

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

**KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKE STUDIJE**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, održanoj 11.5.2017. godine imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata diplomiranog farmaceuta Mile Đ. Filipović, pod naslovom:

**Kozmetičke emulzije na bazi prirodnog alkil poliglukoziidnog emulgatora sa liposom-inkapsuliranim biljnim matičnim ćelijama: proučavanje fenomena na granici faza i biofizička merenja na koži**

Komisija u sastavu

**1. Dr Snežana Savić, redovni profesor, mentor, predsednik komisije**

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

**2. Dr Gordana Vuleta, redovni profesor u penziji, mentor**

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

**3. Dr Milica Lukić, docent**

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

**4. Dr Veljko Krstonošić, vanredni profesor**

Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet

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

## IZVEŠTAJ

### A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija pod nazivom: "**Kozmetičke emulzije na bazi prirodnog alkil poliglukozidnog emulgatora sa liposom-inkapsuliranim biljnim matičnim ćelijama: proučavanje fenomena na granici faza i biofizička merenja na koži**", sadrži šest poglavlja: Uvod, Cilj istraživanja, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključak i Literatura. Na početku rada je priložen Sažetak/Abstract, dok se na kraju rada nalazi spisak publikovanih/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 (obavezni Prilozi 1, 2 i 3).

Disertacija je napisana na 157 strana i sadrži 39 slika (12 u uvodu i 27 u rezultatima), 19 tabela (6 u uvodu, 8 u eksperimentalnom delu i 5 u rezultatima). Pregled literature sadrži 129 navoda.

**UVOD** se sastoji iz sedam delova. Svaki od njih sadrži informacije koje su od značaja za predmet proučavanja ove doktorske disertacije. U prvom delu uvoda kandidatkinja je izdvojila najznačajnije informacije o liposomima, značaju ovih vezikula za primenu na koži, njihovim prednostima i nedostacima, upotrebi "praznih" i kao nosača kozmetički aktivnih supstanci (KAS) u kozmetičkim proizvodima. U nastavku je dat osvrt na metode/tehnike karakterizacije liposoma za primenu na koži i stavljen je akcenat na probleme u formulaciji kozmetičkih proizvoda sa liposomima, naročito proizvodima emulzionog tipa i potencijalna tehnološka rešenja, što je između ostalog i predmet proučavanja ove doktorske disertacije.

U drugom delu ovog poglavlja detaljnije su opisane biljne matične ćelije, tehnologija njihovog uzgajanja, kozmetički efekti, upotreba i prednosti korišćenja biljnih matičnih ćelija kao KAS u kozmetičkim proizvodima. Na kraju drugog dela date su detaljnije informacije o ekstraktu matičnih ćelija alpske ruže inkapsuliranom u liposome, koji je takođe predmet proučavanja ove disertacije, zatim o strukturi kože uz bliže informacije o epidermisu i bazalnom sloju kože (lat. *stratum basale*) kao ciljnom mestu delovanja navedene KAS, kao i njenoj potencijalnoj ulozi u zaštiti epidermalnih matičnih ćelija. Detaljnim literaturnim pregledom utvrđeno je da nema relevantnih *in vivo* dokaza o efikasnosti i bezbednosnom profilu emulzionih proizvoda sa ekstraktom matičnih ćelija alpske ruže inkorporiranom u liposome nakon primene na koži.

Treći deo Uvoda sadrži relevantne informacije o surfaktantima, njihovom značaju i upotrebi kao kozmetičkih sirovina u formulaciji kozmetičkih proizvoda. Dodatno, dat je pregled fenomena na granici faza značajnih za formulaciju kozmetičkih proizvoda tipa emulzija, opisani su fazno ponašanje i kritična micelarna koncentracija mešanih surfaktanata, njihova sposobnost solubilizacije i emulgovanja. Na kraju ovog dela opisani su višefazni emulzioni sistemi stabilisani fazom tečnih kristala i dat je osvrt na metode karakterizacije tečnih kristala u ovakvim sistemima.

Četvrti deo ove celine posvećen je alkil poliglukozidima (APG) – savremenim nejonskim emulgatorima prirodnog porekla koji ujedno predstavljaju i značajne kozmetičke sirovine. Detaljnim pregledom literature kandidatkinja je pružila uvid u prednosti ove grupe emulgatora koji su dugi niz godina u upotrebi, zbog biodegradabilnosti, dobre podnošljivosti na koži, ali i dala podatke o istraživanjima sličnosti u strukturi APG i ćelijske membrane u koži. Detaljnim literaturnim pregledom takođe je utvrđeno da nema relevantnih podataka o mogućnosti upotrebe APG u obliku mešanih emulgatora, kao stabilizatora kozmetičkih emulzija sa liposomima. S tim u vezi, kandidatkinja je ukazala na značaj ispitivanja

kompatibilnosti emulgatora iz grupe APG i liposoma, njihovog ponašanja kao stabilizatora liposomskih kozmetičkih emulzija, bezbednosti i fizičko-hemijskih karakteristika ovih emulzija. Na kraju ovog dela kandidatkinja je dala detaljne informacije o novijem, prirodnom, mešanom emulgatoru APG tipa - hidroksistearil alkohol i hidroskistearil glukozidu (HSA i HSG), koji je takođe jedan od predmeta ispitivanja ove doktorske disertacije i postavila hipotezu da bi ova kozmetička sirovina mogla biti odgovarajući stabilizator liposomskih kozmetičkih emulzija.

U petom delu Uvoda, akcenat je stavljen na značaj i probleme reformulacije kozmetičkih proizvoda, ukratko su opisani razlozi reformulacije i skrenuta pažnja na značaj korelacije između senzornih ispitivanja i instrumentalnih metoda (reološka merenja i teksturna analiza), kao i na moguću upotrebu eksperimentalnog dizajna u procesu reformulacije kozmetičkih proizvoda. Na kraju ovog dela kandidatkinja daje kratak opis novijeg emolijensa i okluziva, skvalena maslinovog ulja i iznosi da bi bilo interesantno ispitati da li ova kozmetička sirovina ima uticaj na koloidnu strukturu sistema stabilizovanih HSA i HSG, i na koji način ostvaruje svoj uticaj. Dodatno, da li kao emolijens utiče na teksturne, reološke i senzorne karakteristike uzoraka kozmetičkih emulzija sa HSA i HSG, pre i posle reformulacije i da li ima i kakav uticaj na hidraciju i barijernu funkciju kože, na koju su nanošeni ovi uzorci.

Šesti deo Uvoda posvećen je biofizičkim metodama *in vivo* procene određenih aspekata bezbednosti i efekata kozmetičkih proizvoda na koži. U ovom delu objašnjen je značaj procene bezbednosti i ispitivanja efikasnosti kozmetičkih proizvoda i opisane su dostupne *in vivo* metode, posebno metode za procenu transepidermalnog gubitka vlage iz kože, vlažnosti kože, mehaničkih svojstava kože, kao i metode za procenu boje kože, koje su primenjene u eksperimentalnom delu doktorske disertacije.

U sedmom, poslednjem delu Uvoda, date su najznačajnije informacije o senzornoj proceni, ukazano je na određene nedostatke ove metode u procesu reformulacije kozmetičkih proizvoda i skrenuta pažnja na potrebu objektivnijih, ponovljivih, jeftinijih pristupa koji bi trajali kraće, da bi se unapredila ili sačuvala određena svojstva proizvoda, kada mora da se radi njegova reformulacija.

**CILJ RADA** je jasno definisan – ispitati da li bi prirodni mešani alkil poliglukozidni (APG) emulgator - hidroksistearil alkohol i hidroksistearil glukozid (HSA i HSG) mogao da bude odgovarajući stabilizator kozmetičkih emulzija u koje treba inkorporirati liposom-inkapsulirane biljne matične ćelije alpske ruže, a koji bi istovremeno obezbedio zadržavanje liposomskih vezikula u izvornom stanju i formulisanje stabilnih i estetski prihvatljivih kremova za negu zdrave, ali i suve i iritirane kože, što bi se moglo potvrditi odgovarajućim biofizičkim merenjima na koži.

Ostvarivanje ovako postavljenog cilja postignuto je deljenjem u više ciljeva, kako sledi: određivanje kritične micelarne koncentracije APG mešanog emulgatora - HSA i HSG; procena faznog ponašanja emulgatora u binarnim sistemima; potvrda prisustva i stuktornog integriteta liposoma sa matičnim ćelijama alpske ruže (MČAR-liposomi) nakon dispergovanja komercijalnog granulata sa "suvim" liposomima u prečišćenoj vodi i njihova fizičko-hemijska karakterizacija; praćenje interakcija emulgator - inkapsulirani liposomi u jednostavnim sistemima (binarni i ternarni sistemi); razvoj model emulzionog nosača tipa ulje u vodi (U/V) sa ispitivanim emulgatorom i kozmetičkih liposomskih emulzija kompleksnog sastava, njihova sveobuhvatna fizičko-hemijska karakterizacija i ispitivanje estetskih, aplikativnih i teksturnih karakteristika i fizičke stabilnosti; ispitivanje načina stabilizacije liposoma u emulzionom sistemu sa lamelarnom fazom; procena kompatibilnosti ispitivanog emulgatora i MČAR-liposoma; reformulacija razvijene formulacije, stabilnog

U/V krema i procena kompatibilnosti krema kao model nosača sa različitim koncentracijama skvalena poreklom iz maslinovog ulja; procena uticaja reformulacije (dodatak skvalena, kao model kozmetičke sirovine, u različitim koncentracijama, promena procesnih parametara) razvijenih kremova na njihove teksturne, reološke i senzorne karakteristike upotrebom generalnog faktorijalnog eksperimentalnog dizajna i na kraju utvrđivanje iritacionog potencijala (aspekt bezbednosti) i efikasnosti odabranih model liposomskih kozmetičkih emulzija primenom *in vivo* neinvazivnih biofizičkih merenja na zdravoj i eksperimentalno izazvanoj suvoj koži dobrovoljaca.

**EKSPERIMENTALNI DEO** - U ovom poglavlju prikazani su podaci o ispitivanim uzorcima i opisane sve metode i uređaji koji su korišćeni u eksperimentalnom radu. Eksperimentalni rad izveden je u četiri faze.

U I delu ovog poglavlja određena je kritična micelarna koncentracija (KMK) ispitivanog emulgatora uz upotrebu tenziometra i praćeno je njegovo fazno ponašanje u binarnim sistemima upotrebom polarizacionog mikroskopa. Uporedo, uz korišćenje polarizacione mikroskopije izvršena je potvrda prisustva i strukturnog integriteta liposoma sa matičnim ćelijama alpske ruže (MČAR-liposomi) nakon dispergovanja komercijalnog granulata sa "suvim" liposomima u prečišćenoj vodi i fizičko-hemijska karakterizacija (mikroskopska analiza, određivanje srednje veličine i distribucije po veličini, merenje pH i električne provodljivosti) tako dobijene disperzije liposoma. Dodatno, primenom polarizacione mikroskopije praćene su promene strukture ternarnih sistema i vezikula tokom interakcije APG emulgator-liposomi. Detaljno su opisani sastav i način izrade dva binarna i četiri ternarna sistema, kao i oprema koja je pri tome korišćena.

U II delu eksperimentalnog rada detaljno je opisan sastav i način izrade sedam model emulzionih nosača tipa U/V (istog sastava masne faze, različit tip primenjenog koemulgatora/sekundarnog stabilizatora i njegove koncentracije). Dodatno, izvršena je preliminarna procena fizičke stabilnosti uzoraka praćenjem njihovog ponašanja nakon centrifugiranja na sobnoj temperaturi merenjem pH i električne provodljivosti i polarizacionom mikroskopijom, 7 dana nakon izrade i čuvanja na sobnoj temperaturi, kao i nakon testova ubranog starenja. Estetske i aplikativne karakteristike uzoraka procenjene su organoleptičkim ispitivanjem emulzija 7 dana nakon izrade i čuvanja na sobnoj temperaturi. U izabaran model emulzioni nosač je naknadno dodata liposomska disperzija aktivne supstance i zatim izvršena sveobuhvatna fizičko-hemijska karakterizacija i procena njihove fizičke stabilnosti. Obimna fizičko-hemijska karakterizacija koja je bila sprovedena na ovim sistemima podrazumevala je: mikroskopsku analizu (polarizaciona); reološku analizu (kontinualna i oscilatorna reologija); termalne metode (diferencijalna skenirajuća kalorimetrija – DSC i termogravimetrijska analiza – TGA) i teksturnu analizu. Procena fizičke stabilnosti uzoraka vršena je ubrzanim testom starenja, odnosno praćenjem promena pH, električne provodljivosti, reološkog ponašanja i polarizacione mikroskopije pre i posle testa ubranog starenja. Detaljno je opisana oprema koja je korišćena u ovoj fazi eksperimentalnog rada.

U III fazi eksperimentalnog dela izvršeno je ispitivanje direktnih efekata faktora reformulacije (postupak izrade, dodatak 0,4% (m/m) MČAR-liposoma, dodatak 1% ili 6% (m/m) skvalena), kao i efekata njihovih interakcija, na teksturne i reološke karakteristike kozmetičkih U/V emulzija. S tim u vezi, detaljno je opisan sastav i način izrade dvanaest kozmetičkih emulzija U/V tipa, kao i oprema koja je korišćena za reološka merenja i teksturnu analizu. Praćenje efekata je izvršeno upotrebom generalnog faktorijalnog eksperimentalnog dizajna, uz prikaz matriksa faktorijalnog dizajna i odgovora svakog eksperimenta.

U IV fazi eksperimentalnog rada izvršena je procena bezbednosnog profila i efikasnosti izabranih uzoraka upotrebom *in vivo* neinvazivnih metoda zasnovanih na biofizičkim merenjima na koži. Detaljno je opisana oprema koja je pri tome korišćena.

Sve *in vivo* studije su sprovedene u skladu sa Helsinškom deklaracijom i odobrenjem lokalnog Etičkog komiteta za klinička ispitivanja Farmaceutskog fakulteta u Beogradu (broj odobrenja 1583/1).

U delu **Statistika** naznačeni su podaci o korišćenom softverskom paketu (SPSS for Windows 17.0) i korišćenim parametarskim i neparametarskim testovima. Prilikom statističke obrade podataka svake od sprovedenih *in vivo* studija, nivo statističke značajnosti bio je  $p < 0,05$ .

Sve predložene i korišćene metode su odgovarajuće i u skladu sa savremenim zahtevima naučnoistraživačkog rada u relevantnoj oblasti. Takođe, primenjene metode su omogućile dobijanje rezultata na osnovu kojih je moguće doneti adekvatne naučne zaključke.

**REZULTATI I DISKUSIJA** – prikazani su na 64 stranica teksta, kroz 27 slika i 5 tabela i prate prethodno opisane četiri faze.

Kroz diskusiju dobijenih rezultata, kandidatkinja je na sveobuhvatan i razumljiv način iznela svoja tumačenja hipoteza iznetih u ciljevima rada, koji objašnjavaju rezultate ove doktorske disertacije, a u svetlu doprinosa drugih autora koji imaju isti naučni interes.

U poglavlju **ZAKLJUČAK** navedeni su najznačajniji zaključci koji su u skladu sa dobijenim rezultatima i navedenim ciljevima istraživanja.

U poglavlju **LITERATURA** navedeno je 129 referenci citiranih harvardskim stilom.

## **B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA**

Rezultati ove doktorske disertacije podeljeni su u četiri celine, iznošenjem i tumačenjem rezultata svake od izvedenih faza eksperimentalnog rada.

U okviru prvog dela određena je kritična micelarna koncentracija (KMK) ispitivanog emulgatora APG tipa, hidroksistearil alkohol i hidroksistearil glukozida (HSA i HSG) čime je dobijen podatak koji do sada nije bio dostupan u naučnoj literaturi, niti u specifikaciji proizvođača sirovine i praćeno je njegovo fazno ponašanje u dva binarna sistema uz pomoć polarizacione mikroskopije. Upotrebom polarizacionog mikroskopa, u prvom binarnom sistemu, za koji je izabrana koncentracija emulgatora bila malo viša od izmerene KMK (0,01% (m/m)), nije utvrđeno anizotropno ponašanje u odabranim vremenskim intervalima (7 i 30 dana nakon izrade), dok su mikrografije drugog binarnog sistema (koncentracija emulgatora 5% (m/m)) ukazivale na prisustvo anizotropnih struktura - malteških krstova, koje upućuju na koncentraciono-zavisnu liotropnu interakciju lamelarnog tipa. Fizičko-hemijska karakterizacija MČAR-liposoma započeta je mikroskopskom analizom koja je potvrdila prisustvo liposoma nakon dispergovanja granulata sa KAS u prečišćenoj vodi i pokazala da je veličina liposoma odmah nakon dispergovanja relativno ujednačena, što je potvrđeno i upotrebom laserske difrakcije. Mikrografije vodene disperzije KAS snimane u funkciji vremena pokazale su da je 30 min nakon dispergovanja došlo do neznatne, reverzibilne agregacije pojedinih vezikula, dok je nakon 1 časa od dispergovanja došlo do ireverzibilne fuzije pojedinih liposoma. Dodatno, primenom polarizacione mikroskopije praćene su promene strukture četiri ternarna sistema i vezikula tokom interakcije APG emulgator-liposomi 30 min, 7 dana i 30 dana nakon izrade. Dobijene mikrografije ternarnih sistema sa nižom koncentracijom emulgatora (0,01% (m/m)) snimane u funkciji vremena upućuju da

liposomi nisu solubilizovani u prisustvu upotrebljenog mešanog emulgatora. Na mikrografijama ternarnih sistema sa većom koncentracijom emulgatora (5% (m/m)) zapažaju se malteški krstovi koji upućuju na lamelarnu fazu, verovatno oba tipa (lamelarna tečna i lamelarna gel kristalna faza), kao i intaktni liposomi koji se nalaze blizu lamelarne faze emulgatora, odnosno imobilisani su unutar mreže lamelarne faze sistema. Dobijeni podaci su pokazali kompatibilnost ispitivanog mešanog APG emulgatora i MČAR-liposoma u jednostavnim ternarnim sistemima i obezbedili značajne informacije potrebne za dalju izradu model emulzionog nosača za liposome sa KAS u sledećoj fazi eksperimentalnog rada. Kandidatkinja posebno naglašava značaj ovih rezultata, s obzirom na činjenicu da nije dostupna relevantna naučna literatura o kompatibilnosti emulgatora APG tipa i liposoma, kao ni kompatibilnost ispitivanog APG emulgatora - HSA i HSG i MČAR-liposoma.

U drugom delu prikazani su rezultati naredne faze eksperimentalnog rada u kojoj je prvo formulisan model emulzioni nosač sa HSA i HSG i dva uzorka kremova sa različitim koncentracijama MČAR-liposoma (0,4 i 1% (m/m)), nakon čega je izvršena fizičko-hemijska karakterizacija i procena stabilnosti svih dobijenih uzoraka ("praznih" i liposomskih kremova).

Sveobuhvatna fizičko-hemijska karakterizacija ispitivanih sistema započeta je mikroskopskom analizom uzoraka u cilju utvrđivanja da li su prisutne specifične lamelarne faze i nepromenjeni liposomi. Mikrografije su pokazale prisustvo nasumično raspoređenih iskrivljenih malteških krstova i prelamanja na ivici uljanih kapi (tzv. "*onion rings*") unutar svih ispitivanih uzoraka, koji upućuju na liotropnu interakciju lamelnog tipa, dok su se na mikrografijama uzoraka sa KAS mogle uočiti i strukture slične liposomima blizu prelamanja na ivici uljanih kapi u kontinualnoj fazi kremova.

U daljoj karakterizaciji ispitivanih kremova, izvršena su kontinualna i oscilatorna reološka merenja. Krive tečenja su pokazale da svi uzorci ispoljavaju pseudoplastično tečenje (engl. *shear-thinning*) sa izraženom tiksotropijom. Dobijeni reogrami i izračunate vrednosti histereznih površina pokazali su da dodatak MČAR-liposoma utiče na reološko ponašanje nosača, pri čemu dodatak veće koncentracije MČAR-liposoma (1% (m/m)) dovodi do značajnijeg ugušćivanja sistema. Dobijeni rezultat je ukazao da treba voditi računa o izboru koncentracije ove KAS inkapsulirane u liposome prilikom izrade liposomskih kozmetičkih emulzija stabilisanih lamelarnom fazom, pre svega radi očekivanog efekta liposoma na koži korisnika, ali i zbog stabilnosti ovih sistema. Oscilatorna reološka merenja kod svih ispitivanih uzoraka su ukazala na prednost elastične komponente nad viskoznom, što je pogotovo bilo izraženo kod uzoraka sa KAS usled prisustva intaktnih liposoma.

U cilju poređenja faznog ponašanja uzoraka i ispitivanja načina distribucije vode unutar sistema, izvedena su DSC i TGA merenja. DSC termogram je pokazao da je termalno ponašanje svih uzoraka bilo slično, uz pomeranje pika krive ka višim temperaturnim vrednostima kod oba uzorka sa KAS, što je posledica prisustva intaktnih liposoma. Dobijeni nalaz je potvrđen i TGA merenjem koje je pokazalo da liposomi pozicionirani blizu lamelarne kristalne faze oko uljanih kapi, dovode do pomeranja vode unutar emulzionog sistema ka interlamelarno vezanoj vodi.

Teksturna analiza uzoraka je pokazala da ispitivani kremovi imaju slične mehaničke i teksturne karakteristike, nezavisno od dodatka MČAR-liposoma, pa njihovo ponašanje tokom primene ne bi trebalo značajno da se razlikuje.

Što se tiče preliminarne fizičke stabilnosti ispitivanih uzoraka, rezultati pH i električne provodljivosti pre i nakon cikličnih stres testova su ukazali na zadovoljavajuću stabilnost ispitivanih uzoraka, što je potvrđeno reološkim merenjima.

Rezultati treće faze eksperimentalnog rada prikazani su u sledećoj celini. U ovoj fazi vršeno je ispitivanje direktnih efekata faktora reformulacije (postupak izrade, dodatak 0,4% (m/m) MĆAR-liposoma, dodatak 1% ili 6% (m/m) skvalena), kao i efekata njihovih interakcija, na teksturne i reološke karakteristike kozmetičkih U/V emulzija (konzistencija, indeks viskoziteta, čvrstina, kohezivnost, maksimalni i minimalni prividni viskozitet, vrednost histerezne površine, G', G'', G''/G'). Eksperimentalnim dizajnom je potvrđeno postojanje komplementarnosti između reoloških merenja i teksturne analize i dobijene su značajne informacije o uticaju faktora reformulacije na reološke i teksturne karakteristike sistema i posledično na određene senzorne osobine. Dobijeni rezultati su pokazali da je utvrđeni pristup koji kombinuje eksperimentalni dizajn sa instrumentalnim metodama (reologija i teksturna analiza) odgovarajući za proces reformulacije kozmetičkih proizvoda. Kandidatkinja posebno naglašava značaj ovih rezultata, uzimajući u obzir činjenicu da do sada ovakav pristup nije korišćen u procesu formulacije, kao ni reformulacije kozmetičkih proizvoda.

Rezultati četvrte faze eksperimentalnog rada posvećeni su proceni bezbednosnog profila i efikasnosti izabranih formulisanih i reformulisanih uzoraka kremova, upotrebom *in vivo* neinvazivnih metoda zasnovanih na biofizičkim merenjima na koži. *In vivo* procena bezbednosnog profila izabranih uzoraka vršila se ispitivanjem iritacionog potencijala pod okluzijom u trajanju od dvadeset četiri časa. Prema dobijenim rezultatima, nije došlo do narušavanja barijerne funkcije kože. Odsustvo eritema (crvenila) kao i znakova bilo kakvog narušavanja barijerne funkcije kože, preliminarno je ukazalo na zadovoljavajući bezbednosni profil ispitivanih uzoraka emulzija sa MĆAR-liposomima, skvalenom maslinovog ulja i upotrebljenim emulgatorom. *In vivo* procena efikasnosti izabranih uzoraka, praćena je nakon dugotrajne primene na zdravoj koži dobrovoljaca u trajanju od 21 dana, ali i posle šestodnevno nanošenja na prethodno eksperimentalno izazvanu suhu kožu. Nakon dugoročne (21 dnevne) upotrebe, ispitivani kremovi su doveli do povećanja hidracije kože, bez narušavanja barijerne funkcije kože, te se emulgator HSA i HSG, zajedno sa skvalenom maslinovog ulja (emolijens) i MĆAR-liposomima, mogu smatrati odgovarajućim za kreme namenjene vlaženju zdrave kože. Ispitivani kremovi koji sadrže MĆAR-liposome i skvalen, ispoljili su pozitivan efekat na iritiranu kožu i pokazali određeni pozitivan uticaj na obnavljanje određenih oštećenja kožne barijere. Dodatno, pokazano je da uticaj skvalena na hidraciju kože mnogo zavisi od njegove koncentracije u kremu. Rezultati ukazuju da skvalen ima određeni uticaj na specifičnu koloidnu strukturu uzoraka sa HSA i HSG, verovatno na stvaranje lamelarne faze, koja dovodi do dodatnog vlaženja kože.

### C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Rezultati određenih ispitivanja izvedenih u okviru disertacije dopunjuju nepotpune podatke koji se mogu naći u relevantnim literaturnim izvorima ili čak nisu mogli biti provereni u publikovanim izvorima, te se smatraju doprinosom istraživačkog rada kandidatkinje.

Premda su dostupne brojne studije koje se bave ispitivanjem promena izazvanih solubilizacijom fosfolipidnih liposoma (pojednostavljenih modela ćelijske membrane u proučavanju njenih svojstava) različitim alkil (poli) glukozidima (Maza i sar., 1996; 1997; Ribosa i sar., 1997; López i sar., 2001a; 2001b; 2002), gde je određivanje kritične micelarne koncentracije (KMK) ispitivanih surfaktanata prvi korak u eksperimentalnom radu, u ovoj literaturi nema podataka o KMK dugolančanih alkil poliglukozida (od 10 do 22 ugljenikova atoma u alkil lancu), niti je ovaj parametar određivan kod APG dostupnih u obliku mešanih emulgatora. Dodatno, vrednost KMK novijeg mešanog APG emulgatora, HSA i HSG, koji je

predmet proučavanja ove doktorske disertacije, nije dostupna u naučnoj literaturi, niti u specifikaciji proizvođača.

Što se tiče liposoma, poznatih vezikularnih nosača diskutabilne fizičke i hemijske stabilnosti, *per se* i u gotovom kozmetičkom proizvodu (Himanshi i sar., 2015, Kulkarni, 2005), najčešće tehnološko rešenje kada su u pitanju liposomski kozmetički proizvodi jeste izrada hidrogelova (Elnaggar i sar., 2014; Kulkarni, 2005). S obzirom na to da ni ovaj pristup nije uvek efikasan u očuvanju stabilnosti ovih vezikula (Kulkarni, 2005; Elnaggar i sar., 2014), niti uvek odgovarajući sa aspekta stanja kože korisnika, javlja se potreba za pogodnijim proizvodima u smislu objedinjene efikasnosti, estetskih i senzornih karakteristika - liposomskim emulzionim sistemima/liposomskim kremovima. Formulaciju takvih proizvoda prate različiti izazovi, od kojih je najveći izbor odgovarajućeg emulgatora koji neće uticati na strukturu liposoma, njihov integritet, stabilnost i permeabilnost. U relevantnoj literaturi o liposomima (Elnaggar i sar., 2014; Kulkarni, 2005; Pierre i Costa, 2011; Rahimpour i Hamishehkar, 2012), kao i studijama koja se bave proučavanjem alkil poliglukozida - nedovoljno proučavanim šećernim emulgatorima novije generacije (Bogdanović-Marković, 2014; Holmberg, 2001; Lukic i sar., 2013; Savic i sar., 2005; 2011; Tasic-Kostov i sar., 2011) nema podataka o kompatibilnosti ove grupe emulgatora i liposoma, kao ni kompatibilnosti HSA i HSG i liposoma. Stoga se ispitivanje kompatibilnosti novijeg mešanog emulgatora APG tipa, HSA i HSG i liposoma sa inkapsuliranim matičnim ćelijama alpske ruže u jednostavnim ternarnim (I faza eksperimentalnog rada) i složenim emulzionim sistemima, uz sveobuhvatnu fizičko-hemijsku karakterizaciju i procenu stabilnosti takvog sistema (II faza eksperimentalnog rada), pokazalo opravdanim. Dobijeni rezultati predstavljaju nova saznanja i dopunjuju dosadašnja o ispitivanom mešanom emulgatoru APG tipa - HSA i HSG i ukazuju da je upravo on odgovarajući stabilizator kozmetičkih emulzija sa liposom-inkapsuliranim matičnim ćelijama alpske ruže.

Zahtevi korisnika, koji pored efikasnosti i bezbednosti, očekuju i odgovarajuće senzorne karakteristike kozmetičkih proizvoda (Lukic i sar., 2012; Tadros 2004), predstavljaju jedan od ključnih razloga za reformulaciju proizvoda. Poseban izazov u reformulaciji kozmetičkih proizvoda predstavljaju emulzioni sistemi. U bilo kojoj fazi reformulacije emulzionog kozmetičkog proizvoda, ponekad je potrebno napraviti ne samo jednu, već nekoliko promena koje mogu uticati na karakteristike proizvoda. Tehnika koja omogućava da se istovremeno ispituju efekti više različitih faktora, odredi statistički značajan glavni efekat, direktni efekat svake pojedinačne varijable kao i efekat njihovih interakcija na određene karakteristike sistema jeste eksperimentalni dizajn (Đorđević i sar., 2013). Međutim, treba uzeti u obzir da svaka promena u formulaciji zahteva, pored ponovnog ispitivanja stabilnosti, roka upotrebe i/ili PAO, bezbednosti i efikasnosti, dodatno i senzornu procenu, koja će dati uvid u to da li će modifikacija proizvoda imati uticaj na senzorne karakteristike i njegovu prihvatljivost (Kemp i sar., 2009). Iako, u oblasti kozmetologije postoje stalni pokušaji istraživača da bar u određenoj meri zamene komplikovane i skupe senzorne studije instrumentalnim metodama kakve su teksturna i reološka merenja (Lukic i sar., 2012; 2013a; Gilbert i sar., 2013c; Estanqueiro i sar., 2016), u dostupnoj literaturi nema podataka o upotrebi eksperimentalnog dizajna u fazi reformulacije kozmetičkih proizvoda, niti pristupa kombinovanog primenom generalnog faktorijalnog eksperimentalnog dizajna i pomenutih instrumentalnih metoda. Rezultatima III faze eksperimentalnog rada ove doktorske disertacije potvrđeno je da se ovakav, sveobuhvatni, eksperimentalni pristup koji je prvi put primenjen u ovoj doktorskoj disertaciji, može koristiti umesto određenih senzornih testova, koji se vrše u postupku reformulacije kozmetičkih proizvoda, kao što su (npr.) diskriminativni senzorni testovi.

U okviru ove disertacije, rezultati *in vivo* studije procene efikasnosti bezbednosti, pokazale su značajan vlažeći potencijal, povoljan uticaj na stanje kožne barijere, kako zdrave,



tako i suve i iritirane kože, kao i povoljan bezbednosni profil uzoraka izrađenih sa novijim prirodnim mešanim emulgatorom APG tipa - HSA i HSG, sa ili bez inkorporiranih kozmetički aktivnih sastojaka (MČAR-liposomi i skvalen). Dodatno, pokazano je da skvalen maslinovog ulja, utiče na hidraciju kože ne samo zahvaljujući svom okluzivnom i emolijentnom efektu (Wolosik i sar., 2013), već i uticajem na specifičnu koloidnu strukturu uzoraka sa HSA i HSG, preciznije na obrazovanje lamelarne faze oko kapi masne faze kremova, o čemu nije bio dostupnih podataka. Zbog svega prethodno navedenog, nosači sa emulgatorom HSA i HSG predstavljaju dobar izbor krem podloge pri formulisanju liposomskih kozmetičkih emulzija.

Može se reći da rezultati ove doktorske disertacije počivaju na detaljnom pregledu raznovrsnih referenci i upotrebi adekvatnih metoda, čijim je uporednim tumačenjem dat jasan doprinos u oblasti: (i) ispitivanja i razvoja liposomskih kozmetičkih emulzija, (ii) uspostavljanja veza i odnosa između pristupa kombinovanog primenom generalnog faktorijalnog eksperimentalnog dizajna i instrumentalnih (reoloških i teksturnih) merenja sa senzornom analizom, (iii) razvoja formulacija sa novijim šećernim emulgatorima kao prospektivnih stabilizatora liposomskih emulzija.

#### **D. OBJAVLJENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DISERTACIJE**

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije do sada su objavljeni u vidu tri rada u časopisima koji su na SCI listi (jedan rad kategorije M22 i dva rada kategorije M23), kao i u obliku većeg broja saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima štampanih u izvodu. Podaci o publikovanim radovima dati su u nastavku:

- 1) M. Filipovic, M. Lukic, S. Djordjevic, V. Krstonosic, I. Pantelic, G. Vuleta and S. Savic. Towards satisfying performance of an O/W cosmetic emulsion: screening of reformulation factors on textural and rheological properties using general experimental design. *Int J Cosmetic Sci.* doi: 10.1111/ics.12402 (M22).
- 2) Filipović, M., Lukić, M., Krstonošić, V., Đorđević, S., Pantelić, I., Gledović, A., Vuleta, G. and Savić, S. Feasibility of a natural surfactant as a stabilizer for cosmetics with liposome-encapsulated plant stem cells: pre-formulation and formulation through stability studies. *Tenside Surf Det.* 2016; 53(3): 214-226. doi: 10.3139/113.110426 (M23).
- 3) Filipović M., Gledović A., Lukić M., Tasić-Kostov M., Isailović T., Pantelić I., Vuleta G., Savić S. Alp Rose stem cells, olive oil squalene and a natural alkyl polyglucoside emulsifier: Are they appropriate ingredients of skin moisturizers-in vivo efficacy on normal and sodium lauryl sulfate-irritated skin?. *Vojnosanitetski pregled.* 2016; 73(11): 991-1002. doi: 10.2298/VSP150116122F (M23).

## E. ZAKLJUČAK - OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DISERTACIJE

Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju nova ili dopunjena saznanja o potencijalnoj upotrebi novijeg alkil poliglukozidnog mešanog emulgatora - hidroksistearil alkohol i hidroskistearil glukozida, kao odgovarajućeg stabilizatora kozmetičkih emulzija u koje treba inkorporirati liposom-inkapsulirane biljne matične ćelije alpske ruže, sa kojim je moguće formulisati stabilne kremove sa estetski prihvatljivim osobinama za negu zdrave, ali i suve i iritirane kože, čak i kada je potrebno uraditi reformulaciju APG krema kao nosača za liposome.

Ispitivanja sprovedena sa navedenim APG mešanim emulgatorom, koja predstavljaju značajne nove podatke, pokazuju da poznavanje kritične micelarne koncentracije emulgatora u toku formulisanja emulzionih proizvoda, koji sadrže savremene nosače (poput liposoma), omogućuje procenu kompatibilnosti emulgatora i liposoma u navednim proizvodima, kao i procenu mogućnosti razvoja stabilnih proizvoda odgovarajućih estetskih i senzornih karakteristika, koji mogu uticati na delovanje na koži inkorporiranih kozmetički aktivnih supstanci. Dodatno, rezultati dobijeni tokom razvoja i karakterizacije nosača sa novim APG emulgatorom i liposom-inkapsuliranom aktivnom supstancom (biljnim matičnim ćelijama alpske ruže), generalno mogu da doprinesu postupcima koji se sprovedu tokom formulisanja kvalitetnih i bezbednih nosača sa inkapsuliranim aktivnim sastojcima, a važni su i za uvođenje novih kozmetičkih sirovina koje treba da ispune zahteve potrošača i propisa kozmetičkih proizvoda.

Utvrđeni pristup, kombinovan primenom generalnog faktorijskog eksperimentalnog dizajna i instrumentalnih metoda – teksturne analize i reoloških merenja, pruža mogućnost da se rezultati istraživanja primene u pristupačnijem procesu kreiranja i/ili reformulacije proizvoda prema očekivanjima/zahtevima korisnika i može se koristiti umesto određenih senzornih testova, koji se vrše u postupku reformulacije kozmetičkih proizvoda, kao što su (npr.) diskriminativni senzorni testovi.

## F. PREDLOG KOMISIJE ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija pod nazivom **"Kozmetičke emulzije na bazi prirodnog alkil poliglukozidnog emulgatora sa liposom-inkapsuliranim biljnim matičnim ćelijama: proučavanje fenomena na granici faza i biofizička merenja na koži"**, kandidata dipl. farm. Mile Đ. Filipović, po svom sadržaju i obliku, dobro napisanom opštem, uvodnom delu, jasno postavljenim istraživačkim ciljevima, zadovoljavajuće osmišljenoj metodologiji, precizno iznetim rezultatima rada, razložnoj diskusiji i dobro formulisanim zaključcima, ispunjava sve kriterijume adekvatno napisanog naučnog dela.

Komisija sa zadovoljstvom predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta u Beogradu da prihvati pozitivan izveštaj o izrađenoj doktorskoj disertaciji pod nazivom **"Kozmetičke emulzije na bazi prirodnog alkil poliglukozidnog emulgatora sa liposom-inkapsuliranim biljnim matičnim ćelijama: proučavanje fenomena na granici faza i biofizička merenja na koži"** i kandidatu dipl. farm. Mili Đ. Filipović odobri javnu odbranu doktorske disertacije po dobijanju saglasnosti Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu.

Beograd, 2.6.2017.

### Članovi Komisije

---

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

---

Dr Gordana Vuleta, redovni profesor u penziji  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr Milica Lukić, docent  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr Veljko Krstonošić, vanredni profesor  
Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet