

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU UNIVERZITETA U BEOGRADU –
FARMACEUTSKOG FAKULTETA**

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU – DOKTORSKE STUDIJE

Na sednici Nastavno-naučnog veća Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, održanoj 24.12.2020. godine, imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata Vedrane Savić, magistra farmacije, pod naslovom:

„Dermalna isporuka takrolimusa - uporedna formulaciona i pretklinička istraživanja mikroemulzija, nanoemulzija i nanostrukturiranih lipidnih čestica kao naprednih nosača za slabo rastvorne lekovite supstance“

Komisija u sastavu:

1. Dr Snežana Savić, redovni profesor, mentor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
2. Dr Ivana Pantelić, docent
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. Dr Nebojša Cekić, vanredni profesor,
Univerzitet u Nišu – Tehnološki fakultet u Leskovcu

pregledala je priloženu disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta sledeći izveštaj:

IZVEŠTAJ

1. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija pod nazivom: **„Dermalna isporuka takrolimusa - uporedna formulaciona i pretklinička istraživanja mikroemulzija, nanoemulzija i nanostrukturiranih lipidnih čestica kao naprednih nosača za slabo rastvorne lekovite supstance“** napisana je na 113 strana i sadrži šest poglavlja: uvod, cilj istraživanja, eksperimentalni deo, rezultati i diskusija, zaključak i literaturu. Na početku doktorske disertacije je priložen sažetak na srpskom i engleskom jeziku, a na kraju se nalazi spisak publikovanih i saopštenih radova koji čine deo doktorske disertacije, kratka biografija kandidata, i potpisane izjave kandidata o autorstvu, istovetnosti štampane i elektronske verzije i korišćenju doktorske disertacije.

Doktorska disertacija sadrži 39 slika i to 10 u uvodu, 1 u eksperimentalnom delu i 28 u rezultatima i diskusiji. Disertacija sadrži i 15 tabela: 1 u uvodu, 1 u eksperimentalnom delu i 13 u rezultatima i diskusiji. U pregledu literature navedeno je 200 relevantnih naučnih radova, udžbenika i saopštenja.

U **uvodu** je kandidatkinja jasno i koncizno predstavila relevantne informacije i definisala pojmove od značaja za predmet proučavanja ove disertacije. U prvom delu uvoda predstavljen je takrolimus, model lekovita supstanca koja je korišćena u istraživanjima prvenstveno zbog slabe rastvorljivosti u vodi. Ukratko je opisano otkriće takrolimusa, njegove fizičko-hemijske osobine, mehanizam dejstva, primena i farmakokinetika. Posebno su obrazloženi izazovi u razvoju novih formulacija za dermalnu isporuku takrolimusa, što je upravo fokus ove doktorske disertacije. Drugi deo uvoda odnosi se na tehnike kojima se

može prevazići slaba rastvorljivost lekovitih supstanci. Ukratko su prikazani pristupi korišćenju preleka, formiranje soli, upotreba amorfnih oblika lekovitih supstanci, solubilizacija lekovite supstance i upotreba naprednih lipidnih nosača u cilju poboljšanja rastvorljivosti lekovitih supstanci. Treći deo uvoda fokusira se na kožu kao barijeru za isporuku lekovitih supstanci. U ovom delu je opisana struktura kože sa fokusom na *stratum corneum* - površinski sloj kože koji je najviše odgovoran za njenu barijernu funkciju. Dodatno, opisani su putevi kojima se supstance mogu isporučiti u kožu ili kroz kožu, kao što su intercelularni put, intracelularni put i transfolikularni/transapendagealni put, i od čega najviše zavisi kojim će putem pojedine supstance prodrti u/kroz kožu. Budući da je dermalna isporuka takrolimusa predmet istraživanja ove doktorske disertacije, četvrti deo uvoda sadrži informacije o strategijama koje se mogu koristiti u cilju poboljšanja dermalne isporuke lekovitih supstanci. Tu su opisane pojedine aktivne strategije, kod kojih je neophodno koristiti spoljašnji izvor energije, kao što su jontoforeza, elektroporacija, sonoforeza i magnetoforeza. Dalje, opisane su i druge strategije, kao što je korišćenje mikroigala, hemijskih pojačivača penetracije, biohemijske tehnike i primena formulacionih pristupa (supersaturacija, primena jonskih parova, eutektičkih smeša i različitih nosača). Peti deo uvoda opisuje mikroemulzije, nanoemulzije i lipidne nanočestice kao primere koloidnih nosača od interesa u ovoj doktorskoj disertaciji. Koncizno su date definicije ovih nosača, opisani postupci njihove izrade, a takođe su prikazane i njihove karakteristike i međusobne razlike. Šesti, sedmi i osmi deo uvoda posvećeni su primeni mikroemulzija, nanoemulzija i lipidnih čestica respektivno, za dermalnu isporuku lekova. U ovim delovima stavljen je fokus na moguće mehanizme kojima ovi nosači poboljšavaju dermalnu isporuku i navedeni su primeri lekovitih supstanci za koje postoje literaturni podaci o boljoj dermalnoj isporuci upotrebom navedenih nosača.

Ciljevi istraživanja su jasno definisani i realizovani korišćenjem metodologije koja je opisana u eksperimentalnom delu. Najpre, bilo je poželjno sagledati mogućnost dobijanja mikroemulzija korišćenjem lecitina poreklom iz soje kao surfaktanta uz variranje kosurfaktanta (etanol, izopropanol, propilenglikol) i/ili masne faze (propilenglikol monokaprilat ili kaprilno-kapriniski triglicerid), kao i uporediti efekat koji ovi ekscipijensi imaju na mogućnost nastanka što većih mikroemulzionih oblasti na pseudoternarnim faznim dijagramima, odnosno mogućnost dobijanja mikroemulzija u raznovrsnim masenim odnosima surfaktanta/kosurfaktanta/ulja/vode. Slično tome, sagledana je mogućnost dobijanja nanostrukturiranih lipidnih čestica korišćenjem lecitina poreklom iz soje kao surfaktanta, a variranjem različitih formulacionih i procesnih parametara, kako bi se identifikovali kritični parametri u razvoju ovih nosača. Takođe je bilo poželjno ispitati i mogućnost formiranja nanoemulzije korišćenjem sličnih formulacionih i procesnih parametara, pri čemu bi jedina razlika bila to da se masna faza sastoji isključivo od tečnog lipida - ulja, a ne od smeše tečnog i čvrstog lipida kao što je slučaj kod nanostrukturiranih lipidnih čestica. Cilj nastavka istraživanja bila je detaljna fizičkohemijska karakterizacija odabranih nosača, provera njihove stabilnosti i procena iritacionog potencijala mikroemulzionih formulacija budući da one sadrže najviši maseni udeo surfaktanta i kosurfaktanta koji mogu dovesti do iritacije kože. Na kraju, nakon razvoja nosača i njihove fizičkohemijske karakterizacije, bilo je važno detaljno i sistematično proceniti dermalnu raspoloživost takrolimusa kao model lekovite supstance iz optimalnih mikroemulzija, nanoemulzija i nanostrukturiranih lipidnih čestica, uporediti efekte ovih nosača sa referentnim preparatom koji je dostupan na tržištu (Protopic[®], mast sa takrolimusom), kao i uporediti međusobno razvijene nosače u pogledu dermalne isporuke takrolimusa.

U **eksperimentalnom delu** ove doktorske disertacije prikazan je detaljni opis materijala i metoda korišćenih u istraživanju, kao što su postupci izrade mikroemulzija, nanoemulzija i

nanostrukturiranih lipidnih čestica, njihova opsežna fizičko-hemijska i biofarmaceutska karakterizacija. Korišćene metode i protokoli su odgovarajući za dobijanje objektivnih i pouzdanih rezultata i u skladu su sa savremenim zahtevima naučno-istraživačkog rada.

U prvoj fazi eksperimentalnog rada najpre je sprovedeno ispitivanje rastvorljivosti takrolimusa u određenim ekscipijensima kako bi se procenilo koji se ekscipijensi mogu koristiti u izradi nanonosača tako da se osigura adekvatna solubilizacija takrolimusa. Potom je detaljno opisan proces konstruisanja pseudoternarnih faznih dijagrama u cilju razvoja mikroemulzionih sistema, a takođe su navedeni ekscipijensi koji su varirani kako bi se utvrdio njihov efekat na mogućnost nastajanja što veće mikroemulzione oblasti na pseudoternarnim faznim dijagramima, odnosno kako bi se omogućilo nastajanje mikroemulzija pri različitim masenim odnosima surfaktant-kosurfaktant/ulje/voda. Potom su opisane tehnike koje su korišćene kako bi se utvrdio tip nastalih mikroemulzija (ulje u vodi / bikontinuirane / voda u ulju mikroemulzije) i to studija provodljivosti mikroemulzionih sistema tokom razblaživanja, kao i diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) tokom hlađenja mikroemulzija. Na kraju je naveden način pripreme mikroemulzija koje su odabrane sa pseudoternarnih faznih dijagrama kao eksperimentalne formulacije za dalja istraživanja i postupak inkorporacije model lekovite supstance u odabrane mikroemulzije.

Druga faza eksperimentalnog rada fokusira se na razvoj nanostrukturiranih lipidnih čestica, pri čemu su varirani različiti formulacioni i procesni parametri kako bi se ispitaio njihov uticaj na nastanak i stabilnost ovih naprednih nosača. Imajući u vidu to da se nanostrukturirane lipidne čestice sastoje od lipidnog matriksa dobijenog mešanjem čvrstog i tečnog lipida, najpre je opisan postupak odabira masne faze i odnosa ovih lipida korišćenjem DSC analize. Dalje je opisan postupak homogenizacije pod visokim pritiskom uz zagrevanje, koji je korišćen u cilju izrade ovih nosača i odgovarajuće nanoemulzije, kao i proces inkorporacije model lekovite supstance. Na kraju, u potpoglavlju "*Variranje formulacionih i procesnih parametara u izradi nanostrukturiranih lipidnih čestica*" definisani su varirani parametri (odnos čvrstog i tečnog lipida u masnoj fazi, količina ukupne lipidne faze, ukupna količina surfaktanata lecitina i polisorbata 80, primena samo jednog surfaktanta - lecitina ili polisorbata 80, broj ciklusa homogenizacije, pritisak tokom homogenizacije, temperatura hlađenja nakon homogenizacije) kako bi se procenilo koji od njih su ključni za dobijanje optimalne formulacije sa zadovoljavajućom stabilnošću.

U trećoj fazi eksperimentalnog dela opisana je metodologija korišćena u opsežnoj fizičko-hemijskoj karakterizaciji odabranih mikroemulzija, nanoemulzija i nanostrukturiranih lipidnih čestica, kao i postupak sprovođenja studije stabilnosti ovih formulacija kako bi se identifikovale ključne razlike između njih. Dodatno je procenjena mogućnost inkorporiranja model lekovite supstance, kao i njen uticaj na osobine samih nosača. Među korišćenim metodama navedene su fotonska korelaciona spektroskopija i laserska difrakcija korišćene u analizi veličine kapi/čestica i indeksa polidisperziteta, merenje elektroforetske pokretljivosti kapi/čestica kako bi se odredio zeta potencijala, merenje pH i provodljivosti formulacija, reološka analiza, efikasnost inkorporacije takrolimusa, polarizaciona mikroskopija, procena fizičkog stanja takrolimusa primenom DSC analize uz zagrevanje, elektronska paramagnetna rezonantna spektroskopija (EPR) i infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR).

Četvrta faza eksperimentalnog dela odnosi se na preliminarnu procenu bezbednosnog profila / iritacionog potencijala placebo mikroemulzionih formulacija primenom *in vivo* biofizičkih merenja kritičnih parametara stanja kože. U 24-časovnoj studiji pod okluzijom su korišćene mikroemulzije, koje, usled najvećeg masenog udela surfaktanta i kosurfaktanata, predstavljaju rizik od razvoja iritacije kože. Imajući u vidu to da je takrolimus snažna

imunosupresivna supstanca, kao i to da je cilj proceniti preliminarni bezbednosni profil samih mikroemulzija, potpuno opravdano su korišćene mikroemulzije bez lekovite supstance - placebo mikroemulzije - kako se humani dobrovoljci ne bi nepotrebno izlagali efektu ove potentne model lekovite supstance. Kao kritični parametri stanja kože praćeni su transepidermalni gubitak vode (TEGV), eritema indeks (EI) i hidratacija *stratum corneum*-a (SCH), čije vrednosti pre i nakon tretmana mogu da ukažu na iritaciju kože i/ili narušavanje kožne barijere. Ispitivanja na humanim dobrovoljcima sprovedena su u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a primenjeni protokol je odobren od strane Etičkog komiteta za biomedicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta (Odluka br. 667/2 doneta 07.04.2017).

U petoj fazi eksperimentalnog dela obrađene su metode korišćene za biofarmaceutsku karakterizaciju najperspektivnijih uzoraka razvijenih nosača. Najpre je prikazana *in vitro* metoda za ispitivanje oslobađanja takrolimusa iz formulacija korišćenjem Franz-ovih difuzionih ćelija, kao i matematički modeli koji će biti korišćeni u cilju opisivanja kinetike oslobađanja takrolimusa (model kinetike nultog reda, model kinetike prvog reda, Higuchi model, Korsmeyer–Peppas model, Hixson Crowell model). Potom sledi opis metoda korišćenih u proceni dermalne isporuke lekovite supstance, kao što su: *in vitro* ispitivanje dermalne raspoloživosti / penetracije takrolimusa iz mikroemulzija u kožu uha svinje primenom metode sa trakama, kojom se može proceniti količina takrolimusa koja je prisutna u *stratum corneum*-u, odakle dalje može da dospe u dublje slojeve kože; *in vitro* ispitivanje dermalne raspoloživosti / penetracije takrolimusa iz nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzije u kožu uha svinje primenom diferencijalnog stripinga, kojom se, osim količine takrolimusa u *stratum corneum*-u, može odrediti i količina aktivne supstance u folikulima dlaka, budući da je transfolikularni put isporuke od značaja kada se primenjuju lipidne čestice; i *in vitro* procena permeacije takrolimusa kroz kožu uha svinje pune debljine korišćenjem Franz-ovih difuzionih ćelija, kojom se može pratiti permeacija lekovite supstance kroz sve slojeve kože pune debljine i proceniti njena resorpcija u sistemsku cirkulaciju, odnosno transdermalna isporuka, koja je nepoželjna u slučaju topikalno primenjenog takrolimusa i može da ukazuje na povećani rizik od sistemskih neželjenih efekata. U ovim ispitivanjima korišćene su najperspektivnije formulacije mikroemulzija, nanoemulzija i nanostrukturiranih lipidnih čestica, i referentni preparat - Protopic[®] 0,1 % mast kao jedini farmaceutski oblik sa takrolimusom za topikalnu primenu koji je dostupan na svetskom tržištu.

Na kraju eksperimentalnog dela dat je opis metode kojom je vršeno kvantitativno određivanje takrolimusa u uzorcima (ultra visokoeфикасна течна хроматографија у комбинацији са масеном спектрометријом - UPLC-MS/MS), a takođe je prikazan i način obrade rezultata, uključujući statističke testove koji su korišćeni za procenu značajnosti rezultata.

Rezultati i diskusija obuhvataju 57 strana doktorske disertacije, 28 slika i 13 tabela. Analiza rezultata i diskusija napisani su na razumljiv i sistematičan način, i u skladu su sa prethodno navedenim fazama eksperimentalnog rada, kao i ciljevima naučno-istraživačkog rada. U diskusiji je prikazano tumačenje dobijenih rezultata uz uporedno osvrtnje na relevantne istraživačke radove drugih autora od interesa.

Poglavlje **Zaključak** se sastoji od koncizno navedenih najznačajnijih zaključaka svake od pet faza eksperimentalnog rada. Navedeni zaključci su u skladu sa dobijenim rezultatima i ispunjavaju postavljene ciljeve istraživanja. Takođe, dat je i opšti zaključak doktorske disertacije koji sumira celokupni istraživački rad.

U poglavlju **Literatura** navedeno je 200 referenci koje su citirane harvardskim stilom.

2. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

U skladu sa definisanim ciljevima i eksperimentalnom postavkom istraživačkog rada, postignuti rezultati doktorske disertacije, kao i njihovo tumačenje, prikazani su u pet celina.

U prvoj fazi ispitivanja najpre je prikazana rastvorljivost takrolimusa u različitim ekscipijensima dobijena pretragom literature ili eksperimentalnim radom. Identifikovan je Capryol[®] 90 (propilenglikol monokaprilat) kao perspektivna masna faza u kojoj se takrolimus rastvara u zadovoljavajućoj količini. Potom su prikazani konstruisani pseudoternarni fazni dijagrami korišćenjem ove masne faze ili njoj hemijski slične masne faze iz grupe srednjelančanih triglicerida - Saboderm TCC (kaprilno-kaprinski trigliceridi). Kao surfaktant je u eksperimentima korišćen lecitin poreklom iz soje, a varirani su kosurfaktanti (etanol, izopropanol ili propilenglikol). Na osnovu dobijenih pseudoternarnih faznih dijagrama primećeno je da i odabir kosurfaktanta i odabir masne faze značajno utiče na površine mikroemulzionih oblasti. Ukratko, korišćenje propilenglikola rezultovalo je najmanjim mikroemulzionim oblastima, etanol je dao nešto bolje rezultate, dok su najveće mikroemulzione oblasti postignute korišćenjem izopropanola. Primena sekundarnog kosurfaktanta (propilenglikola u sklopu vodene faze) nije dovela do inkorporacije većeg masenog udela vode u mikroemulzijama, ali je omogućila nastajanje ulje u vodi (U/V) mikroemulzija pri nižem masenom udelu vode nego kada nije korišćen propilenglikol kao sekundarni kosurfaktant. Odabir masne faze takođe je uticao na pseudoternarne fazne dijagrame, pri čemu je Capryol[®] 90 omogućio nastajanje većih mikroemulzionih regiona u poređenju sa uljem Saboderm TCC usled manje voluminoznosti lipofilnog dela molekula, čime se postiže bolja interakcija sa ugljovodoničnim lancima unutar lecitina. Ipak, razlika između dobijenih mikroemulzionih oblasti korišćenjem ovih masnih faza je umanjena kada je upotrebljen izopropanol kao kosurfaktant, ukazujući na njegovu sposobnost da učini međupovršinski film fleksibilnijim. Tip mikroemulzija na pseudoternarnim dijagramima od interesa određen je praćenjem provodljivosti mikroemulzija prilikom razblaživanja, pri čemu se na grafičkom prikazu zavisnosti provodljivosti od masenog udela vodene faze može uočiti perkolacioni fenomen prilikom prelaska jednog tipa mikroemulzija u drugi. Na osnovu ovoga, odabrani su uzorci bikontinuiranih i U/V mikroemulzija, čija je unutrašnja struktura dodatno potvrđena u DSC studiji hlađenja/zamrzavanja mikroemulzija. Interesantno, uočeno je ograničenje DSC tehnike kada su analizirane formulacije koje sadrže velike količine kosurfaktanta jer nije bilo moguće uočiti pik smrzavanja vodene faze usled krioprotektivnog efekta ovih ekscipijenasa.

Rezultati druge faze ispitivanja najpre prikazuju odabir smeše čvrstog i tečnog lipida koje će biti korišćene u formulisanju nanostrukturiranih lipidnih čestica na osnovu mešljivosti ovih lipida i DSC analize dobijenih smeša u različitim masenim odnosima. Pokazano je da, za razliku od čvrstih lipida Dynasan[®] 114 i Dynasan[®] 118, Precirol[®] ATO 5 može da se meša sa tečnim lipidom Capryol[®] 90 u različitim masenim odnosima, ali da pri velikom masenom udelu tečnog lipida dolazi do pojave nestabilnih polimorfni oblika čvrstog lipida koji su nepoželjni. Stoga je odnos čvrstog i tečnog lipida ograničen na 4:6, 5:5 i 6:4 u nastavku razvoja nanostrukturiranih lipidnih čestica. Prikazan je sadržaj odabranih lipidnih čestica i one su uspešno izrađene primenom metode homogenizacije pod visokim pritiskom uz zagrevanje. Već u ranim fazama eksperimenta, identifikovana su dva kritična parametra u izradi ovih nosača: ukupni sadržaj masne faze kao formulacioni parametar (preko 10 % dolazi do formiranja polučvrstih - gel sistema) i intenzivno hlađenje nakon izrade kao procesni parametar koji takođe dovodi do geliranja formulacija. Takođe, pokazano je da je moguće izraditi nanoemulziju korišćenjem istih uslova kao i pri izradi nanostrukturiranih

lipidnih čestica, s tom razlikom što je čvrst lipid u formulacijama u potpunosti zamenjen tečnim lipidom.

U trećoj fazi ispitivanja odrađena je detaljna fizičko-hemijska karakterizacija i stabilnost odabranih formulacija mikroemulzija, nanoemulzija i nanostrukturiranih lipidnih nosača kako bi se procenila pogodnost ovih sistema za dermalnu primenu takrolimusa i ispitalo eventualno prisustvo interakcija između lekovite supstance i nosača koje bi mogle uticati na performanse odabranih formulacija. Sve ispitivane formulacije posedovale su kapi/čestice u nanometarskom opsegu i relativno mali indeks polidisperziteta, a veličina kapi kod U/V mikroemulzija značajno je manja nego kod drugih razvijenih nosača kao što je i očekivano. Dodatno, pokazano je da su ukupna količina masne faze i odnos čvrstog i tečnog lipida imali izraženi efekat na veličinu čestica kod nanostrukturiranih lipidnih čestica. Apsolutna vrednost zeta potencijala nanoemulzije i nanostrukturiranih lipidnih čestica je relativno velika, što može da doprinese njihovoj stabilnosti. pH vrednost svih formulacija je u blago kiselom opsegu, što je prihvatljivo za dermalnu primenu formulacija, a takođe može da poboljša stabilnost lekovite supstance. Ispitivane formulacije imale su nisku vrednost viskoziteta, sa izuzetkom pojedinih lipidnih čestica kod kojih je uočeno geliranje. Mikroemulzije su ispoljile tipičan njutnovski tip tečenja, dok su ostali nosači ispoljili pseudoplastičnost. Imajući u vidu visoki solubilizacioni kapacitet mikroemulzija, takrolimus je inkorporiran na molekulskom nivou u ovim formulacijama, što je potvrđeno DSC analizom i polarizacionom mikroskopijom. Njegova lokalizacija u ovim nosačima proverena je korišćenjem EPR tehnike, i uočeno je da je on prvenstveno lokalizovan unutar masne faze mikroemulzija, ali se u maloj meri nalazi i u lipofilnim delovima međupovršinskog filma. FTIR analizom nije uočena značajna hemijska interakcija između takrolimusa i mikroemulzija, koja bi mogla da kompromituje razvijene sisteme. Za razliku od mikroemulzija, drugi nosači imaju niži solubilizacioni kapacitet, te je stoga određena efikasnost inkapsulacije takrolimusa, koja je na zadovoljavajućem nivou zahvaljujući prisustvu tečnog lipida u kome se takrolimus rastvara. Slično tome, DSC analizom i polarizacionom mikroskopijom je potvrđeno odsustvo nerastvorenih kristala takrolimusa u ovim formulacijama. Analiza stabilnosti razvijenih formulacija tokom godinu dana (mikroemulzije) ili šest meseci (ostali nosači) pokazala je da mikroemulzije ispoljavaju najbolju stabilnost, što je i očekivano budući da su to termodinamički stabilni sistemi. Ispostavilo se da je nanoemulzija manje stabilna od odgovarajuće formulacije nanostrukturiranih lipidnih čestica, jer već nakon tri meseca od izrade dolazi do izdvajanja uljanih kapi iz formulacije. Uticaj odgovarajućih procesnih i formulacionih parametara u razvoju nanostrukturiranih lipidnih čestica delimično se odrazio i na stabilnost ovih formulacija. Naime, primena nižeg pritiska homogenizacije tokom izrade ovih nosača uticala je na veličinu čestica, jer je uočena pojava krupnijih agregata korišćenjem laserske difrakcije nakon mesec dana od izrade. Slično tome, odsustvo polisorbata 80 kao sternog stabilizatora rezultovala je u pojavi malog broja agregata mikrometarskih dimenzija. Generalno, kod svih formulacija je uočeno umereno smanjenje pH vrednosti i povećanje provodljivosti tokom skladištenja, što može biti posledica postepena oksidacija i degradacija lipida i surfaktanta usled koje dolazi do pojave organskih kiselina i slobodnih protona u smešama.

Rezultati četvrtog dela ispitivanja, u kome je procenjena preliminarna bezbednost / iritacioni potencijal placebo mikroemulzija na humanim dobrovoljcima tokom 24-časovne studije pod okluzijom, ukazuju na zadovoljavajući bezbednosni profil odabranih mikroemulzija. Naime, vrednosti kritičnih biofizičkih parametara kože (eritema indeks, transepidermalni gubitak vode, hidratacija *stratum corneum*-a) nisu bile značajno izmenjene kod većine formulacija uprkos činjenici da ispitivane mikroemulzije poseduju velike količine surfaktanta i kosurfaktanata. Uočen je porast hidratacije *stratum corneum*-a nakon primene mikroemulzije koja sadrži propilenglikol kao sekundarni kosurfaktant, koji može u značajnoj meri vezati

vodu i poboljšati hidrataciju kože. Ipak, pojedini ispitanici su zapazili povremeni i blagi osećaj peckanja tokom trajanja 24-časovne studije na ispitivanim mestima tretiranim formulacijama sa propilenglikolom kao sekundarnim kosurfaktantom, te su one opravdano isključene iz daljih ispitivanja.

Peti deo rezultata i diskusije sadrži informacije o odrađenoj sveobuhvatnoj biofarmaceutskoj karakterizaciji najperspektivnijih nosača za dermalnu isporuku takrolimusa. U *in vitro* ispitivanjima brzine oslobađanja takrolimusa kroz sintetsku membranu, koje je sprovedeno korišćenjem Franz-ovih difuzionih ćelija, uočeno je najpre to da je kumulativna količina oslobođenog takrolimusa nakon 6h, 9h i 24h od aplikacije statistički značajno veća primenom svih ispitivanih formulacija u poređenju sa referentnom mašću. Zanimljivo, uprkos razlici u unutrašnjoj strukturi razvijenih nosača, nije uočena značajna razlika u oslobađanju takrolimusa iz U/V mikroemulzija, bikontinuiranih mikroemulzija i nanočestica, dok je nanoemulzija ispoljila najsporije oslobađanje od svih razvijenih nosača. Na kraju, oslobađanje takrolimusa iz mikroemulzija i nanoemulzije najbolje se može opisati korišćenjem modela nultog reda, oslobađanje iz nanočestica najviše odgovara Hixson Crowell modelu, dok se oslobađanje iz referentne masti može opisati Higuchi modelom. *In vitro* ispitivanje dermalne raspoloživosti / penetracije takrolimusa iz mikroemulzija u kožu uha svinje primenom metode sa trakama omogućilo je uvid u penetracione profile takrolimusa iz ovih nosača i njegovu ukupnu količinu u *stratum corneum*-u nakon dvočasovnog izlaganja kože formulacijama. Bikontinuirana mikroemulzija ECV 35 i U/V mikroemulzija ICV 60 pokazale su se superiornijim u poređenju sa referentnom mašću i omogućile su oko 3 puta veću penetraciju takrolimusa. Između samih mikroemulzionih formulacija nije dobijena statistički značajna razlika u količini penetriralog takrolimusa uprkos njihovoj različitoj unutrašnjoj strukturi i različitoj količini surfaktanta i kosurfaktanta, a koji mogu da poboljšaju penetraciju interakcijom sa lipidima *stratum corneum*-a. *In vitro* procena penetracije takrolimusa iz nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzija primenom tehnike diferencijalnog stripinga pružila je, najpre, uvid u penetracione profile i količinu takrolimusa u *stratum corneum*-u iz ovih nosača, a potom i količinu takrolimusa koja je ekstrahovana iz folikula dlake. Rezultati ukazuju na značajno veću količinu penetriralog takrolimusa u *stratum corneum*-u nakon aplikacije ispitivanih formulacija u poređenju sa referentnom mašću, dok nije pokazana značajna razlika između samih formulacija. Interesantno, iako je očekivano da će mikroemulzije ispoljiti značajno bolju penetraciju takrolimusa u poređenju sa drugim nosačima usled velike količine surfaktanta i kosurfaktanta koji pojačavaju penetraciju, kao i male veličine kapi unutrašnje faze, nije uočena značajna razlika između njih, nanoemulzije i lipidnih nanočestica. Dalje, količina takrolimusa ekstrahovana iz folikula dlaka nakon primene lipidnih nanočestica značajno je veća nego nakon primene referentne masti, dok primena nanoemulzije nije rezultovala značajnom razlikom. Na kraju, u *in vitro* ispitivanjima permeacije takrolimusa tokom 24 časa kroz kožu uha svinje pune debljine korišćenjem Franz-ovih difuzionih ćelija dobijeni su vrlo interesantni rezultati. Naime, ovaj deo eksperimenata od posebne je važnosti jer količina takrolimusa koji je permeirao u akceptorski kompartment može da odražava potencijal formulacija za isporuku ove supstance u sistemsku cirkulaciju (transdermalna primena), što bi povećalo rizik od sistemskih neželjenih efekata. Na permeacionim profilima uočeno je to da su vrlo male količine supstance permeirale nakon 3 h i 6 h od aplikacije i da nije bilo razlike između formulacija i referentne masti. Ipak, u kasnijim fazama ispitivanja, nakon 20 h, 22 h i 24 h od aplikacije, značajno je manje takrolimusa permeiralo u akceptorski medijum iz nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzije u poređenju sa mikroemulzijom i referentnom mašću. Slično tome, količina takrolimusa deponovana u koži nakon 24-časovne studije najveća je pri primeni mikroemulzije i referentne masti, a značajno manja pri primeni nanoemulzije i nanočestica. Referentna mast je dovela do iznenađujuće

velike brzine i stepena permeacije takrolimusa, što je kontradiktorno rezultatima studije penetracije. Ipak, ovaj rezultat je objašnjen intenzivno okluzivnom dejstvu masti, koje dolazi do izražaja nakon dugotrajnog tretmana kože, kao što je to slučaj u 24-časovnoj studiji permeacije u poređenju sa dvočasovnom studijom penetracije. U kliničkoj eksperimentalnoj postavci može se očekivati kraće eksponiranje ispitanika formulacijama/mašču, te se, stoga, smatra da rezultat *in vitro* penetracije može realnije opisati dermalnu isporuku takrolimusa iz formulacija i referentne masti.

3. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA DISERTACIJE SA PODACIMA IZ LITERATURE

Takrolimus je potentan imunosupresiv makrolidne strukture sa izazovnim fizičko-hemijskim osobinama, kao što su velika molarna masa (804,02 g/mol) i slaba rastvorljivost u vodi (4 - 12 µg/mL), koje su odgovorne za njegovu ograničenu penetraciju i permeaciju kroz kožu (Patel i sar., 2012). Razvoj novih nosača sa takrolimusom za dermalnu primenu od izuzetnog je značaja s obzirom na to da na svetskom tržištu ne postoje drugi farmaceutski oblici sa ovom supstancom za primenu na koži osim takrolimus masti, koja je povezana sa smanjenom komplikacijom pacijenata usled nepoželjnih karakteristika, kao što su masna tekstura, sporo upijanje, teško uklanjanje/spiranje sa kože i teško razmazivanje po koži, pogotovu u kosmatim regionima (Tan i sar., 2012). Osim toga, pokazano je da topikalna primena takrolimusa može biti efikasna u tretmanu psorijaze na licu i intertriginoznim regijama (Brune i sar., 2007; Freeman i sar., 2003), ali ne i u tretmanu psorijaze na drugim delovima tela zbog prisustva hiperkeratoznih psorijaznih plakova, koji onemogućavaju penetraciju takrolimusa u kožu (Malecic i Young, 2016; Zonneveld i sar., 1998). Poboľjšanom dermalnom isporukom takrolimusa korišćenjem naprednih nosača mogao bi se očekivati bolji efekat takrolimusa i u prisustvu hiperkeratoznih psorijaznih plakova ili zadebljanja kože.

Mikroemulzije, nanoemulzije i nanostrukturirane lipidne čestice su napredni koloidni nosači nanometarskih dimenzija i/ili sa nanostrukturom koji se intenzivno istražuju sa ciljem poboljšanja dermalne i transdermalne isporuke slabo rastvornih lekovitih supstanci (Hoppel i sar., 2015; Ilic i sar., 2018; Müller i sar., 2017; Rai i sar., 2018; Todosijević i sar., 2015). U literaturi se mogu naći pojedini radovi koji su se bavili razvojem mikroemulzija (Goebel i sar., 2011), nanoemulzija (Sahu i sar., 2018) i lipidnih nanočestica (Andrade i sar., 2017; Jain i sar., 2019) za dermalnu isporuku takrolimusa, međutim ne postoje uporedne procene ovakvih nosača, pri čemu bi nosači bili formulisani korišćenjem sličnih ekscipijenasa. S tim u vidu, u ovoj doktorskoj disertaciji formulisani su i upoređeni strukturno različiti nosači - mikroemulzije, nanoemulzije i nanostrukturirane lipidne čestice - korišćenjem lecitina poreklom iz soje, kao bezbednog, biokompatibilnog i biodegradabilnog surfaktanta, i inovativne masne faze/tečnog lipida/ulja - propilenglikol monokaprilata. Budući da ima vrlo zahvalne bezbednosne karakteristike, lecitin je intenzivno proučavan za stabilizaciju različitih sistema. Ipak, ovaj ekscipijens ima i nepoželjne osobine, kao što su izrazita hidrofobnost usled prisustva dva dugačka ugljovodonična lanca, snažna lipofobnost usled prisustva hidriranih zwitterionskih polarnih grupa i intenzivno formiranje lamelarne tečne kristalne faze, te je zbog toga često neophodno koristiti dodatne surfaktante ili kosurfaktante kako bi se ostvarila adekvatna stabilizacija sistema (Gosenca i sar., 2013; Hoppel i sar., 2014). U ovoj doktorskoj disertaciji korišćene su inovativne kombinacije ekscipijenasa kako bi se izradili ovi nosači, te stoga nije moguće direktno poređenje rezultata velikih delova ove doktorske disertacije sa literaturnim podacima. Ipak, postoje slična ispitivanja koja će biti pomenuta u nastavku, u kojima su korišćeni drugačiji ekscipijensi, te se rezultati ove disertacije mogu samo u određenoj meri uporediti sa njima.

Što se razvoja mikroemulzija tiče, u literaturi su opisani pseudoternarni dijagrami korišćenjem lecitina kao surfaktanta uz drugačije masne faze, pri čemu je, shodno rezultatima ove studije, uočeno da je uz lecitin neophodna primena kosurfaktanata kako bi se omogućilo nastajanje mikroemulzija (Gosenca i sar., 2013; Hoppel i sar., 2014), kao i to da su kratkolančani alkoholi adekvatni kosurfaktanti za stabilizaciju mikroemulzija baziranih na lecitinu (Aboofazeli i sar., 1994; Ruth i sar., 1995). Slično rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji, pokazano je da umereno produženje ugljovodoničnog lanca kod kratkolančanih alkohola omogućava bolju distribuciju u međupovršinu ulje/voda, čime se povećava fleksibilnost lecitinskog monosloja i omogućava nastanak mikroemulzija (Aboofazeli i sar., 1994; Ruth i sar., 1995).

U razvoju nanostrukturiranih lipidnih čestica, identifikovani kritični formulacioni parametri u ovoj doktorskoj disertaciji, kao što su odnos čvrstog i tečnog lipida i totalni udeo lipidne faze, u skladu su sa opažanjima drugih autora, koji su koristili drugačije masne faze i/ili surfaktante (Awadeen i sar., 2020; Kovács i sar., 2017). Ipak, postoje i određene razlike u poređenju sa literaturnim podacima, pri čemu su npr. Date i saradnici (2011) uočili da udeo tečnog lipida ne utiče na karakteristike ovih čestica, dok rezultati ove doktorske disertacije sugerišu da sa povećanjem masenog udela tečnog lipida dolazi do smanjenja veličine čestica. Odstupanje od literaturnih podataka je i očekivano budući da se u literaturi ne mogu naći nanostrukturirane lipidne čestice istog sastava kao u ovoj disertaciji.

Sveobuhvatna fizičko-hemijska karakterizacija razvijenih nosača omogućila je detaljan uvid u njihovu strukturu, njihovo međusobno poređenje, praćenje efekta odgovarajućih variranih parametara, kao i tumačenje rezultata biofarmaceutске karakterizacije budući da osobine nosača, kao što su rastvorljivost aktivne supstance u formulaciji, veličina kapi/čestica i reološke karakteristike formulacije, značajno mogu da utiču na oslobađanje lekovite supstance, njenu penetraciju i permeaciju (Klang i Valenta, 2011; Zhang i Michniak-Kohn, 2018). Rezultati su unutar očekivanih parametara i u skladu sa literaturnim podacima koji se mogu naći za nosače izrađene korišćenjem sličnih ekscipijenasa (Date i sar., 2011; Isailović i sar., 2016; Pestana i sar., 2008). Takođe, rezultati ukazuju na važnost korišćenja komplementarnih tehnika kao što su merenje provodljivosti, DSC i EPR tehnika pri određivanju unutrašnje strukture mikroemulzija, kao i kombinovanje PCS i laserske difrakcije kada je u pitanju određivanje veličine čestica i prisustvo agregata kod termodinamički nestabilnih koloidnih sistema. Osim detaljne fizičko-hemijske karakterizacije, sprovedeno je ispitivanje interakcije lekovite supstance i nosača kao i fizičkog stanja lekovite supstance u nosaču (npr. prisustvo kristala), što je od velike važnosti za dalju procenu performansi formulacija u pogledu dermalne isporuke (Isailović i sar., 2016). Ispitivanje stabilnosti formulacija takođe je vrlo važan segment doktorata, pri čemu su dobijene evidentne razlike između razvijenih naprednih nosača s tim da su mikroemulzije, kao termodinamički stabilni sistemi, ispoljili stabilnost u trajanju od minimum godinu dana, najbolje formulacije nanostrukturiranih lipidnih čestica su bile stabilne tokom šest meseci, a nanoemulzija se pokazala kao manje stabilna od nanostrukturiranog lipidnog nosača, pri čemu je uočeno izdvajanje većih uljanih kapi nakon nešto više od tri meseca.

Iako su svi nosači razvijeni korišćenjem biokompatibilnih ekscipijenasa, u količinama prihvatljivim za primenu na koži, značajan doprinos ove doktorske disertacije je i ispitivanje preliminarnog bezbednosnog profila / iritacionog potencijala nosača, i to mikroemulzija, budući da one sadrže najveću količinu surfaktanta i kosurfaktanata, koji, u određenim uslovima, mogu da dovedu do iritacije kože. U 24-časovnoj studiji pod okluzijom na humanim dobrovoljcima, nije uočena značajna promena praćenih biofizičkih parametara kože kod skoro svih formulacija, ali je, osim ovih objektivnih pokazatelja iritacije kože, naglašeno to da je par ispitanica prijavilo blagu iritaciju tokom trajanja studije, zbog koje su pojedine

formulacije isključene iz daljeg ispitivanja. Generalno, zadovoljavajući preliminarni bezbednosni profil mikroemulzija rezultat je pažljivog odabira ekscipijenasa, kao i odabira mikroemulzija sa što manjim sadržajem surfaktanta i kosurfaktanata. Treba naglasiti da se u relevantnoj literaturi ne mogu naći podaci o proceni bezbednosti mikroemulzija na bazi lecitina i propilenglikol monokaprilata u *in vivo* studijama na humanim ispitanicima. Slične procene, ali za nosače drugačijeg sastava, postoje opisane u literaturi (Isailović i sar., 2016; Todosijević i sar., 2015).

Imajući u vidu to da je dermalna isporuka takrolimusa fokus ove doktorske disertacije, sprovedena su različita ispitivanja kako bi se omogućila sistematična i sveobuhvatna procena dermalne raspoloživosti ove model lekovite supstance iz aktuelnih, strukturno različitih nosača, zatim njihovo međusobno poređenje i poređenje sa referentnom mašću, kao jedinom dostupnom alternativom za topikalnu primenu takrolimusa. Najpre je sprovedeno *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanje takrolimusa imajući u vidu to da je za ispoljavanje farmakološkog dejstva aktivne supstance neophodno da se ona oslobodi iz nosača i bude u rastvornom stanju na željenom mestu, u željenoj količini i željenom brzinom, kao i to da, iako ovaj parametar ne može direktno ukazati na dermalnu raspoloživost supstanci usled neadekvatnosti sintetske membrane da oslika kompleksne interakcije između kože i nosača, on može ukazati na izmenjeno ponašanje različitih formulacija u poređenju sa referentnim preparatom (Shah i sar., 2015). U literaturi se mogu naći podaci za oslobađanje takrolimusa iz referentnog preparata (Pople i Singh, 2010) i oni su u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji, dok oslobađanje iz razvijenih nosača ne može da se uporedi sa literaturnim podacima s obzirom na njihov inovativni karakter.

Dalje, u dvočasovnoj *in vitro* studiji procene penetracije takrolimusa u *stratum corneum* korišćenjem metode sa trakama pokazana je superiornost razvijenih nosača u poređenju sa referentnom mašću, dok se razlike u njihovim fizičko-hemijskim karakteristikama nisu značajno odrazile na profile penetracije. Iako je količina takrolimusa u *stratum corneum*-u oko dva puta veća nakon primene mikroemulzija, ta razlika nije statistički značajna usled velike varijabilnosti. Pojedini podaci iz literature ukazuju na bolju penetraciju model lekovite supstance u *stratum corneum* nakon primene nanostrukturiranih lipidnih čestica u poređenju sa nanoemulzijama (Wolf i sar., 2018), koja je objašnjena boljom okluzijom kože usled prisustva čvrstog lipidnog matriksa. Ipak, rezultati ove disertacije nisu pokazali razliku u količini takrolimusa koji je penetrirao u *stratum corneum*-u između ovih formulacija verovatno usled sličnih ostalih fizičko-hemijskih karakteristika nosača i kratkog vremena ekspaniranja kože formulacijama (2 h). S druge strane, kada su nanostrukturirane lipidne čestice u pitanju, literaturni podaci ukazuju na to da one mogu doprineti dermalnoj isporuci ukoliko mogu da oslobode lekovitu supstancu u određenom vremenskom intervalu i na odgovarajućoj lokaciji u folikulima dlaka, gde mogu nastati rezervoari lekovite supstance iz kojih će ona penetrirati u dublje slojeve kože koji okružuju folikule dlake (Lademann i sar., 2007; Patzelt i sar., 2017). Rezultati ove disertacije upravo ukazuju na bolju folikularnu isporuku takrolimusa iz nanočestica u poređenju sa referentnim preparatom, implicirajući njihov veliki potencijal u dermalnoj isporuci ove model lekovite supstance.

Na kraju, kao dodatak ispitivanju penetracije, sprovedeno je 24-časovno *in vitro* ispitivanje permeacije takrolimusa kroz kožu uha svinje pune debljine, koje je pružilo donekle intrigantne i inovativne rezultate, pri čemu je najviše takrolimusa permeiralo i ostalo deponovano u koži iz referentne masti i mikroemulzije, a manje iz nanočestica i nanoemulzije. Najverovatnije objašnjenje za neočekivano dobru performansu referentne masti u ovoj studiji, u poređenju sa ispitivanjima *in vitro* penetracije takrolimusa, može se naći u literaturi. Naime, duže trajanje ispitivanja dovodi do intenzivnije okluzije i, shodno tome, hidratacije kože, a pokazano je da produžena hidriranost kože (duža od 8 h) dovodi do

intenzivnih promena u *stratum corneum*-u, kao što su bubrenje korneocita, nastanak mikrostrukturnih promena u organizaciji lipida kože (Tan i sar., 2010). Shodno tome, intenzivni okluzivni efekat masti je bio izraženiji u 24-časovnoj studiji permeacije u poređenju sa dvočasovnom studijom penetracije takrolimusa. Premda ovako velike razlike u rezultatima *in vitro* studije penetracije i *in vitro* studije permeacije nisu do sad opisane u literaturi, i druge istraživačke grupe su uočile da je važno uzeti u obzir okluzivni efekat formulacije posebno u dugotrajnim ispitivanjima (Haque i sar., 2017), kao i da rezultati *in vitro* studije penetracije korišćenjem metode sa trakama mogu pouzdanije da opišu ponašanje ispitivanih nosača/referentnog preparate, koje bi se moglo očekivati u odgovarajućim kliničkim studijama (Klang i sar., 2011).

Sveukupno gledano, određeni rezultati dobijeni i predstavljeni u okviru ove doktorske disertacije su u većoj meri u saglasnosti sa sličnim podacima iz literature, dok veliki deo rezultata nije bilo moguće direktno uporediti sa literaturnim podacima usled njihovog inovativnog karaktera, te se smatraju doprinosom istraživačkog rada kandidata.

Literatura

1. Aboofazeli R, Lawrence C B, Wicks S R, Lawrence M J. (1994) Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. III. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-isopropyl myristate and either an alkanolic acid, amine, alkanediol, polyethylene glycol alkyl ether or alcohol as cosurfactant, *Int. J. Pharm.*, 111(1), 63-72.
2. Andrade L M, Silva L A D, Krawczyk-Santos A P, Amorim I, Rocha P, Lima E M, Anjos J L V, Alonso A, Marreto R N, Taveira S F. (2017) Improved tacrolimus skin permeation by co-encapsulation with clobetasol in lipid nanoparticles: Study of drug effects in lipid matrix by electron paramagnetic resonance, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 119, 142-149.
3. Awadeen R H, Boughdady M F, Meshali M M. (2020) Quality by Design Approach for Preparation of Zolmitriptan/Chitosan Nanostructured Lipid Carrier Particles - Formulation and Pharmacodynamic Assessment, *Int. J. Nanomedicine*, 15, 8553-8568.
4. Brune A, Miller D W, Lin P, Cotrim-Russi D, Paller A S. (2007) Tacrolimus ointment is effective for psoriasis on the face and intertriginous areas in pediatric patients, *Pediatr. Dermatol.*, 24(1), 76-80.
5. Date A A, Vador N, Jagtap A, Nagarsenker M S. (2011) Lipid nanocarriers (GeluPearl) containing amphiphilic lipid Gelucire 50/13 as a novel stabilizer: fabrication, characterization and evaluation for oral drug delivery, *Nanotechnology*, 22(27), 0957-4484.
6. Erdogan M, Wright J R, Jr., McAlister V C. (2002) Liposomal tacrolimus lotion as a novel topical agent for treatment of immune-mediated skin disorders: experimental studies in a murine model, *Br. J. Dermatol.*, 146(6), 964-967.
7. Freeman A K, Linowski G J, Brady C, Lind L, Vanveldhuisen P, Singer G, Lebwohl M. (2003) Tacrolimus ointment for the treatment of psoriasis on the face and intertriginous areas, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 48(4), 564-568.
8. Gabriel D, Mugnier T, Courthion H, Kranidioti K, Karagianni N, Denis M C, Lapteva M, Kalia Y, Moller M, Gurny R. (2016) Improved topical delivery of tacrolimus: A novel composite hydrogel formulation for the treatment of psoriasis, *J. Control Release*, 242, 16-24.

9. Goebel A S, Neubert R H, Wohlrab J. (2011) Dermal targeting of tacrolimus using colloidal carrier systems, *Int. J. Pharm.*, 404(1-2), 159-168.
10. Gosenca M, Bester-Rogac M, Gasperlin M. (2013) Lecithin based lamellar liquid crystals as a physiologically acceptable dermal delivery system for ascorbyl palmitate, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 50(1), 114-122.
11. Haque T, Lane M E, Sil B C, Crowther J M, Moore D J. (2017) In vitro permeation and disposition of niacinamide in silicone and porcine skin of skin barrier-mimetic formulations, *Int. J. Pharm.*, 520(1-2), 158-162.
12. Hoppel M, Ettl H, Holper E, Valenta C. (2014) Influence of the composition of monoacyl phosphatidylcholine based microemulsions on the dermal delivery of flufenamic acid, *Int. J. Pharm.*, 475(1-2), 156-162.
13. Hoppel M, Juric S, Ettl H, Valenta C. (2015) Effect of monoacyl phosphatidylcholine content on the formation of microemulsions and the dermal delivery of flufenamic acid, *Int. J. Pharm.*, 479(1), 70-76.
14. Ilic T, Savic S, Batinic B, Markovic B, Schmidberger M, Lunter D, Savic M. (2018) Combined use of biocompatible nanoemulsions and solid microneedles to improve transport of a model NSAID across the skin: In vitro and in vivo studies, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 125, 110-119.
15. Isailović T, Đorđević S, Marković B, Randelović D, Cekić N, Lukić M, Pantelić I, Daniels R, Savić S. (2016) Biocompatible Nanoemulsions for Improved Aceclofenac Skin Delivery: Formulation Approach Using Combined Mixture-Process Experimental Design, *J. Pharm. Sci.*, 105(1), 308-323.
16. Jain S, Addan R, Kushwah V, Harde H, Mahajan R R. (2019) Comparative assessment of efficacy and safety potential of multifarious lipid based Tacrolimus loaded nanoformulations, *Int. J. Pharm.*, 562, 96-104.
17. Klang V, Schwarz J C, Matsko N, Rezvani E, El-Hagin N, Wirth M, Valenta C. (2011) Semi-solid Sucrose Stearate-Based Emulsions as Dermal Drug Delivery Systems, *Pharmaceutics*, 3(2), 275-306.
18. Klang V, Valenta C. (2011) Lecithin-based nanoemulsions, *J. Drug Del. Sci. Tech.*, 21(1), 55-76.
19. Kovács A, Berkó S, Csányi E, Csóka I. (2017) Development of nanostructured lipid carriers containing salicylic acid for dermal use based on the Quality by Design method, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 99, 246-257.
20. Lademann J, Richter H, Teichmann A, Otberg N, Blume-Peytavi U, Luengo J, Weiss B, Schaefer U F, Lehr C M, Wepf R, Sterry W. (2007) Nanoparticles--an efficient carrier for drug delivery into the hair follicles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 66(2), 159-164.
21. Lapteva M, Mondon K, Moller M, Gurny R, Kalia Y N. (2014) Polymeric micelle nanocarriers for the cutaneous delivery of tacrolimus: a targeted approach for the treatment of psoriasis, *Mol. Pharm.*, 11(9), 2989-3001.
22. Limon D, Tallo Dominguez K, Garduno-Ramirez M L, Andrade B, Calpena A C, Perez-Garcia L. (2019) Nanostructured supramolecular hydrogels: Towards the topical treatment of Psoriasis and other skin diseases, *Colloids Surf. B*, 181, 657-670.
23. Malecic N, Young H. (2016) Tacrolimus for the management of psoriasis: clinical utility and place in therapy, *Psoriasis (Auckland, N.Z.)*, 6, 153-163.
24. Müller F, Honzke S, Luthardt W O, Wong E L, Unbehauen M, Bauer J, Haag R, Hedtrich S, Ruhl E, Rademann J. (2017) Rhamnolipids form drug-loaded nanoparticles for dermal drug delivery, *Eur J Pharm Biopharm*, 116, 31-37.
25. Patel P, Patel H, Panchal S, Mehta T. (2012) Formulation strategies for drug delivery of tacrolimus: An overview, *Int. J. Pharm. Investig.*, 2(4), 169-175.

26. Patzelt A, Mak W C, Jung S, Knorr F, Meinke M C, Richter H, Ruhl E, Cheung K Y, Tran N, Lademann J. (2017) Do nanoparticles have a future in dermal drug delivery?, *J. Control. Release*, 246, 174-182.
27. Pestana K C, Formariz T P, Franzini C M, Sarmiento V H, Chiavacci L A, Scarpa M V, Egito E S, Oliveira A G. (2008) Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B, *Colloids Surf., B*, 66(2), 253-259.
28. Pople P V, Singh K K. (2010) Targeting tacrolimus to deeper layers of skin with improved safety for treatment of atopic dermatitis, *Int. J. Pharm.*, 398(1-2), 165-178.
29. Rai V K, Mishra N, Yadav K S, Yadav N P. (2018) Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications, *Journal of Controlled Release*, 270, 203-225.
30. Ruth H S, Attwood D, Ktistis G, Taylor C J. (1995) Phase studies and particle size analysis of oil-in-water phospholipid microemulsions, *Int. J. Pharm.*, 116(2), 253-261.
31. Sahu S, Katiyar S S, Kushwah V, Jain S. (2018) Active natural oil-based nanoemulsion containing tacrolimus for synergistic antipsoriatic efficacy, *Nanomedicine*, 13(16), 1985-1998.
32. Shah V P, Yacobi A, Radulescu F S, Miron D S, Lane M E. (2015) A science based approach to topical drug classification system (TCS), *Int. J. Pharm.*, 491(1-2), 21-25.
33. Tan G, Xu P, Lawson L B, He J, Freytag L C, Clements J D, John V T. (2010) Hydration effects on skin microstructure as probed by high-resolution cryo-scanning electron microscopy and mechanistic implications to enhanced transcutaneous delivery of biomacromolecules, *J. Pharm. Sci.*, 99(2), 730-740.
34. Tan X, Feldman S R, Chang J, Balkrishnan R. (2012) Topical drug delivery systems in dermatology: a review of patient adherence issues, *Expert Opin. Drug Deliv.*, 9(10), 1263-1271.
35. Todosijević M N, Savić M M, Batinić B B, Marković B D, Gašperlin M, Ranđelović D V, Lukić M Z, Savić S D. (2015) Biocompatible microemulsions of a model NSAID for skin delivery: A decisive role of surfactants in skin penetration/irritation profiles and pharmacokinetic performance, *Int. J. Pharm.*, 496(2), 931-941.
36. Wolf M, Klang V, Stojčić T, Fuchs C, Wolzt M, Valenta C. (2018) NLC versus nanoemulsions: Effect on physiological skin parameters during regular in vivo application and impact on drug penetration, *Int. J. Pharm.*, 549(1-2), 343-351.
37. Zhang J, Michniak-Kohn B B. (2018) Investigation of microemulsion and microemulsion gel formulations for dermal delivery of clotrimazole, *Int. J. Pharm.*, 536(1), 345-352.
38. Zonneveld I M, Rubins A, Jablonska S, Dobozy A, Ruzicka T, Kind P, Dubertret L, Bos J D. (1998) Topical tacrolimus is not effective in chronic plaque psoriasis. A pilot study, *Arch. Dermatol.*, 134(9), 1101-1102.

4. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DISERTACIJE

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije do sada su objavljeni u vidu dva rada u časopisima kategorije M21, kao i u formi većeg broja saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima štampanih u celini ili u izvodu. Podaci o publikovanim radovima dati su u nastavku.

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

1. **Savić V**, Ilić T, Nikolić I, Marković B, Čalija B, Cekić N, Savić S. Tacrolimus-loaded lecithin-based nanostructured lipid carrier and nanoemulsion with propylene glycol monocaprylate as a liquid lipid: Formulation characterization and assessment of dermal delivery compared to referent ointment. *International Journal of Pharmaceutics* 2019; 569: 118624 (IF 4,845/2019).
2. **Savić V**, Todosijević M, Ilić T, Lukić M, Mitsou E, Papadimitriou V, Avramiotis S, Marković B, Cekić N, Savić S. Tacrolimus loaded biocompatible lecithin-based microemulsions with improved skin penetration: Structure characterization and *in vitro/in vivo* performances. *International Journal of Pharmaceutics* 2017; 529 (1-2): 491-505 (IF 3,862/2017)

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33)

1. **Savić V**, Nikolić I, Marković B, Cekić N, Savić S. Comparative *in vitro* release of tacrolimus from lecithin-based nanostructured lipid carrier and nanoemulsion. 3rd European Conference on Pharmaceutics, April 1-2 2019, Bologna, Italy
2. **Savić V**, Nikolić I, Todosijević M, Savić S, Cekić N, Savić S. Assessment of critical parameters in developing of NLCs stabilized with soybean lecithin and polysorbate 80. 11th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, September 22-24, 2016, Beograd, Serbia.
3. **Savić V**, Todosijević M, Ilić T, Marković B, Čalija B, Cekić N, Savić S. Biocompatible lecithin-based microemulsions for topical application of tacrolimus. 11th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, September 22-24, 2016, Beograd, Serbia.
4. **Savić V.**; Đorđević S; Todosijević M; Isailović T; Cekić N; Čalija B, Savić S. Formulation and characterization of NLCs stabilized with soya lecithin and polysorbate 80 - Effects of lipid composition. 10th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, April 4-7, 2016, Glasgow, United Kingdom.
5. Todosijević M, **Savić V**, Savić M, Randelović D, Gašperlin M, Batinić B, Isailović T, Marković B, Savić S. Aceclofenac loaded bicontinuous microemulsions: *in vitro* release, tape stripping and pharmacokinetic study. 1st European Conference on Pharmaceutics: Drug Delivery, April 13-14, 2015, Reims, France.

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)

1. M. Todosijević, I. Nikolić, N. Paunović, **V. Savić**, M. Lukić, S. Đorđević, S. Savić. Physicochemical, biopharmaceutical characterization and *in vivo* skin irritation study of sucrose ester-based microemulsions: the influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin. 2nd Congress of Pharmacists of Montenegro with International participation, 28-31. maj 2015, Budva, Crna Gora

Saopštenja sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64)

1. **Savić V**, Todosijević M, Cekić N, Savić S. Preformulaciona/formulaciona ispitivanja mikroemulzija stabilizovanih lecitinom kao nosača za takrolimus. VI Kongres farmaceuta Srbije, Oktobar 15-19, 2014, Beograd, Srbija, p. 374-376.
2. Todosijević M, Cekić N, **Savić V**, Lukić M, Nikolić I, Paunović N, Savić S. Mikroemulzije kao potencijalni nosači za transdermalnu isporuku aceklofenaka: uticaj tipa surfaktanta i

kosurfaktanta. VI Kongres farmaceuta Srbije, Oktobar 15-19, 2014, Beograd, Srbija, p. 372-373.

5. ZAKLJUČAK – OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DISERTACIJE

Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju nova ili dopunjena saznanja o razvoju naprednih, biokompatibilnih nosača nano-dimenzija i/ili nano-strukture (mikroemulzija, nanoemulzija i nanostrukturiranih lipidnih čestica) na bazi lecitina kao surfaktanta i inovativne masne faze - propilenglikol monokaprilata (Capryol® 90), i njihovu komparativnu procenu u cilju dermalne isporuke takrolimusa kao model slabo rastvorne lekovite supstance. Kada je u pitanju razvoj formulacija, stečena su saznanja o: (i) mogućnosti formiranja mikroemulzija zasnovanih na lecitinu i efektu odabranih kratkolančanih alkohola kao kosurfaktanata (etanol, izopropanol i propilenglikol) ili masnih faza (propilenglikol monokaprilat vs. kaprilno-kaprinski trigliceridi) na mogućnost formiranja što većih mikroemulzionih oblasti na pseudoternarnim faznim dijagramima, i različitih tipova mikroemulzija; (ii) kritičnim procesnim i formulacionim parametrima u razvoju nanostrukturiranih lipidnih čestica stabilizovanih lecitinom, koje sadrže Capryol® 90 kao tečni lipid i Precirol ATO 5 kao čvrsti lipid; (iii) mogućnost formiranja stabilne nanoemulzije zamenom smeše čvrstog i tečnog lipida, prisutne kod nanostrukturiranih čestica, samo tečnim lipidom (uljem), a korišćenjem istih procesnih parametara i iste količine surfaktanta/stabilizatora; (iv) uticaja ispitivanih faktora i različitih unutrašnjih struktura na fizičko-hemijske karakteristike i stabilnost dobijenih nosača.

Inovativni odabir propilenglikol monokaprilata kao masne faze pokazao se uspešnim, kako u pogledu formiranja mikroemulzija, tako i u solubilizaciji takrolimusa, čime je postignuto njegovo potpuno rastvaranje ne samo u mikroemulzijama, već i u nanostrukturiranim lipidnim česticama, omogućavajući izuzetno visoku efikasnost inkapsulacije.

Detaljna komparativna analiza fizičko-hemijskih karakteristika razvijenih, strukturno različitih, a po sadržaju sličnih nosača, kao i procena njihove stabilnosti, takođe se smatra naučnim doprinosom istraživačkog rada kandidatkinje, posebno imajući u vidu i osvrt na neophodnost kombinovanja različitih tehnika kako bi omogućilo ispravno tumačenje rezultata. Osim toga, podaci o stabilnosti razvijenih formulacija nakon šest meseci, odnosno godinu dana i njihova komparacija po pitanju stabilnosti, veliki su doprinos s obzirom na to da se studije stabilnosti u istraživačke svrhe obično sprovode u dosta kraćim vremenskim periodima. Takođe, od velike je važnosti i sprovedena studija procene bezbednosnog profila / iritacionog potencijala mikroemulzija, budući da se u relevantnoj literaturi ne mogu naći podaci o proceni bezbednosti mikroemulzija na bazi lecitina i propilenglikol monokaprilata u *in vivo* studijama na humanim ispitanicima.

Dodatno, značajni doprinos ove doktorske disertacije je i uporedna procena njihovog efekta na dermalnu isporuku takrolimusa, kao i njihovo poređenje sa referentnim preparatom u vidu masti - jednim dostupnim farmaceutskim oblikom takrolimusa za topikalnu primenu na svetskom tržištu. Takođe, intrigantni rezultati dobijeni upotrebom različitih metoda za procenu dermalne bioraspoloživosti (*in vitro* ispitivanje penetracije korišćenjem metode sa trakama vs. *in vitro* ispitivanje permeacije korišćenjem Franz-ovih difuzionih ćelija) i njihovo tumačenje, svakako su važan deo ove disertacije i značajan doprinos u ovoj naučnoj oblasti.

Generalno, na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da su uspešno razvijeni, okarakterisani i upoređeni biokompatibilni napredni nosači (mikroemulzije, nanoemulzije,

nanostrukturirane lipidne čestice) različitih unutrašnjih struktura, svi stabilizovani lecitinom, koji sadrže propilenglikol monokaprilat kao inovativnu masnu fazu - tečni lipid/ulje - sa amfifilnim osobinama i velikim potencijalom za solubilizaciju takrolimusa, koji imaju veliku perspektivu u dermalnoj isporuci ove lekovite supstance.

6. PROVERA ORIGINALNOSTI DOKTORSKE DISERTACIJE

Korišćenjem programa iThenticate u Univerzitetnoj biblioteci Svetozar Marković, Beograd završena je provera originalnosti doktorske disertacije. Dobijena vrednost za *Similarity index* iznosi 7% i posledica je podudarnosti ličnih imena, citata, reči korišćenih u opisu metodologije, uobičajenih fraza koje se koriste u opisu rezultata istraživanja (npr. kao što je prikazano na slici), kao i publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja, koji su proistekli iz rezultata ove doktorske disertacije. Shodno tome, može se izvesti zaključak da je priložena doktorska disertacija kandidata mag. farm. Vedrane Savić originalno naučno delo.

7. PREDLOG KOMISIJE ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

Navedena doktorska disertacija ispunjava sve kriterijume adekvatno napisanog naučnog dela, sa jasnim i konciznim uvodom, precizno definisanim naučno-istraživačkim ciljevima, opsežnom i dobro osmišljenom metodologijom, detaljno iznetim rezultatima i zadovoljavajućom diskusijom, kao i zaključkom koji je u skladu sa postavljenim ciljevima. Osim toga, rezultati ovog naučno-istraživačkog rada publikovani su u vidu dva rada u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), kao i većem broju saopštenja na međunarodnim i nacionalnim skupovima, štampanim u celini ili izvodu.

Komisija, stoga, pozitivno ocenjuje doktorsku disertaciju kandidatkinje mag. farm. Vedrane Savić pod nazivom:

„Dermalna isporuka takrolimusa - uporedna formulaciona i pretklinička istraživanja mikroemulzija, nanoemulzija i nanostrukturiranih lipidnih čestica kao naprednih nosača za slabo rastvorne lekovite supstance“,

i sa zadovoljstvom predlaže Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta da prihvati ovaj Izveštaj o završenoj doktorskoj disertaciji i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu navedene doktorske disertacije.

Beograd, 22.02.2021. godine

Članovi Komisije

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

Dr Ivana Pantelić, docent
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Nebojša Cekić, vanredni profesor
Univerzitet u Nišu – Tehnološki fakultet u Leskovcu