa, M., Müller, B.W., 2001. Development of a novel parenteral formulation for tetrazepam using a lipid emulsion. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27, 1115–1121.
- Kalluri, H., Banga, A.K., 2011. Formation and closure of microchannels in skin following microporation. *Pharm. Res.* 28, 82–94.
- Khandavilli, S., Panchagnula, R., 2007. Nanoemulsions as versatile formulations for paclitaxel delivery: peroral and dermal delivery studies in rats. *J. Invest. Dermatol.* 127, 154–162.
- Kim, Y.C., Park, J.H., Prausnitz, M.R., 2012. Microneedles for drug and vaccine delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 1547–1568.
- Klang, V., Matsko, N., Zimmermann, A.M., Vojnikovic, E., Valenta, C., 2010. Enhancement of stability and skin permeation by sucrose stearate and cyclodextrins in progesterone nanoemulsions. *Int. J. Pharm* 393, 152–160.
- Klang, V., Valenta, C., 2011. Lecithin-based nanoemulsions. *J. Drug Del. Sci. Tech.* 21, 55–76.
- Klang, V., Matsko, N., Raupach, K., El-Hagin, Valenta, C., 2011a. Development of sucrose stearate-based nanoemulsions and optimization through  $\gamma$ -cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79, 58–67.
- Klang, V., Schwarz, J.C., Matsko, N., Rezvani, E., El-Hagin, N., Wirth, M., Valenta, C., 2011b. Semi-solid sucrose stearate-based emulsions as dermal drug delivery systems. *Pharmaceutics* 3, 275–306.
- Klang, V., Matsko, N.B., Valenta, C., Hofer, F., 2012a. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. *Micron* 43, 85–103.

- Klang, V., Schwarz, J.C., Lenobel, B., Nadj M., Auböck, J., Wolzt, M., Valenta, C., 2012b. In vitro vs. in vivo tape stripping: validation of the porcine ear model and penetration assessment of novel sucrose stearate emulsions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 80, 604–614.
- Klang, V., Schwarz, J.C., Valenta, C., 2015. Nanoemulsions in dermal drug delivery, in: Dragicevic, N., Maibach, H., (Eds), Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 255–266.
- Komatsu, T., Sakurada, T., 2012. Comparison of the efficacy and skin permeability of topical NSAID preparations used in Europe. *Eur. J. Pharm. Sci.* 47, 890–895.
- Kong, M., Chen, X.G., Kweon, D.K., Park, H.J., 2011. Investigations on skin permeation of hyaluronic acid based nanoemulsion as transdermal carrier. *Carbohydr. Polym.* 86, 837–843.
- Kovačević, A., 2014. Lipidne nanočestice stabilizovane nejonskim polihidroksilnim surfaktantima: postupak dobijanja, karakterizacija, stabilnost i inkorporiranje lekovite supstance. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Beograd.
- Kretsos, K., Kasting, G.B., 2005. Dermal capillary clearance: physiology and modeling. *Skin Pharmacol. Physiol.* 18, 55–74.
- Krishnaiah, Y.S., Xu, X., Rahman, Z., Yang, Y., Katragadda, U., Lionberger, R., Peters, J.R., Uhl, K., Khan, M.A., 2014. Development of performance matrix for generic product equivalence of acyclovir topical creams. *Int. J. Pharm.* 475, 110–122.
- Kupetz, E., Bunjes, H., 2014. Lipid nanoparticles: drug localization is substance-specific and achievable load depends on the size and physical state of the particles. *J. Control. Release* 189, 54–64.
- Lademann, J., Richter, H., Meinke, M., Sterry, W., Patzelt, A., 2010. Which skin model is the most appropriate for the investigation of topically applied substances into the hair follicles? *Skin Pharm. Phys.* 23, 47–52.
- Lane, M.E., 2013. Skin penetration enhancers. *Int. J. Pharm.* 447, 12–21.
- Larrañeta, E., McCrudden, M.T., Courtenay, A.J., Donnelly, R.F., 2016. Microneedles: A New Frontier in Nanomedicine Delivery. *Pharm. Res.* 33, 1055–1073.
- Lauterbach, A., Müller-Goymann, C.C., 2015. Applications and limitations of lipid nanoparticles in dermal and transdermal drug delivery via the follicular route. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 97, 152–163.

- Leal, L.B., Cordery, S.F., Delgado-Charro, M.B., Bunge, A.L., Guy, R.H., 2017. Bioequivalence methodologies for topical drug products: in vitro and ex vivo studies with a corticosteroid and an anti-fungal drug. *Pharm. Res.* 34, 730–737.
- Lehman, P.A., Raney, S.G., Franz, T.J., 2013. Topical Bioequivalence: A Comprehensive Approach Using Multiple Surrogate Methods, in: Chilcott, R., Brain, K.R., (Eds.), Advances in dermatological sciences. Royal Society of Chemistry, RSC publishing, pp. 210–222.
- Li, P.H., Lu, W.C., 2016. Effects of storage conditions on the physical stability of D-limonene nanoemulsion. *Food Hydrocolloids* 53, 218–224.
- Lim, D.J., Vines, J.B., Park, H., Lee, S.H., 2018. Microneedles: A versatile strategy for transdermal delivery of biological molecules. *Int. J. Biol. Macromol.* 110, 30–38.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46, 3–26.
- Liu, P., Cettina, M., Wong, J., 2009. Effects of isopropanol-isopropyl myristate binary enhancers on in vitro transport of estradiol in human epidermis: a mechanistic evaluation. *J. Pharm. Sci.* 98, 565–572.
- Maaden, K., Jiskoot, W., Bouwstra, J., 2012. Microneedle technologies for (trans)dermal drug and vaccine delivery. *J. Control. Release* 161, 645–655.
- Maisch, T., Santarelli, F., Schreml, S., Babilas, P., Szeimies, R.M., 2010. Fluorescence induction of protoporphyrin IX by a new 5-aminolevulinic acid nanoemulsion used for photodynamic therapy in a full-thickness ex vivo skin model. *Exp. Dermatol.* 19, e302–e305.
- Makris, U.E., Kohler, M.J., Fraenkel, L., 2010. Adverse effects (AEs) of topical NSAIDs in older adults with osteoarthritis (OA): a systemic review of the literature. *J. Rheumatol.* 73, 1236–1243.
- Martanto, W., Davis, S.P., Holiday, N.R., Wang, J., Gill, H.S., Prausnitz, M.R., 2004. Transdermal delivery of insulin using microneedles in vivo. *Pharm. Res.* 21, 947–952.
- Martins, S., Tho, I., Souto, E., Ferreira, D., Brandl, M., 2012. Multivariate design for the evaluation of lipid and surfactant composition effect for optimisation of lipid nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 45, 613–623.

- Mason, T.G., Wilking, J.N., Meleson, K., Chang, C.B., Graves, S.M., 2006. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *J. Phys. Condens. Matter* 18, R635–R666.
- Mathes, C., 2015. Drug delivery to the hair follicle: role of follicular tight junctions as a biological barrier and the potential for targeting clobetasol nanocarriers. Ph.D. Thesis, Der Universität des Saarlandes – Naturwissenschaftlich- Technische Fakultät, Saarbrücken.
- Mathes, C., Brandner, J.M., Laue, M., Raesch, S.S., Hansen, S., Failla, A.V., Vidal, S., Moll, I., Schaefer, U.F., Lehr, C.M., 2016a. Tight junctions form a barrier in porcine hair follicles. *Eur. J. Cell. Biol.* 95, 89–99.
- Mathes, C., Melero, A., Conrad, P., Vogt, T., Rigo, L., Selzer, D., Prado, W.A., De Rossi, C., Garrigues, T.M., Hensen, S., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., Beck, R.C.R., Lehr, C.M., Schaefer, U.F., 2016b. Nanocarriers for optimizing the balance between interfollicular permeation and follicular uptake of topically applied clobetasol to minimize adverse effects. *J. Control. Release* 223, 207–2014.
- McClements, D.J., 2012. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences and similarities. *Soft Matter*. 8, 1719–1729.
- McPherson, M.L., Cimino, N.M., 2013. Topical NSAID formulations. *Pain Med.* 14 suppl 1, S35–S39.
- Melero, A., Hahn, T., Schaefer, U.F., Schneider, M., 2011. In vitro human skin segmentation and drug concentration–skin depth profiles. In: Turksen, K. (ed.), *Permeability Barrier: Methods and Protocols*, New York: Humana Press, pp. 33–50.
- Meyer, W., Kacza, J., Zschemisch, N.H., Godynicki, S., Seeger, J., 2007. Observations on the actual structural conditions in the stratum superficiale dermidis of porcine ear skin, with special reference to its use as model for human skin. *Ann. Anat.* 189, 143–156.
- Mikszta, J.A., Alarcon, J.B., Brittingham, J.M., Sutter, D.E., Pettis, R.J., Harvey, N.G., 2002. Improved genetic immunization via micromechanical disruption of skin-barrier function and targeted epidermal delivery. *Nature medicine* 8, 415–419.
- Milić, J., Čalija, B., Đorđević, S.M., 2017. Diversity and functionality of excipients for micro/nanosized drug carriers, in: Čalija, B., (Ed.), *Microsized and nanosized carriers for nonsteroidal anti-Inflammatory drugs: formulation challenges and potential benefits*. Elsevier, Academic Press, pp. 95–132.



- Milewski, M., Brogden, N.K., Stinchcomb, A.L., 2010. Current aspects of formulation efforts and pore lifetime related to microneedle treatment of skin. *Expert Opin. Drug Deliv.* 7, 617–629.
- Minghetti, P., Pantano, D., Gennari, C.G., Casiraghi, A., 2014. Regulatory framework of pharmaceutical compounding and actual developments of legislation in Europe. *Health Policy* 117, 328–333.
- Miranda, M., Sousa, J.J., Veiga, F., Cardoso, C., Vitorino, C., 2018a. Bioequivalence of topical generic products. Part 1: Where are we now? *Eur. J. Pharm. Sci.* 123, 260–267.
- Miranda, M., Sousa, J.J., Veiga, F., Cardoso, C., Vitorino, C., 2018b. Bioequivalence of topical generic products. Part 2. Paving the way to a tailored regulatory system. *Eur. J. Pharm. Sci.* 122, 264–272.
- Mitri, K., Shegokar, R., Gohla, S., Anselmi, C., Mueller, R.H., 2011. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: preparation, characterization, stability and performance. *Int. J. Pharm.* 414, 267–275.
- Miyano, T., Tobinaga, Y., Kanno, T., Matsuzaki, Y., Takeda, H., Wakui, M., Hanada, K., 2005. Sugar micro needles as transdermic drug delivery system. *Biomedical Microdevices* 7, 185–188.
- Montenegro, L., Sinico, C., Castangia, I., Carbone, C., Puglisi, G., 2012. Idebenone-loaded solid lipid nanoparticles for drug delivery to the skin: in vitro evaluation. *Int. J. Pharm.* 434, 169–174.
- Mooney, K., McElnay, J.C., Donnelly, R.F., 2014. Children's views on microneedle use as an alternative to blood sampling for patient monitoring. *Int. J. Pharm. Pract.* 22, 335–344.
- Morrow, D.I.J., McCarron, P.A., Woolfson, A.D., Donnelly, R.F., 2007. Innovative strategies for enhancing topical and transdermal drug delivery. *Open Drug Deliv. J.* 1, 36–59.
- Mou, D., Chen, H., Du, D., Mao, C., Wan, J., Xu, H., Yang, X., 2008. Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. *Int. J. Pharm.* 353, 270–276.
- Muchtar, S., Abdulrazik, M., Frucht-Perv, J., Benita, S., 1997. Ex vivo permeation study of indomethacin from a submicron emulsion through albino rabbit cornea. *J. Control. Release* 44, 55–64.
- Murthy, N.S., 2016. Critical quality attributes (Q3 characterization) of topical semisolid products. <http://www.pharmtech.com/pharmtech-webcasts> (poslednji pristup 06.03.2019.)

- Müller, R.H., Harden, D., Keck, C.M., 2012. Development of industrially feasible concentrated 30% and 40% nanoemulsions for intravenous drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 38, 420–430.
- Nagelreiter, C., Refffeiner, S., Geyerhofer, C., Klang, V., Valenta, C., 2013. Influence of drug content, type of semisolid vehicle and rheological properties on the skin penetration of the model drug fludrocortisone acetate. *Int. J. Pharm.* 448, 305–312.
- Nagelreiter, C., Mahrhauser, D., Wiatschka, K., Skipliol, S., Valenta, C., 2015. Importance of a suitable working protocol for tape stripping experiments on porcine ear skin: influence of lipophilic formulations and strip adhesion impairment. *Int. J. Pharm.* 491, 162–169.
- Nakada, Y., Awata, N., Nakamichi, C., Sugimoto, I., 1988. The effect of additives on the oral mucosal absorption of human calcitonin in rats. *J. Pharmacobio-Dyn.* 11, 395–401.
- Nam, Y.S., Kim, J.W., Park, J.Y., Shim, J., Lee, J.S., Han, S.H., 2012. Tocopheryl acetate nanoemulsions stabilized with lipid–polymer hybrid emulsifiers for effective skin delivery. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 94, 51–57.
- Nava-Arzaluz, M.G., Calderon-Lojero, I., Quintanar-Guerrero, D., Villalobos-Garcia, R., Ganem-Quintanar, A., 2012. Microneedles as transdermal delivery systems: combination with other enhancing strategies. *Curr. Drug Deliv.* 9, 57–73.
- Nava-Arzaluz, M.G., Piñón-Segundo, E., Ganem-Rondero, A., 2015. Sucrose esters as transdermal permeation enhancers, in: Dragičević, N., Maibach, H., (Eds.), *Percutaneous penetration enhancers: chemical methods in penetration enhancement*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 270–293.
- N'Dri-Stempfer, B., Navidi, W., Guy, R., Bunge, A., 2009. Improved bioequivalence assessment of topical dermatological drug products using dermatopharmacokinetics. *Pharm. Res.* 26, 316–328.
- Nguyen, T.T., Park, J.H., 2018. Human studies with microneedles for evaluation of their efficacy and safety. *Expert Opin. Drug Deliv.* 15, 235–245.
- Nesseem, D.I., 2001. Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26, 387–399.
- Netzlaff, F., Kostka, K.H., Lehr, C.M., Schaefer, U.F., 2006. TEWL measurements as a routine method for evaluating the integrity of epidermis sheets in static Franz type diffusion cells in vitro. Limitations shown by transport data testing. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 63, 44–50.

- Noh, K., Shin, B.S., Kwon, K.I., Yun, H.Y., Kim, E., Jeong, T.C., Kang, W., 2015. Absolute bioavailability and metabolism of aceclofenac in rats. *Arch. Pharm. Res.* 38, 68–72.
- Nornoo, A.O., Wulz, J., Yoon, H., Nan, Y., Lese, M., 2016. Impact of the chemical and physical stability of ketoprofen in various pharmaceutical bases on its topical and transdermal delivery. *Pharm. Dev. Technol.* 21, 204–2013.
- OECD, 2004. Guidance document for the conduct of skin absorption studies. Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 28, 1–31. Paris, France.
- OECD, 2010. OECD Guidance Notes on Dermal Absorption Draft. Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 156, 1–53. Paris, France
- Paleco, R., Vučen, S.R., Crean, A.M., Moore, A., Scalia, S., 2014. Enhancement of the in vitro penetration of quercetin through pig skin by combined microneedles and lipid microparticles. *Int. J. Pharm.* 472, 206–213.
- Pantelić, I., 2013. Dermalna raspoloživost lekova sa antiinflamatornim delovanjem iz podloga sa šećernim emulgatorom: komparativna primena metoda in vitro/in vivo karakterizacije. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Beograd.
- Paolino, D., Ventura, C.A., Nistico, S., Puglisi, G., Fresta, M., 2002. Lecithin microemulsions for the topical administration of ketoprofen: percutaneous adsorption through human skin and in vivo human skin tolerability. *Int. J. Pharm.* 244, 21–31.
- Parfitt, N.R., Skinner, M., Bon, C., Kanfer, I., 2011. Bioequivalence of topical clotrimazole formulations: an improved tape stripping method. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 14, 347–57.
- Patzelt, A., Richter, H., Buettmeyer, R., Huber, H.J., Blume-Peytavi, U., Sterry, W., Lademann, J., 2008. Differential stripping demonstrates a significant reduction of the hair follicle reservoir in vitro compared to in vivo. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70, 234–238.
- Patzelt, A., Richter, H., Knorr, F., Schafer, U., Lehr, C.M., Dahne, L., Sterry, W., Lademann, J., 2011. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. *J. Control. Release* 150, 45–48.
- Patzelt, A., Mak, W.C., Jung, S., Knorr, F., Meinke, M.C., Richter, H., Rühl, E., Cheung, K.Y., Tran, N.B.N.N. and Lademann, J., 2017. Do nanoparticles have a future in dermal drug delivery? *J. Control. Release* 246, 174–182.

- Piemi, M.P., Korner, D., Benita, S., Marty, J. P., 1999. Positively and negatively charged submicron emulsions for enhanced topical delivery of antifungal drugs. *J. Control. Release* 58, 177–187.
- Plessis, J., Stefaniak, A., Eloff, F., John, S., Agner, T., Chou, T.C., Nixon, R., Steiner, M., Franken, A., Kudla, I., Holness, L., 2013. International guidelines for the in vivo assessment of skin properties in non-clinical settings: Part 2. transepidermal water loss and skin hydration. *Skin Res. Technol.* 19, 265–278.
- Pongcharoenkiat, N., Narsimhan, G., Lyons, R.T., Hem, S.L., 2002. The effect of surface charge and partition coefficient on the chemical stability of solutes in o/w emulsion. *J. Pharm. Sci.* 91, 559–570.
- Puglia, C., Rizza, L., Drechsler, M., Bonina, F., 2010. Nanoemulsions as vehicles for topical administration of glycyrrhetic acid: characterization and in vitro and in vivo evaluation. *Drug Deliv.* 17, 123–129.
- Qiu, Y., Gao, Y., Hu, K., Li, F., 2008. Enhancement of skin permeation of docetaxel: a novel approach combining microneedle and elastic liposomes. *J. Control. Release* 129, 144–150.
- Raber, A.S., Mittal, A., Schäfer, J., Bakowsky, U., Reichrath, J., Vogt, T., Schaefer, U.F., Hansen, S., Lehr, C.M., 2014. Quantification of nanoparticle uptake into hair follicles in pig ear and human forearm. *J. Control. Release* 179, 25–32.
- Raney, S.G., Franz, T.J., Lehman, P.A., Lionberger, R., Chen, M.L., 2015. Pharmacokinetics-based approaches for bioequivalence evaluation of topical dermatological drug products. *Clin. Pharmacokinet.* 54, 1095–1106.
- Raza, K., Kumar, M., Kumar, P., Malik, R., Sharma, G., Kaur, M., Katare, O.P., 2014. Topical delivery of aceclofenac: challenges and promises of novel drug delivery systems. *Biomed. Res. Int.* 2014:406731.
- Refai, H., 2001. Dilution of Semisolid Preparations. Ph.D. Thesis, Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig.
- Resolution CM/Res(2016)1 on quality and safety assurance requirements for medicinal products prepared in pharmacies for the special needs of patients. Council of Europe, Committee of Ministers; 2016.
- Roberts, M.S. Dermal absorption and toxicity assessment. CRC Press 2007.
- Roberts, M.S., Cross, S.E., 1999. Percutaneous absorption of topically applied NSAIDs and other compounds: Role of solute properties, skin physiology and delivery systems. *Inflammopharmacology* 7, 339–350.

- Russell, L.M., Guy, R.H., 2009. Measurement and prediction of the rate and extent of drug delivery into and through the skin. *Expert Opin. Drug Deliv.* 6, 355–369.
- Sainsbury, F., Zeng, B., Middelberg, A.P.J., 2014. Towards designer nanoemulsions for precision delivery of therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Eng.* 4, 11–17.
- Savić, S., 2017. Parenteralne nanoemulzije sa slabo rastvorljivim psihofarmakološkim lekovima: formulacija, optimizacija i in vivo procena dispozicije. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Beograd.
- Savić, S., Tamburić, S., Savić, M., 2010. From conventional towards new – natural surfactants in drug delivery systems design: current status and perspectives. *Expert Opin. Drug Deliv.* 7, 353–369.
- Savic, S., Weber, C., Tamburic, S., Savic, M., Müller-Goymann, C., 2009. Topical vehicles based on natural surfactant/fatty alcohols mixed emulsifier: the influence of two polyols on the colloidal structure and in vitro/in vivo skin performances. *J. Pharm. Sci.* 98, 2073–2090.
- Savić, S., Gluščević, I., Milić, J., Vuleta, G., 2005a. Nanodisperzni sistemi kao nosači lekovitih supstanci. *Arh. farm.* 55, 237–254.
- Savic, S., Vuleta, G., Daniels, R., Müller-Goymann, C., 2005b. Colloidal microstructure of binary systems and model creams stabilized an alkylpolyglucoside non-ionic emulsifier. *Colloid Polym. Sci.* 283, 439–451.
- SCCS/1602/18. The SCCS notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation, 10th revision. Scientific Committee on Consumer Safety, 24-25 October 2018.
- Schöler, N., Olbrich, C., Tabatt, K., Müller, R.H., Hahn, H., Liesenfeld, O., 2001. Surfactant, but not the size of solid lipid nanoparticles (SLN) influences viability and cytokine production of macrophages. *Int. J. Pharm.* 221, 57–67.
- Sekkat, N., Kalia, Y.N., Guy, R.H., 2002. Biophysical study of porcine ear skin in vitro and its comparison to human skin in vivo. *J. Pharm. Sci.* 9, 2376–2381.
- Selzer, D., Abdel-Mottaleb, M.M., Hahn, T., Schaefer, U.F., Neumann, D., 2013. Finite and infinite dosing: difficulties in measurements, evaluations and predictions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 278–294.
- Shah, V.P., Yacobi, A., Rădulescu, F.Ş., Miron, D.S., Lane, M.E., 2015. A science based approach to topical drug classification system (TCS). *Int. J. Pharm.* 491, 21–25.

- Shakeel, F., Shafiq, S., Haq, N., Alanazi, F.K., Alsarra, I.A., 2012. Nanoemulsions as potential vehicles for transdermal and dermal delivery of hydrophobic compounds: an overview. *Expert Opin. Drug Deliv.* 9, 953–974.
- Shanley, A., 2016. Topical Formulation: Moving From Art to Science. APIs, Excipients, and Manufacturing 2016. *Supplement to Pharmaceutical Technology* 40 (9).
- Sharma, G., Goyal, H., Thakur, K., Raza, K., Katare, O.P., 2016. Novel elastic membrane vesicles (EMVs) and ethosomes-mediated effective topical delivery of aceclofenac: a new therapeutic approach for pain and inflammation. *Drug Deliv.* 23, 3135–3145.
- Shchipunov, Y.A., 1997. Self-organising structures of lecithin. *Russ. Chem. Rev.* 66, 301–322.
- Silva, H.D., Cerqueira, M.A., Vicente, A.A., 2012. Nanoemulsions for food applications: development and characterization. *Food Bioprocess Technol.* 5, 854–867.
- Silva, A.P., Nunes, B.R., De Oliveira, M.C., Koester, L.S., Mayorga, P., Bassani, V.L., Teixeira, H.F., 2009. Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein. *Pharmazie* 64, 32–35.
- Simões, A., Veiga, F., Vitorino, C., Figueiras, A., 2018. A Tutorial for Developing a Topical Cream Formulation Based on the Quality by Design Approach. *J. Pharm. Sci.* 107, 2653–2662.
- Singh, Y., Meher, J.G., Raval, K., Khan, F.A., Chaurasia, M., Jain, N.K., Chourasia, M.K., 2017. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J. Control. Release* 252, 28–49.
- Sintov, A.C., Botner, S., 2006. Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: influence of skin storage conditions on the in vitro permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems. *Int. J. Pharm.* 311, 55–62.
- Smith, E.W., Maibach, H.I., Surber, C., 2000. Use of emulsions as topical drug delivery systems, in: Nielloud, F., Marti-Mestres, G. (Eds.), *Pharmaceutical Emulsions and Suspensions*. Marcel Dekker, New York, pp. 259–270.
- Soultani, S., Ognier, S., Engasser, J.M., Ghoul, M., 2003. Comparative study of some surface active properties of fructose esters and commercial sucrose esters. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 227, 35–44.
- Söderman, O., Johansson, I., 2000. Polyhydroxyl-based surfactants and their physicochemical properties and applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 4, 391–401.
- Subedi, R.K., Oh, S.Y., Chun, M.K., Choi, H.K., 2010. Recent advances in transdermal drug delivery. *Arch. Pharm. Res.* 33, 339–351.

- SUPAC-SS, 1997. Nonsterile semisolid dosage forms. Scale-up and post approval changes. Chemistry, manufacturing and controls. In vitro release testing and in vivo bioequivalence documentation. US Department of Health and Human Services, Guidance for Industry. Rockville: Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, 1997.
- Surber, C., Smith, E.W., 2005. The mystical effects of dermatological vehicles. *Dermatology* 210, 157–168.
- Suresh, S., Gunasekaran, S., Srinivasan, S., 2014. Studies of the molecular geometry, vibrational spectra, Frontier molecular orbital, nonlinear optical and thermodynamics properties of aceclofenac by quantum chemical calculations. *Spectrochim. Acta A* 125, 239–251.
- Szűts, A., Szabó-Révész, P., 2012. Sucrose esters as natural surfactants in drug delivery systems—a mini-review. *Int. J. Pharm.* 433, 1–9.
- Szűts A, Budai-Szűcs M, Erős I, Otomo N, Szabó-Révész P. 2010. Study of gel-forming properties of sucrose esters for thermosensitive drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* 383, 132–137.
- Sznitowska, M., Janicki, S., Dabrowska, E., Zurowska-Pryczkowska, K., 2001. Submicron emulsions as drug carriers. Studies on destabilization potential of various drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 12, 175–179.
- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., Solans, C., 2004. Formation and stability of nanoemulsions. *Adv. Colloid. Interface Sci.* 108–109, 303–318.
- Todosijević, M., 2017. Formulacija, fizičko-hemijska karakterizacija i biološka ispitivanja biokompatibilnih mikroemulzija za dermalnu i transdermalnu isporuku aceklofenaka. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Beograd.
- Trotta, M., Pattarino, F., Ignoni, T., 2002. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 53, 203–208.
- Ulmer, M., Patzelt, A., Vergou, T., Lademann, J., Richter, H., Kramer, A., Müller, G., Sterry, W., Lange-Asschenfeldt, B., 2012. In vitro investigation of the follicular penetration of porcine ear skin using a nanoparticle-emulsion containing the antiseptic polihexanide. *Laser Phys. Lett.* 9, 381–386.
- US-FDA, 2019. <https://www.fda.gov/drugs/guidances-drugs/product-specific-guidances-generic-drug-development> (poslednji pristup 26.5.2019.)

- US-FDA, 2017a. <https://www.fda.gov/industry/generic-drug-user-fee-amendments/fy2015-regulatory-science-research-report-topical-dermatological-drug-products> (poslednji pristup 26.5.2019.)
- US-FDA, 2017b. <https://www.fda.gov/industry/generic-drug-user-fee-amendments/fy2016-regulatory-science-report-topical-dermatological-drug-products> (poslednji pristup 26.5.2019.)
- US FDA Draft Guidance for industry, 1998. Topical Dermatological Drug Products NDAs and ANDAs – In Vivo Bioavailability, Bioequivalence, In Vitro Release and Associated Studies. Rockville: Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER).
- USP37-NF32, 2014a. United States Pharmacopoeia 37 – National Formulary 32, 2014. Chapter 3: Topical and Transdermal Drug Products – Product Quality Tests, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD 20852.
- USP37-NF32, 2014b. United States Pharmacopoeia 37 – National Formulary 32, 2014. Chapter 795: Pharmaceutical Compounding—Nonsterile Preparations, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD 20852.
- USP37-NF32, 2014c. United States Pharmacopoeia 37 – National Formulary 32, 2014. Chapter 1724: Semisolid drug products—performance tests. United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD 20852.
- van Hoogevest, P., Wendel, A., 2014. The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116, 1088–1107.
- Vučen, S., 2013. Formulacija i karakterizacija rastvorljivih mikroigala za kontrolisanu transdermalnu isporuku ketoprofena inkapsuliranog u polimerne nanočestice. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Beograd.
- Waghule, T., Singhvi, G., Dubey, S.K., Pandey, M.M., Gupta, G., Singh, M., Dua, K., 2019. Microneedles: A smart approach and increasing potential for transdermal drug delivery system. *Biomed. Pharmacother.* 109, 1249–1258.
- Wang, Y., Cory, A.L., 1999. A novel stable supersaturated submicron lipid emulsion of tirilazad. *Pharm. Dev. Technol.* 4, 333–345.
- Wang, J.J., Sung, K.C., Hu, O.Y., Yeh, C.H., Fang, J.Y., 2006. Submicron lipid emulsion as a drug delivery system for nalbuphine and its prodrugs. *J. Control. Release* 115, 140–149.
- Wang, G., Wang, T., 2008. Oxidative stability of egg and soy lecithin as affected by transition metal ions and pH in emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11424–11431.



- Washington, C., 1996. Stability of lipid emulsions for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 20, 131–145.
- Watrobska-Swietlikowska, D., Sznitowska, M., 2006. Partitioning of parabens between phases of submicron emulsions stabilized with egg lecithin. *Int. J. Pharm.* 312, 174–178.
- Wiedersberg, S., Nicoli, S., 2012. Skin permeation assessment: tape stripping, in: Benson, H.A.E., Watkinson, A.C., (Eds.), *Topical and transdermal drug delivery: principles and practice*. Hoboken: John Wiley and Sons Inc, pp. 109–130.
- Williams, A.C., Barry, B.B., 2004. Penetration enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 603–618.
- Welin-Berger, K., Bergenståhl, B., 2000. Inhibition of Ostwald ripening in local anesthetic emulsions by using hydrophobic excipients in the disperse phase. *Int. J. Pharm.* 200, 249–260.
- Wermeling, D.P., Banks, S.L., Hudson, D.A., Gill, H.S., Gupta, J., Prausnitz, M.R., Stinchcomb, A.L., 2008. Microneedles permit transdermal delivery of a skin-impermeant medication to humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105, 2058–2063.
- Wollenweber, C., Makievski, A.V., Miller, R., Daniels, R., 2000. Adsorption of hydroxypropyl methylcellulose at the liquid/liquid interface and the effect on emulsion stability. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 172, 91–101.
- Yacobi, A., Shah, V.P., Bashaw, E.D., Benfeldt, E., Davit, B., Ganes, D., Ghosh, T., Kanfer, I., Kasting, G.B., Katz, L., Lionberger, R., Lu, G.W., Maibach, H.I., Pershing, L.K., Rackley, R.J., Raw, A., Shukla, C.G., Thakker, K., Wagner, N., Zovko, E., Lane, M.E., 2014. Current challenges in bioequivalence, quality, and novel assessment technologies for topical products. *Pharm. Res.* 31, 837–846.
- Yang, M., Zahn, J.D., 2004. Microneedle insertion force reduction using vibratory actuation. *Biomedical Microdevices* 6:3, 177–182.
- Yilmaz, E., Borchert, H.H., 2006. Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema—an in vivo study. *Int. J. Pharm.* 307, 232–238
- Yu, M., Ma, H., Lei, M., Li, N., Tan, F., 2014. In vitro/in vivo characterization of nanoemulsion formulation of metronidazole with improved skin targeting and anti-rosacea properties. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 88, 92–103.

- Zhou, H., Yue, Y., Liu, G., Li, Y., Zhang, J., Gong, Q., Yan, Z., Duan, M., 2010. Preparation and characterization of a lecithin nanoemulsion as a topical delivery system. *Nanoscale Res. Lett.* 5, 224–230.
- Zimmermann, E., Müller, R.H., 2001. Electrolyte- and pH-stabilities of aqueous solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions in artificial gastrointestinal media. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52, 203–210.

## 7. PRILOZI

### 7.1 Publikovani i saopšteni radovi koji čine deo doktorske disertacije

#### Poglavlje u istaknutnoj monografiji od međunarodnog značaja (M14)

1. **Isailović T**, Todosijević M, Đorđević S, Savić S. Natural surfactants-based micro/nanoemulsion systems for NSAIDs – Practical formulation approach, physicochemical and biopharmaceutical characteristics/performances. In: Čalija R (ed). *Microsized and Nanosized Carriers for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Formulation Challenges and Potential Benefits*, Elsevier, p. 179–217, ISBN: 9780128040171, doi: 10.1016/B978-0-12-804017-1.00007-8

#### Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

1. **Ilić T**, Savić S, Batinić B, Marković B, Schmidberger M, Lunter D, Savić M, Savić S. Combined use of biocompatible nanoemulsions and solid microneedles to improve transport of a model NSAID across the skin: in vitro and in vivo studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2018; 125: 110–119 (IF 3,532/2018)

2. **Ilić T**, Pantelić I, Lunter D, Đorđević S, Marković B, Ranković D, Daniels R, Savić S. Critical quality attributes, in vitro release and correlated in vitro skin permeation-in vivo tape stripping collective data for demonstrating therapeutic (non)equivalence of topical semisolids: a case study of "ready-to-use" vehicles. *International Journal of Pharmaceutics* 2017; 528(1-2): 253–267. (IF 3,862/2017)

3. **Isailović T**, Đorđević S, Marković B, Randelović D, Cekić N, Lukić M, Pantelić I, Daniels R, Savić S. Biocompatible nanoemulsions for improved aceclofenac skin delivery: formulation approach using combined mixture-process experimental design. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2016; 105: 308–323. doi: 10.1002/jps.24706 (IF 3,051/2015)

#### Rad u međunarodnom časopisu (M23)

1. Pantelić I, **Ilić T**, Marković B, Savić S, Lukić M, Savić S. A stepwise protocol for drug permeation assessment that combines heat-separated porcine ear epidermis and vertical diffusion cells. *Hemijska industrija* 2018; 72: 47–53. (IF 0,566/2018).

### **Tehnička rešenja – nova metoda (M85)**

1. **Ilić T**, Pantelić I, Marković B, Đorđević S, Lukić M, Savić S. Metoda za in vitro ispitivanje permeacije leka kroz toplotom izolovani epidermis kože uha svinje primenom Franz-ovih difuzionih ćelija.

Pozitivna recenzija recenzenata prof. dr Bojane Obradović i prof. dr Gordane Vulete prihvaćena na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu 15.06.2017. godine, odlukom broj 1152/3.

2. **Ilić T**, Pantelić I, Marković B, Đorđević S, Lukić M, Savić S. Metoda diferencijalnog *stripping*-a na koži uha svinje za procenu dermalne raspoloživosti lekova iz nosača sa nanostrukturom.

Pozitivna recenzija recenzenata prof. dr Bojane Obradović i prof. dr Gordane Vulete prihvaćena na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu 15.06.2017. godine, odlukom broj 1152/2.

### **Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33)**

1. **Ilić T**, Savić S, Pantelić I, Marković B, Savić S. Development of suitable working protocol for in vitro tape stripping: a case study with biocompatible aceclofenac-loaded topical nanoemulsions. 3<sup>rd</sup> Braunschweig International Symposium on Pharmaceutical Engineering Research, Septmeber 25 – 27, 2019, Braunschweig, Nemačka (prihvaćeno).

2. **Ilić T**, Pantelić I, Marković B, Schmidberger M, Daniels R, Savić S. In vitro investigation of the follicular penetration of aceclofenac nanoemulsion: the role of co-emulsifier type and massage. 2<sup>nd</sup> European Conference on Pharmaceutics, April 3-4, 2017, Krakow, Poland.

3. **Ilić T**, Pantelić I, Ranković D, Marković B, Lunter D, Daniels R, Savić S. Natural surfactant–stabilized semisolid emulsion systems with aceclofenac: identification and characterization of critical quality attributes. 11th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, September, 22-24, 2016, Belgrade, Serbia.

4. **Isailović T**, Lunter D, Pantelić I, Đorđević S, Daniels R, Savić S. Aceclofenac nanoemulsions co-stabilized with sucrose esters: ex vivo skin penetration and permeation study. 10<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, April 4-7, 2016, Glasgow, United Kingdom.

5. **Isailović T**, Đorđević S, Lukić M, Pantelić I, Randelović D, Marković B, Savić S. Sucrose esters and polysorbate 80 as co-emulsifiers in development of nanoemulsions for improved aceclofenac skin delivery. 1st European Conference on Pharmaceutics: Drug Delivery, April 13-14, 2015, Reims, France.

6. **Isailović T**, Djordjević S, Pantelić I, Marković B, Cekić N, Daniels R, Savić S. Sucrose esters-based nanoemulsions for improved penetration of aceclofenac: porcine ear skin vs. human skin. 10th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, September 18-20, 2014, Portorož, Slovenia.

7. **Isailović T**, Đorđević S, Todosijević M, Savić SR, Pantelić I, Savić SD. Aceclofenac nanoemulsions co-stabilized with sucrose fatty acid esters: physicochemical properties and stability. 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, March 31-April 3, 2014, Lisbon, Portugal.

#### **Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)**

1. **Isailović T**, Đorđević S, Randelović D, Cekić N, Savić SR, Savić SD. Kombinovani smeša-proces eksperimentalni dizajn u formulaciji nanoemulzija aceklofenaka stabilizovanih biodegradabilnim emulgatorima. II Kongres farmaceuta Crne Gore, Maj 28-31, 2015, Bečići, Crna Gora p. 219-221.

2. **Isailović T**, Đorđević S, Pantelić I, Lukić M, Marković B, Todosijević M, Savić S. Natural sucrose esters as co-emulsifiers in nanoemulsions: Influence on skin performances and drug penetration profile. Skin Forum Annual Meeting 2014: A Joint Conference with APV, September 4-5, 2014, Prague, Czech Republic, p.69.

#### **Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)**

1. **Ilić T**, Savić S, Batinić B, Đoković J, Marković B, Savić M, Savić S. Biokompatibilne nanoemulzije za isporuku aceklofenaka u/kroz kožu primenom hemijskih pojačivača penetracije i čvrstih mikroigala. VII Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, oktobar 10-14, 2018, Beograd, Srbija, p. 354-355.

2. **Isailović T**, Pantelić I, Đorđević S, Lukić M, Marković B, Savić S. Procena penetracije aceklofenaka iz različitih emulzionih sistema: ex vivo vs. in vivo tape stripping. VI Kongres farmaceuta Srbije, Oktobar 15-19, 2014, Beograd, Srbija, p. 377-378.

## 7.2 Biografija autora

Tanja Ilić rođena je 22. februara 1986. godine u Kragujevcu. Osnovnu školu u Kniću i Prvu kragujevačku gimnaziju u Kragujevcu, prirodno-matematički smer, završila je kao nosilac diplome „Vuk Karadžić“. Uporedo je pohađala i nižu muzičku školu u Kniću, a potom i srednju muzičku školu „Dr Miloje Milojević“ u Kragujevcu. Školske 2005/2006. godine upisala je integrisane akademske studije na Univerzitetu u Beogradu–Farmaceutskom fakultetu, smer diplomirani farmaceut, a diplomirala je 2011. godine sa prosečnom ocenom 9,68 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Doktorske akademske studije na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu, modul Farmaceutska tehnologija, upisala je školske 2012/2013. godine. Tokom 2012/2013. godine obavila je pripravnički staž u okviru Apoteke „Beograd“ (apoteka „Đuro Đaković“) i Centralne apoteke Kliničkog centra Srbije. Dva meseca tokom 2015. i 2016. godine boravila je na Institutu za farmaceutsku tehnologiju Eberhard-Karls Univerziteta u Tübingenu (Nemačka) u okviru bilateralnog projekta „*Formulacija mikro-, nano-, i emulzionih sistema bez surfaktanata za slabo rastvorne lekove: razvoj, optimizacija ex vivo i in vivo metoda procene*“ (br. 451-03-01766/2014-09/2).

U periodu od 2012-2014. godine Tanja Ilić je bila zaposlena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Univerziteta u Beogradu Farmaceutskog fakulteta kao saradnik u nastavi, gde je učestvovala u izvođenju praktične nastave na obaveznim predmetima Farmaceutska tehnologija 1 i Farmaceutska tehnologija 2, i izbornom predmetu Kozmetologija. Od decembra 2014. godine angažovana je kao istraživač-pripravnik, a od januara 2016-2018. godine kao istraživač-saradnik na projektu iz oblasti tehnološkog razvoja: „*Razvoj mikro- i nanosistema kao nosača za lekove sa antiinflamatornim delovanjem i metoda za njihovu karakterizaciju*“ (TR 34031), Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. U septembru 2018. godine izabrana je u zvanja asistenta na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju.

Autor je i koautor 2 poglavlja u istaknutim monografijama od međunarodnog značaja (M14), jednog rada u tematskom zborniku od međunarodnog značaja (M14), 7 radova u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), jednog rada u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), 5 radova u međunarodnim časopisima (M23), jednog rada u naučnom časopisu (M53), 21 saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u celini (M33), 7 saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u izvodu (M34), 4 saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64) i 3 tehnička rešenja – nova metoda (M85) i jednog bitno poboljšanog tehničkog rešenja na međunarodnom nivou (M83).

### 7.3 Izjava o autorstvu

#### Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Tanja Ilić

Broj indeksa: 20/12

#### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Mikro- i nanostrukturirani emulzioni sistemi na bazi polihidroksilnih surfaktanata za isporuku aceklofenaka u/kroz kožu primenom hemijskih pojačivača penetracije i mikroigala

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis autora:**

U Beogradu, 3.9.2019. godine

Tanja Ilić

#### 7.4. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

##### Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije dokorskog rada

Ime i prezime autora: Tanja Ilić

Broj indeksa: 20/12

Studijski program: Doktorske akademske studije, modul Farmaceutska tehnologija

Naslov rada: Mikro- i nanostrukturirani emulzioni sistemi na bazi polihidroksilnih surfaktanata za isporuku aceklofenaka u/kroz kožu primenom hemijskih pojačivača penetracije i mikroigala

Mentor: prof. dr Snežana Savić

Izjavljujem da je štampana verzija mog dokorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjenja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis autora**

U Beogradu, 3.9.2019. godine

Tanja Ilić



## 7.5 Izjava o korišćenju

### Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Mikro- i nanostrukturirani emulzioni sistemi na bazi polihidroksilnih surfaktanata za isporuku aceklofenaka u/kroz kožu primenom hemijskih pojačivača penetracije i mikroigala

koja je moje autorski delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sa u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.  
Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

**Potpis autora**

U Beogradu, 3.9.2019. godine

Tanja Ilić

1. Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.