

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Nataša Z. Bubić Pajić

**HEMIJSKI I FIZIČKI POJAČIVAČI
DERMALNE ISPORUKE SLABO
RASTVORLJIVIH LEKOVITIH
SUPSTANCI: UPOREDNA ISPITIVANJA
MIKROEMULZIJA, ČVRSTIH I
RASTVORLJIVIH MIKROIGALA**

doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET



Nataša Z. Bubić Pajić

**HEMIJSKI I FIZIČKI POJAČIVAČI
DERMALNE ISPORUKE SLABO
RASTVORLJIVIH LEKOVITIH
SUPSTANCI: UPOREDNA ISPITIVANJA
MIKROEMULZIJA, ČVRSTIH I
RASTVORLJIVIH MIKROIGALA**

doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Nataša Z. Bubić Pajić

**CHEMICAL AND PHYSICAL
ENHANCERS FOR DERMAL DELIVERY
OF POORLY SOLUBLE DRUGS:
COMPARATIVE STUDY OF
MICROEMULSIONS, SOLID AND
DISSOLVABLE MICRONEEDLES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

MENTOR

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

Dr sc. Sonja Vučen, docent, Univerzitet u Korku, Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

Dr sc. Ivana Pantelić, docent, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Ranko Škrbić, redovni profesor, Univerzitet u Banjoj Luci, Medicinski fakultet

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a deo eksperimenata je urađen na Farmaceutskom fakultetu u Korku (Irska), na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu Univerziteta u Nišu, na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu, na Institutu za biologiju, medicinsku hemiju i biotehnologiju, Nacionalne helenske istraživačke fondacije (Atina, Grčka) i na Institutu za farmaceutsku tehnologiju Eberhard-Karls Univerziteta u Tübingenu, Nemačka. Realizacija ove doktorske disertacije je bila deo naučnoistraživačkog projekta „Razvoj mikro- i nanosistema kao nosača za lekove sa antiinflamatornim delovanjem i metoda za njihovu karakterizaciju“ čiji je rukovodilac prof. dr Snežana Savić.

Neizmernu zahvalnost dugujem svom mentoru *prof. dr Snežani Savić*, koja me je vodila kroz sve aspekte izrade ove doktorske disertacije, na posvećenosti, bezrezervnoj podršci, nesebično prenesenom znanju, izuzetnom entuzijazmu i organizovanosti, kao i na ličnom angažovanju, ohrabrenju kad god je to trebalo, razumevanju i srdačnosti.

Veliku zahvalnost dugujem mojoj dragoj *dr sc. Sonji Vučen*, koja me je zajedno sa prof. dr Snežanom Savić vodila kroz ovu doktorsku disertaciju, na pruženoj nesebičnoj pomoći u eksperimentalnom radu, na naučenim dragocnim laboratorijskim tehnikama, velikoj i konkretnoj podršci u svakom smislu i iskrenom prijateljstvu i posvećenosti, ne samo tokom mog boravka u Irskoj, nego od samog početka mog bavljenja naučnoistraživačkim radom.

Veliko hvala *dr. sc. Ivani Pantelić* na izuzetnoj saradnji tokom svih faza izrade ove doktorske disertacije i na pomoći u tumačenju dobijenih rezultata u važnim delovima eksperimentalnog rada.

Hvala *prof. dr Ranku Škrbiću* na korisnim savetima, velikoj podršci i razumevanju, naročito tokom mojih čestih odsustava sa posla zbog obaveza u realizaciji eksperimentalnog rada.

Beskrajno se zahvaljujem *Tanji Ilić* i *Ines Nikolić* na nesebičnoj pomoći u sprovođenju eksperimenata, tumačenju rezultata, na deljenju svog znanja, ali i uvek srdačnom dočeku i lepom druženju.

Veliko hvala upućujem i svim profesorima, stručnom osoblju i kolegama sa Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Hvala mojim prijateljima i svim kolegama sa studijskog programa farmacija Medicinskog fakulteta u Banjoj Luci što su i kad je najteže bili tu za mene.

Najveću zahvalnost dugujem svojim najbližima, suprugu Dariu i našoj deci, roditeljima i sestri, uz čije sam ogromno razumevanje, beskrajnu ljubav i bezrezervnu podršku prebrodila sve teške trenutke u izradi ove doktorske disertacije.

Mojoj deci, Lazaru i Sonji

HEMIJSKI I FIZIČKI POJAČIVAČI DERMALNE ISPORUKE SLABO RASTVORLJIVIH LEKOVITIH SUPSTANCI: UPOREDNA ISPITIVANJA MIKROEMULZIJA, ČVRSTIH I RASTVORLJIVIH MIKROIGALA

SAŽETAK

Primarni cilj istraživanja ove doktorske disertacije je bila procena mogućnosti da se razvojem i primenom mikroemulzija (kao opcije hemijskog inhensera penetracije) poboljša dermalna isporuka slabo rastvorljivih lekovitih supstanci – adapalena (ADA) i sertakonazol-nitrata (SN), koje pripadaju različitim farmakoterapijskim grupama, imaju različite fizičko-hemijske osobine i primenjuju se u različitim terapijskim koncentracijama. Mikroemulzije su stabilizovane nejonskim surfaktantima novije generacije – alkil poligukozidima (APG) ili polioksietilen(glicerol) estrima masnih kiselina. U cilju komparativne procene doprinosa različitih vrsta nosača dermalnoj raspoloživosti model leka, posebna pažnja je posvećena analizi sposobnosti različitih vrsta mikroigala (fizički inhenseri penetracije) da pojačaju isporuku SN u kožu (čvrste silikonske vs. rastvorljive mikroigle).

Rezultati su ukazali da se još uvek nedovoljno korišćeni APG surfaktanti i glicerol-7-kaprilat/kaprat mogu uspešno primeniti u formulaciji mikroemulzija. Razvijene (invertne) bikontinuirane mikroemulzije su se pokazale kao pogodni nosači za solubilizovanje ADA i SN, u pogledu njihovih fizičko-hemijskih osobina, bezbednosti i stabilnosti, i, najvažnije, u pogledu njihovog potencijala za poboljšanje dermalne isporuke ovih lekova *in vitro*. Dodatno, rastvorljive mikroigle su uspešno formulisane kao nosači za dermalnu isporuku teško rastvorljivog SN i obezbedile komparabilno deponovanje leka u koži kao mikroemulzije, međutim uz prisustvo *in vitro* transdermalne isporuke dela primenjene doze leka. Sinergističko delovanje mikroigala i mikroemulzija bilo je superiorno u odnosu primenu samog fizičkog i samog hemijskog premošćivača barijere *stratum corneum*-a, bez značajnog povećanja permeacije leka.

Ključne reči: mikroemulzije, mikroigle, adapalen, sertakonazol-nitrat, dermalna isporuka leka, pojačivači penetracije

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska tehnologija

CHEMICAL AND PHYSICAL ENHANCERS FOR DERMAL DELIVERY OF POORLY SOLUBLE DRUGS: COMPARATIVE EVALUATION OF MICROEMULSIONS, SOLID AND DISSOLVABLE MICRONEEDLES

ABSTRACT

The aim of this doctoral dissertation was to evaluate the possibility of using microemulsions (as chemical penetration inerters) for improvement of dermal delivery of a poorly soluble model drugs having different physicochemical characteristics, belonging to different pharmacotherapeutic groups, i.e. applied in different therapeutic concentrations (adapalene (ADA) and sertaconazole nitrate (SN)). Microemulsions were stabilized with newer nonionic surfactants - alkyl polyglucosides (APG) or polyoxyethylene (glycerol) fatty acid esters. In order to compare the contribution of different types of carriers to the enhancement of dermal availability of the model drug, a special attention has been paid to the assessment of microneedles ability to significantly improve delivery of SN into the skin (dissolvable vs. solid silicone microneedles).

The obtained results showed that newer and so far insufficiently used APG surfactants and glycereth-7-caprylate/caprates can be successfully applied in the formulation of microemulsions. The developed (invert) bicontinuous microemulsion formulations have proved to be suitable carriers for solubilizing the investigated model drugs, in terms of their physicochemical properties, safety profile and stability, and, most importantly, their great potential of improving dermal delivery of ADA and SN *in vitro*. In addition, dissolvable microneedles were successfully fabricated as carriers for dermal delivery of highly lipophilic SN and provided comparable drug deposition in the skin as microemulsions, but coupled with transdermal delivery of a portion of the administered drug dose. The synergistic action of microneedles and microemulsions was superior over the application either of physical or chemical enhancer alone, without reaching a significant increase in drug permeation as compared to the use of dissolvable microneedles.

Keywords: microemulsions, microneedles, adapalene, sertaconazole nitrate, dermal drug delivery, penetration enhancers

Scientific field: Pharmacy

Scientific subfield: Pharmaceutical technology

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. TEORIJSKI ASPEKTI DERMALNE ISPORUKE LEKOVA	3
1.1.1. Putevi transporta lekova kroz kožu.....	4
1.1.2. Dermalna isporuka lekovitih supstanci u različite slojeve kože.....	4
1.1.3. Faktori koji utiču na penetraciju/permeaciju leka.....	5
1.1.3.1. Biološki faktori	5
1.1.3.2. Fizičko-hemijske osobine lekovite supstance	6
1.1.3.3. Fizičko-hemijske osobine nosača lekovite supstance	7
1.1.4. Metode za povećavanje isporuke lokalno primenjenih lekovitih supstanci u/kroz kožu.....	7
1.2. MIKROEMULZIJE KAO NOSAČI ZA ISPORUKU LEKOVA U/KROZ KOŽU.....	8
1.2.1. Teorije nastanka i stabilnost mikroemulzija	9
1.2.2. Struktura mikroemulzija	10
1.2.3. Izbor surfaktanata u formulaciji mikroemulzija	13
1.2.3.1. Alkil poliglukozidi u formulaciji mikroemulzija.....	14
1.2.3.2. Polietoksilovani surfaktanti u formulaciji mikroemulzija	17
1.2.4. Dermalna isporuka lekovitih supstanci putem mikroemulzija – mehanizmi i faktori koji utiču na povećanje penetracije lekova	18
1.3. MIKROIGLE KAO FIZIČKI POJAČIVAČI PENETRACIJE LEKA U/KROZ KOŽU	21
1.3.1. Vrste mikroigala.....	21
1.3.2. Faktori koji utiču na penetraciju mikroigala u kožu	24
1.3.3. Metode izrade mikroigala	26
1.3.4. Primena mikroigala u (trans)dermalnoj isporuci lekova.....	28
1.3.5. Komercijalizacija mikroigala.....	29
1.4. MODEL LEKOVITE SUPSTANCE – KANDIDATI ZA DERMALNU ISPORUKU	32
1.4.1. Fizičko-hemijske osobine, delovanje i upotreba sertakonazol-nitrata	33
1.4.2. Fizičko-hemijske osobine, delovanje i upotreba adapalena	35
2. CILJEVI RADA.....	39
2.1. CILJ PRVE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA	41
2.2. CILJ DRUGE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA	41
2.3. CILJ TREĆE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA	41

2.4.	CILJ ČETVRTE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA.....	42
3.	EKSPERIMENTALNI DEO	43
3.1.	MATERIJALI.....	45
3.2.	METODE.....	48
3.2.1.	Prva faza eksperimentalnog rada	48
3.2.1.1.	Konstruisanje pseudoternarnih faznih dijagrama.....	48
3.2.1.2.	Izrada mikroemulzija	48
3.2.1.3.	Ispitivanje rastvorljivosti model lekovitih supstanci – SN i ADA u sastojcima mikroemulzija i određivanje kapaciteta mikroemulzija za solubilizaciju SN i ADA.....	48
3.2.1.4.	Polarizaciona mikroskopija.....	49
3.2.1.5.	Karakterizacija mikrostrukture sistema	49
	Električna provodljivost	49
	Reološke karakteristike	49
	Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (engl. <i>Differential scanning calorimetry</i> – DSC).....	50
	Mikroskopija atomskih sila (engl. <i>Atomic Force Microscopy</i> – AFM).....	50
	Elektron paramagnetna rezonantna spektroskopija (engl. <i>Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy</i> – EPR)	50
3.2.2.	Druga faza eksperimentalnog rada.....	52
3.2.2.1.	Merenje pH vrednosti	52
3.2.2.2.	Merenje električne provodljivosti	52
3.2.2.3.	Ispitivanje reoloških karakteristika	52
3.2.2.4.	Procena interakcija lek-nosač – infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR spektroskopija)	52
3.2.3.	Procena lokalizacije lekovitih supstanci u mikroemulzijama.....	53
3.2.3.1.	Merenje dinamičkog međupovršinskog napona	53
3.2.3.2.	Elektron-paramagnetna rezonantna spektroskopija (EPR)	53
3.2.4.	Preliminarno ispitivanje stabilnosti mikroemulzija	53
3.2.5.	<i>In vivo</i> procena bezbednosnog profila mikroemulzija	53
3.3.	Treća faza eksperimentalnog rada	54
3.3.1.	Biofarmaceutske karakteristike mikroemulzija sa SN.....	54
3.3.1.1.	Procena <i>in vitro</i> oslobađanja SN iz mikroemulzionih vehikuluma kroz veštačku membranu primenom <i>Franz</i> -ovih difuzionih ćelija.....	54

3.3.1.2.	Procena <i>in vitro</i> oslobađanja SN iz mikroemulzionih vehikuluma kroz veštačku membranu primenom imerzionih ćelija	55
3.3.1.3.	<i>In vitro</i> studija penetracije/permeacije SN.....	55
3.3.2.	<i>In vitro</i> antifungalna aktivnost mikroemulzija sa SN	56
3.3.3.	Određivanje sadržaja SN primenom HPLC metode	56
3.3.4.	Biofarmaceutske karakteristike mikroemulzija sa ADA	56
3.3.4.1.	Procena <i>in vitro</i> oslobađanja ADA iz mikroemulzionih vehikuluma kroz veštačku membranu primenom <i>Franz</i> -ovih difuzionih ćelija.....	56
3.3.4.2.	<i>In vitro</i> studija penetracije/permeacije ADA	57
3.3.4.3.	<i>Diferencijalni stripping</i>	57
3.3.5.	Određivanje sadržaja ADA primenom UHPLC-MS/MS metode.....	58
3.4.	Četvrta faza eksperimentalnog rada.....	58
3.4.1.	Izrada rastvorljivih mikroigala.....	58
3.4.2.	Ispitivanje karakteristika rastvorljivih mikroigala	59
3.4.2.1.	Određivanje geometrije i morfoloških karakteristika rastvorljivih mikroigala	59
3.4.2.2.	Određivanje mehaničkih osobina rastvorljivih mikroigala.....	60
3.4.2.3.	Određivanje sadržaja SN u rastvorljivim mikroiglama	60
3.4.2.4.	<i>In vitro</i> brzina rastvaranja SN iz rastvorljivih mikroigala	61
3.4.3.	<i>In vitro</i> procena penetracije/permeacije SN primenom mikroigala	61
3.4.3.1.	Određivanje sadržaja SN primenom UHPLC-MS/MS metode	62
4.	REZULTATI I DISKUSIJA	63
4.1.	REZULTATI I DISKUSIJA PRVE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA	65
4.1.1.	Konstruisanje pseudoternarnih faznih dijagrama.....	65
4.1.1.1.	Uticaj vrste uljane faze na formiranje mikroemulzija u pseudoternarnom sistemu ulje/Plantacare® 2000 UP-propilenglikol/voda.....	65
4.1.1.2.	Uticaj vrste APG na formiranje mikroemulzija u pseudoternarnom sistemu Capryol™ 90/APG-propilenglikol/voda.....	67
4.1.1.3.	Procena efikasnosti gliceret-7-kaprilat/kaprata (Emanon® EV-E) u formiranju mikroemulzija u pseudoternarnom sistemu Capryol™ 90/polietoksilovani surfaktant-Transcutol® P/voda	69
4.1.1.4.	Procena efikasnosti gliceret-7-kaprilat/kaprata (Emanon® EV-E) u formiranju mikroemulzija u pseudoternarnom sistemu Capryol™ 90/Emanon® EV-E:kosurfaktant/voda	70
4.1.2.	Ispitivanje rastvorljivosti model lekovitih supstanci u sastojcima mikroemulzija	72

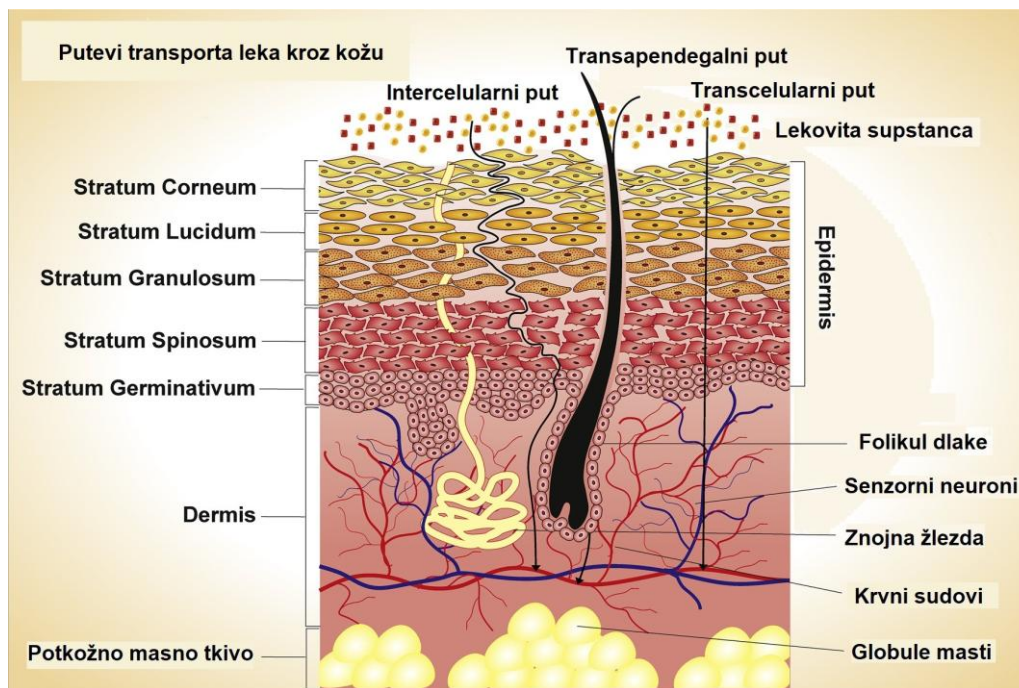
4.1.3.	Određivanje kapaciteta mikroemulzija za solubilizaciju model lekovitih supstanci – selekcija nosača za dermalnu primenu SN i ADA	74
4.1.4.	Strukturna karakterizacija odabranih mikroemulzionih formulacija kao nosača za model lekovite supstance	75
4.1.4.1.	Merenje električne provodljivosti	76
	Merenje električne provodljivosti u pseudoternarnim sistemima ulje/APG-propilenglikol/voda	76
	Merenje električne provodljivosti u pseudoternarnim sistemima Capryol™ 90/polietoksilovani surfaktant-kosurfaktant/voda	78
4.1.4.2.	Reološka merenja.....	80
4.1.4.3.	Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)	82
4.1.4.4.	Mikroskopija atomskih sila (AFM)	87
4.1.4.5.	Elektron paramagnetna rezonantna spektroskopija (EPR)	88
4.2.	REZULTATI DRUGE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA	91
4.2.1.	Fizičko-hemijska karakterizacija mikroemulzija bez i sa solubilizovanim model lekovitim supstancama.....	91
4.2.1.1.	Procena interakcija leka i nosača – infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR spektroskopija)	95
4.2.2.	Procena lokalizacije lekovitih supstanci u mikroemulzijama.....	97
4.2.2.1.	Merenje dinamičkog međupovršinskog napona	97
4.2.2.2.	Elektron-paramagnetna rezonantna spektroskopija (EPR)	98
4.2.3.	Ispitivanje stabilnosti mikroemulzija.....	98
4.2.4.	<i>In vivo</i> procena bezbednosnog profila mikroemulzija.....	100
4.3.	REZULTATI TREĆE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA	105
4.3.1.	Biofarmaceutske karakteristike mikroemulzija sa SN	105
4.3.1.1.	Procena <i>in vitro</i> oslobađanja SN iz mikroemulzija kroz veštačku membranu primenom <i>Franz</i> -ovih difuzionih ćelija i imerzionih (inhenser) ćelija.....	105
4.3.1.2.	<i>In vitro</i> studija penetracije/permeacije SN.....	109
4.3.1.3.	<i>In vitro</i> ispitivanje antifungalne aktivnosti mikroemulzija sa SN	112
4.3.2.	Biofarmaceutske karakteristike mikroemulzija sa ADA	112
4.3.2.1.	Procena <i>in vitro</i> oslobađanja ADA kroz veštačku membranu primenom <i>Franz</i> -ovih difuzionih ćelija	112
4.3.2.2.	<i>In vitro</i> studija penetracije/permeacije ADA	114
4.3.2.3.	Procena penetracije ADA primenom metode <i>diferencijalnog stripping-a</i>	118

4.4.	REZULTATI I DISKUSIJA ČETVRTE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA	121
4.4.1.	Izrada rastvorljivih mikroigala.....	121
4.4.2.	Ispitivanje karakteristika rastvorljivih mikroigala	125
4.4.2.1.	Procena morfoloških i mehaničkih osobina rastvorljivih mikroigala	125
4.4.2.2.	Određivanje sadržaja SN u rastvorljivim mikroiglama	126
4.4.2.3.	<i>In vitro</i> procena brzine rastvaranja rastvorljivih mikroigala.....	126
4.4.3.	<i>In vitro</i> procena penetracije/permeacije SN primenom različitih vrsta mikroigala	128
4.4.3.1.	<i>In vitro</i> procena penetracije/permeacije SN kombinovanom primenom mikroemulzija i čvrstih silikonskih mikroigala („ <i>poke and patch</i> “ pristup)	128
4.4.3.2.	<i>In vitro</i> procena penetracije/permeacije SN primenom rastvorljivih mikroigala („ <i>poke and release</i> “ pristup)	130
5.	ZAKLJUČCI.....	137
5.1.	Prva faza eksperimentalnog rada	139
5.2.	Druga faza eksperimentalnog rada.....	140
5.3.	Treća faza eksperimentalnog rada	141
5.4.	Četvrta faza eksperimentalnog rada.....	142
5.5.	Konačan osvrt i budući koraci	142
6.	LITERATURA	145
7.	PRILOZI.....	165
7.1.	Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine sastavni deo doktorske disertacije.....	167
8.	BIOGRAFIJA	169
8.1.	Biografija autora	171
9.	IZJAVE.....	173
9.1.	Izjava o autorstvu.....	175
9.2.	Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije dokorskog rada.....	177
9.3.	Izjava o korišćenju	179

1. UVOD

1.1. TEORIJSKI ASPEKTI DERMALNE ISPORUKE LEKOVA

Koža (Slika 1.1) predstavlja najveći organ ljudskog tela i čini oko 10% ukupne težine tela, sa prosečnom površinom od blizu 2 m². Kao rezultat izuzetnih osobina koje poseduje, koža je visoko selektivna prema supstancama koje ulaze ili izlaze iz tela i određuje brzinu kojom se ovi procesi odvijaju. Iz istog razloga transport lekovitih supstanci u/kroz kožu predstavlja izazov, imajući u vidu da njihovi molekuli često imaju nisku permeabilnost [1].



Slika 1.1. Građa kože i putevi transporta kroz kožu (preuzeto i prilagođeno prema referenci [2])

U savremenoj dermatološkoj praksi, cilj primene lekovitih preparata na kožu može biti isporuka leka na površinu kože, unutar kože (u epidermis ili dermis), što podrazumeva dermalnu isporuku lekova, ili u sistemsku cirkulaciju (transdermalna isporuka). Dakle, dermalna isporuka lekova je lokalizovana isporuka lekovitih supstanci u kožu kako bi se lečila kožna oboljenja i sprečilo sistemsko izlaganje leku, odnosno sprečila sistemski neželjena dejstva [3]. Površina kože je ciljno mesto delovanja za antiseptike, insekt-repelente ili kozmetičke proizvode. Isporuka lekovitih supstanci u kožu je relevantna kada je oboljenje (oštećenje tkiva) zahvatilo kožu kao organ, npr. lečenje neoplazmi, inflamatornih oboljenja ili mikrobnih infekcija kože. Ipak, nezavisno od ciljnog mesta delovanja, obavezno je da lekovita supstanca prođe spoljašnji sloj kože – *stratum corneum* (SC) [4, 5]. Kako bi se ovaj proces pospešio i poboljšao transport lekovitih supstanci u/kroz kožu koriste se mnogobrojne pasivne i aktivne strategije, o kojima će biti reči u narednim poglavljima ove doktorske disertacije. Naponi koji se ulažu u unapređenje lokalne terapije kožnih oboljenja (odnosno unapređenje dermalne isporuke lekova), ali i sistemskih oboljenja (unapređenje transdermalne isporuke lekova), proističe iz brojnih prednosti koje lokalna primena preparata na koži ima u odnosu na parenteralnu i oralnu primenu lekova: povećana komplijansa pacijenata uz smanjenje troškova terapije, izbegavanje metabolizma prvog prolaza kroz jetru, mogućnost produžene i kontrolisane isporuke lekovite supstance, koncentrisanje lekovite supstance na mestu delovanja, sprečavanje sistemskih neželjenih efekata, jednostavna i neinvazivna primena, jednostavan prekid terapije uklaňanjem preparata sa kože [6, 7]. Međutim, za racionalan razvoj farmaceutskih oblika za dermalnu primenu, neophodno je sveobuhvatno razumevanje strukture, kao i transportnih karakteristika kože.

1.1.1. Putevi transporta lekova kroz kožu

Sa anatomskog aspekta, ljudska koža predstavlja slojeviti epitel, a svaki sloj tkiva se sastoji od različitih tipova ćelija, koje vrše različite funkcije. U širem smislu, koža se sastoji iz tri sloja: epidermis, dermis i hipodermis (potkožno tkivo) (Slika 1.1). U koži se nalaze i lojne i znojne žlezde, folikuli dlaka te nokti. Lekovita supstanca primenjena u odgovarajućoj formulaciji ima u osnovi tri različite mogućnosti za penetraciju/permeaciju u/kroz kožu (Slika 1.1), i to prevashodno mehanizmom pasivne difuzije [8, 9]:

- transcelularno (molekuli prolaze direktno preko SC kroz keratinocite i lipidni matriks – pravolinijski do dermisa). Priroda supstance koja permeira određuje značaj ovog načina transporta koji je više pogodan za hidrofилne molekule. Međutim, ograničavajući faktor u njihovom transportu predstavljaju lipidni dvoslojevi.
- paracelularno ili intercelularno (najčešći način transporta lekovitih supstanci sa izuzetkom supstanci visoke hidrofилnosti – difuzija molekula leka kroz kontinuirani matriks intercelularnih lipida SC), i
- transapendegalno (kroz dodatke kože – folikule dlaka, znojne ili lojne žlezde). Doprinos ovog puta transporta je relativno mali, zbog proporcionalno male površine koju zauzimaju dodaci koži u odnosu na celu površinu kože. Međutim, transport kroz folikule dlaka i lojne žlezde može da bude značajan u slučaju nekih lekova ili formulacija koje u kožu ulaze brže kroz ove zaobilaznice nego kroz SC.

Moguće je da lekovita supstanca penetrira u kožu kombinacijom različitih mehanizama transporta, a u zavisnosti od njenih fizičko-hemijskih karakteristika, pre svega particionog koeficijenta, određeni put transporta postaje dominantan [9]. Pored toga, sudbina leka koji se primenjuje na kožu zavisi i od fizičko-hemijskih osobina nosača leka/podloge, kao i od stanja kože na mestu primene [4, 6], što je kasnije preciznije objašnjeno.

1.1.2. Dermalna isporuka lekovitih supstanci u različite slojeve kože

Stratum corneum (SC) je nevijabilni epidermis sa debljinom 10-20 μm , koji se sastoji od 15 do 25 slojeva zbijenih i zaravnjenih orožalih ćelija – korneocita (Slika 1.1). Korneociti su uglavnom sačinjeni od snopova nerastvornog keratina (~70%) i lipida (~10%), obavijeni su ćelijskom opnom i okruženi lipidnim matriksom koji je uglavnom sačinjen od ceramida (50%), holesterola (25%) i slobodnih masnih kiselina (15%). S obzirom da većina lekova permeira kroz kožu upravo preko lipidnih domena, organizacija lipidnog matriksa je veoma važna za očuvanje barijerne funkcije kože [1, 4]. Zbog značajne redukcije nivoa ceramida u nekim oboljenjima (psorijaza, atopijski dermatitis), barijera SC je narušena te se bolesna koža može tretirati egzogeno primenjenim lipidima. Lipofilna sredina SC je takođe značajno mesto delovanja antioksidansa α -tokoferola, ali i rezervoar za neke lipofilne lekove (kortikosteroide). Osim toga, isto se može omogućiti zahvaljujući afinitetu nekih lekova za keratin (npr. itrakonazol). Na ovaj način se obezbeđuje akumulacija lekovitih supstanci u SC i njihovo lokalno delovanje na mestu primene [3].

Ispod SC se nalazi vijabilni epidermis, kojeg za razliku od SC čine ćelije sa jedrom (Slika 1.1). Sastavljen je primarno od keratinocita (95%). Osnovna funkcija vijabilnog epidermisa je obnavljanje SC, a ostale funkcije uključuju sintezu melanina za pigmentaciju kože i zaštitu od sunca [1, 4]. Mnoge bolesti kože pogađaju upravo ovaj sloj kože – kožne gljivične infekcije, psorijaza, melanom, dok se zbog prisustva imunološki osetljivih ćelija (Langerhansovih ćelija) smatra i ciljnim mestom za vakcine i gene. Međutim, unatoč postojanju značajne barijere između epidermisa i dermisa zbog prisustva tesnih veza (engl. *the tight junctions*), ciljna isporuka lekova u vijabilni epidermis bez prelaska u dermis predstavlja veliki izazov za istraživače [3].

Naredni sloj kože je dermis (Slika 1.1), koji je debljine oko 3-5 mm, a sadrži nerve, krvne i limfne sudove, folikule dlaka, nociceptore, lojne i znojne žlezde i imunske ćelije. Uglavnom se sastoji od vezivnog tkiva (fibroblasta u ekstracelularnom matriksu izgrađenom od strukturnih proteina – kolagena i elastina) [1, 6]. Usled prisustva imunskih ćelija u dermisu, smatra se da dermis ima značajnu ulogu u infekcijama parazitima, indukciji psorijaze, progresiji tumora, inflamaciji kože, angiogenezi, zaceljivanju rana, remodelovanju tkiva i osetljivosti kože. Stoga, regionalna akumulacija u dermisu je neophodna za delovanje mnogih lekova koji se koriste u prevenciji i lečenju ovih lokalnih oboljenja kože [3].

U poslednje vreme veliki interes vlada za transfolikularnu isporuku lekova, naročito onih koji se koriste u tretmanu akni, seboroičnog ekcema, alopecije, nekih vrsta raka kože, hipertrihozе i rozacee [3], zbog čega je veoma važno da se poznaje struktura folikula dlake, njegovog sadržaja i lojnih žlezda (engl. *pilosebaceous unit*). Folikul dlake predstavlja invaginaciju epidermisa duboko u dermis. Povezan je sa mrežom kapilara zbog čega obezbeđuje efektivnu površinu za resorpciju lekova koji dospevaju u folikul. Folikularni otvori čine obično 0,1% ukupne površine kože, međutim na pojedinim delovima tela mogu da zauzmu i 10% površine (npr. lice i vlasište). Ovi adneksi kože nisu prisutni na usnama, dlanovima i tabanima. Gustina folikula iznosi obično 14 do 32 folikula po cm² kože vrata, grudnog koša, ruku, butina i potkoljenica, ali može dostići vrednost i do 292 folikula po cm² kože čela. Sa druge strane, manje varijacije se mogu uočiti u prečniku folikula dlaka – 30 do 80 μm. Terminalne dlake se protežu i do 3 mm u hipodermis, dok tanke, svetle dlake, prisutne po rođenju (velus dlake), dospevaju u dermis do dubine od 1 mm. Folikuli dlaka su ispunjeni sebumom koga luče lojne žlezde, a koji predstavlja smešu kratkolančanih masnih kiselina sa bakteriostatskim i fungistatskim delovanjem. Sebum ima važnu ulogu u podmazivanju površine kože i održavanju njene pH vrednosti. Pored toga, prisustvo sebuma može olakšati transport lipofilnih molekula u/kroz kožu [10, 11].

Hipodermis je najdublji sloj kože (Slika 1.1) koji predstavlja potporu za epidermis i dermis. Sastoji se uglavnom od ćelija masnog i vezivnog tkiva. U ovom sloju se nalaze veći limfni i krvni sudovi [1, 6].

1.1.3. Faktori koji utiču na penetraciju/permeaciju leka

Kao što je već pomenuto, mogućnost da lekovita supstanca dospe do određenog odeljka u koži zavisi ne samo od njenih fizičko-hemijskih karakteristika, nego i od fizičko-hemijskih osobina nosača odnosno podloge u koju je inkorporirana, kao i stanja kože na mestu gde se preparat primenjuje [4, 6].

1.1.3.1. Biološki faktori

- Varijacije anatomskog mesta

Debljina kože, priroda SC i gustina dodataka kože variraju od mesta do mesta. Stoga, permeacija supstanci kroz kožu može da se odvija prema različitim modelima na različitim regionima kože. Opšte je prihvaćeno da su neki delovi tela (glava i genitalna regija) permeabilniji od drugih (ekstremiteti) [4].

- Intraindividualne i interindividualne varijacije

Debljina kože, gustina apendiksa kože i keratinizacija kože varijaju od jedinke do jedinke, kao i kod iste jedinke, što može da se reflektuje i na permeabilnost kože [4, 9].

- Polne i starosne varijacije

Mlada koža je permeabilnija u odnosu na stariju kožu, a deca su osetljivija na apsorpciju toksičnih materija putem kože. Brojne fiziološke promene povezane sa starenjem, kao što su povećanje veličine korneocita SC, smanjenje stepena hidratisanosti i sadržaja lipida, smanjenje brzine obnavljanja epiderma i smanjenje mikrovaskularnog klirensa, mogu da budu uzrok smanjene permeabilnosti kože za hidrofobne supstance, dok za hidrofilne supstance nije primećen isti trend [4, 6, 9].

- Rasne razlike

Budući da crna koža ima više slojeva ćelija u SC i veći sadržaj lipida, pokazano je da je ona nešto manje permeabilna od bele kože [6]. Međutim, u nekim studijama nisu zabeležene statistički značajne razlike između permeabilnosti belog, crnog i azijskog tipa kože [4].

- Metabolizam i prokrvljenost kože

Opšte je prihvaćeno da koža ispoljava potencijal za biotransformaciju molekula. Pokazano je da se u koži metabolišu steroidi, hormoni, karcinogene materije i neki lekovi, tako da metabolizam leka u koži određuje efikasnost njegove permeacije kroz kožu. Takođe, i promene u perifernoj cirkulaciji mogu da utiču na dermalnu apsorpciju molekula [9].

- Stanje kože

Kiseline i baze, mnogobrojni rastvarači poput hloroforma i metanola, oštećuju ćelije kože i pospešuju penetraciju. Obolela koža takođe ima različite osobine od zdrave kože. U svim slučajevima, intaktna koža predstavlja efikasniju barijeru za prodor stranih molekula nego oštećena ili obolela koža [9].

1.1.3.2. Fizičko-hemijske osobine lekovite supstance

Tokom mnogobrojnih istraživanja perkutane resorpcije lekova, došlo se do saznanja da na permeaciju utiču različite fizičko-hemijske karakteristike molekula lekovite supstance:

- Rastvorljivost leka

Da bi se osigurao visok koncentracioni gradijent, koji je pokretačka snaga za difuziju leka kroz kožu, neophodno je da lekovita supstanca ima odgovarajuću rastvorljivost u vodi i lipidima [8].

- Particioni koeficijent

Za postizanje odgovarajuće penetracije/permeacije leka, potrebno je da supstanca ima odgovarajući particioni koeficijent. Visoke vrednosti particionog koeficijenta ($\log P > 3$) ukazuju na to da lek lako ulazi u SC, iako nema tendenciju da prođe u dublje slojeve kože. U slučaju hidrofилnih molekula ($\log P < 1$) dominantan je transcelularni put transporta pri čemu se kod njih može očekivati slaba penetracija. Molekuli sa srednjim vrednostima particionog koeficijenta ($\log P$ 1-3) su idealni kandidati za transdermalnu isporuku [6, 9].

- Veličina molekula lekovite supstance/molekulska masa

Veličina molekula leka (molekulska masa) je obrnuto proporcionalna transdermalnom fluksu. Ukoliko je cilj transdermalna isporuka leka, molekulska masa leka treba da bude ≤ 400 Da [6]. Generalno, da bi molekule leka lako penetrirale u SC, potrebno je da budu manje od 600 Da. Međutim to ne isključuje mogućnost penetracije i većih molekula [12].

- Jonizacija lekovite supstance

Slabe kiseline i slabe baze jonizuju u zavisnosti od pH vrednosti nosača leka i njihovih pKa ili pKb vrednosti. Frakcija nejonizovanog oblika leka određuje količinu leka koja će proći u vijabilni epidermis [9].

- Tačka topljenja

Niska tačka topljenja je u korelaciji sa visokom rastvorljivošću, koja je preduslov za postizanje visokog koncentracionog gradijenta [8].

- Potencijal molekula za vezivanje za komponente kože

Vezivanje molekula lekovite supstance za različite komponente kože može da umanjí dalju penetraciju leka [12].

- Difuzioni koeficijent između kože i nosača

Penetracija molekula leka zavisi od njegovog difuzionog koeficijenta, koji je pri konstantnoj temperaturi funkcija osobina leka, difuzionog medijuma i interakcije između leka i medijuma [6, 9].

1.1.3.3. Fizičko-hemijske osobine nosača lekovite supstance

Nakon primene formulacije leka na kožu, svi sastojci formulacije, ne samo lekovita supstanca, mogu da penetriraju u kožu u različitom stepenu. Takođe, većina formulacija se nanosi na kožu bez okluzije što može da dovede do promena u sastavu formulacije zbog isparavanja vode i drugih sastojaka, resorbovanja neisparljivih supstanci, difuzije komponenti kože, znoja i/ili sebuma u formulaciju leka. Dakle, fizičko-hemijske karakteristike nosača/podloge mogu znatno da utiču na penetraciju/permeaciju leka [12].

➤ Hidratacija kože

U kontaktu sa vodom permeabilnost kože značajno raste jer povećana hidratacija dovodi do bubrenja korneocita, raskidanja veza između lipida i ćelija SC, kao i povećanja fluidnosti lipida. Pokazano je da u slučaju lipofilnih molekula njihov koeficijent permeabilnosti opada kako se povećava lipofilnost nosača kojim se primenjuje [4, 9].

➤ Termodinamički efekat nosača

Premda je maksimalni fluks konvencionalno određivan iz zasićenih rastvora, danas je poznato da se upotrebom presićenih rastvora mogu dobiti više vrednosti fluksa zahvaljujući povećanju rastvorljivosti supstance u SC i „guranju“ permeanta u SC. Međutim, u praktičnom smislu, može da se pojavi problem u održavanju dugoročne fizičke stabilnosti presićenih preparata [4, 5].

➤ Mehanizam oslobađanja lekovite supstance iz nosača

Mehanizam kojim se lekovita supstanca oslobađa iz nosača zavisi od toga da li je ona rastvorena ili suspendovana u vehikulumu, međufaznog particionog koeficijenta (između nosača i kože), kao i pH vrednosti nosača, koja treba da bude odgovarajuća za nejonizovani oblik lekovite supstance [4, 6].

➤ Viskozitet nosača

Poznato je da je difuzioni koeficijent molekula smanjen u viskozim nosačima što odlaže ili sprečava njihovu raspodelu i prelazak u kožu [12].

➤ Sastav nosača

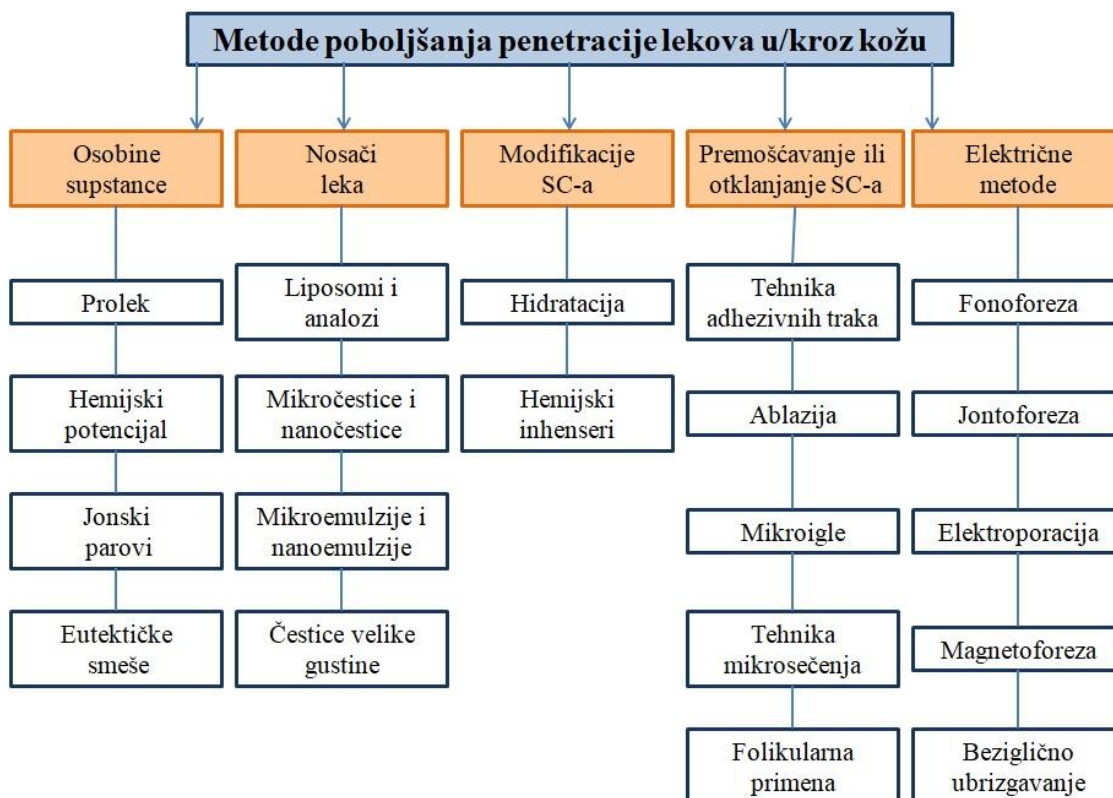
U nekim slučajevima sastav i sastojci nosača ne utiču na mehanizam oslobađanja lekovite supstance, ali utiču na permeaciju/penetraciju. Na primer, metil-salicilat je više lipofilan nego salicilna kiselina, i ukoliko su ove dve supstance prisutne u istoj formulaciji, perkutana resorpcija metil-salicilata će biti veća. Osim toga, potencijal nekih sastojaka podloge za povećanu penetraciju lekovitih supstanci u kožu ne treba da bude potcenjen. Prisustvo rastvarača, surfaktanata, inhensera penetracije i drugih supstanci može da promeni ili ošteti strukturu SC, dovodeći posledično do potencijalnog povećanja perkutane apsorpcije svih sastojaka primenjene formulacije [6, 12].

Kada je reč o primeni lekovitih supstanci inkorporiranih u nanostrukturirane nosače lekova, ne treba da se zanemari uticaj veličine, oblika i karakteristika površine nosača (polarnost, naelektrisanje) na put penetracije čestica/kapi nosača u kožu, dubinu penetracije, difuzioni koeficijent leka u koži i nosaču i na potencijal za vezivanje za određene komponente kože (npr. elektrostatičke, dipol-dipol, hirofobne ili vodonične veze) [12].

1.1.4. Metode za povećavanje isporuke lokalno primenjenih lekovitih supstanci u/kroz kožu

Primarna barijera za prolazak lekovitih supstanci u/kroz kožu je SC. Kako bi se ostvario primarni cilj u dermalnoj isporuci lekova – prevazilaženje SC, i poboljšala efikasnost postojećih formulacija lekova, ulažu se veliki naponi i razvijaju nove strategije koje su usmerene na: i) promenu interakcija lek-nosač koje bi dovele do: (i) poboljšanja raspodele leka u SC; ii) modifikovanje strukture i fizičko-hemijskih karakteristika SC kako bi se smanjio otpor difuziji leka; iii) povećanje hidratacije SC (Slika 1.2). Osim toga, opisane su i različite fizičke metode kojima

može da se optimizuje isporuka leka u određene slojeve kože ili kroz kožu. Dakle, svi pristupi koji se primenjuju kako bi se prevazišla i modifikovala barijera SC se generalno mogu podeliti na pasivne/hemijske i aktivne/fizičke. Pasivne metode uključuju lek-nosač interakcije i optimizaciju formulacija kako bi se modifikovao SC. Fizičke metode pružaju mogućnost poboljšanja dermalne isporuke većeg broja lekovitih supstanci, a zasnivaju se na primeni eksterne energije koja predstavlja pokretačku snagu za transport lekova u kožu ili su zasnovane na fizičkom narušavanju barijere SC [5, 6].



Slika 1.2. Prikaz metoda za poboljšanje dermalne isporuke lekovitih supstanci (prilagođeno prema referencama [6, 13])

U okviru ove doktorske disertacije, od pobrojanih pristupa biće detaljno opisani formulacioni pristup uz upotrebu hemijskih inhensera penetracije – mikroemulzija, kao i premoščavanje SC primenom fizičkih pojačivača penetracije – mikroigala.

1.2. MIKROEMULZIJE KAO NOSAČI ZA ISPORUKU LEKOVA U/KROZ KOŽU

U poslednjih nekoliko decenija, različiti mikro- i nanostrukturirani sistemi se ispituju kao potencijalni nosači koji mogu da pojačaju penetraciju i malih molekula, ali i makromolekula, koji ne mogu na drugi način premostiti barijeru SC u dovoljnim količinama za postizanje terapijskog odgovora. Među njima su posebno interesantni emulzioni nosači sa nanostrukturom (mikroemulzije i nanoemulzije) za lokalnu primenu farmaceutskih preparata, kozmetičkih i proizvoda opšte upotrebe [14].

Koncept mikroemulzija je predstavljen četrdesetih godina prošlog veka kako bi se opisali transparentni jednofazni sistemi dobijeni titracijom mlečno bele emulzije heksanolom. Međutim, sam termin je skovan nešto kasnije (1959) i od tada je redefinisano više puta. U okviru ove doktorske

disertacije pojam mikroemulzija odnosiće se na sistem koji su definisali Danielsson i Lindman 1981. godine – jednofazni, optički izotropan, termodinamički stabilan tečni sistem sastavljen od vode, ulja i amfifila [15]. Termin mikroemulzija se ponekad koristi u pogrešnom smislu. Sa jedne strane različiti homogeni rastvori koji sadrže surfaktante se označavaju kao mikroemulzije, dok sa druge strane izraz navodi na sistem koji ima karakteristike emulzija gde je veličina kapi u submikronskom opsegu [16]. Pored toga, u naučnoj literaturi se veoma često prave greške prilikom klasifikacije koloidnih disperzija, pri čemu su neki istraživači sasvim sigurno pripremali mikroemulzije, a označavali ih kao nanoemulzije, i obrnuto. Takođe, prilikom opisivanja mikroemulzija kapljičnog tipa veoma često se koristi termin nabubrele micle [15-17]. Ipak, bez obzira na to što micle po svojoj definiciji nisu mikroemulzije, veliki broj istraživača zapravo ne pravi razliku između ovih dveju struktura [15]. U Tabeli 1.1 je dat pregled osnovnih razlika i sličnosti mikroemulzija u odnosu na konvencionalne emulzije, nanoemulzije i micelarne rastvore. Za razliku od emulzija, mikroemulzije su bistre ili translucetne tečnosti sa malom veličinom kapi (generalno ispod 150 nm), dok su emulzije mlečno bele, grube disperzije sa kapima mikronskih dimenzija i nešto iznad. Postoji još jedna razlika, a odnosi se na njihovu stabilnost: mikroemulzije su termodinamički stabilne i za njihovu izradu nije potrebna spoljašnja energija, dok emulzije ispoljavaju kinetičku stabilnost. Takođe, i nanoemulzije su kinetički, a ne termodinamički stabilni sistemi, i priprema stabilnih nanoemulzija uobičajeno zahteva veliki utošak energije [18]. Ostale značajne osobine emulzija, mikroemulzija, nanoemulzija i micelarnih rastvora su sumirane u Tabeli 1.1.

Tabela 1.1. Upporedni pregled karakteristika mikroemulzija u odnosu na različite disperzne sisteme (prilagođeno prema referencama [16-20])

Parametar	Mikroemulzije	Nanoemulzije	Emulzije	Micelarni rastvori
Tip disperzije	koloidna	koloidna	gruba	koloidna
Veličina dispergovane faze *	10-100 nm	< 250 nm	> 500 nm	< 5 nm
Termodinamička stabilnost	da	ne	ne	da
Obrazovanje	spontano	zahteva energiju	zahteva energiju	spontano
Koncentracija surfaktanta	> 10%	< 10%	1-20%	< 5%
Prisustvo kosurfaktanta	da	da	ne	ne
Konzistencija	tečna	tečna	tečna/ polučvrsta	tečna
Turbiditet	transparentne	translucentne/ mlečno bele	mutne	transparentni

1.2.1. Teorije nastanka i stabilnost mikroemulzija

Kako bi se objasnio obrazovanje (nastanak) i stabilnost mikroemulzija, u literaturi su opisana tri različita pristupa: teorija međupovršinskog ili mešanog filma, teorija solubilizacije i termodinamička teorija [15]. Međutim, uobičajen pristup kojim se objašnjava nastanak mikroemulzija podrazumeva primenu zakonitosti termodinamike [16, 18].

Prema termodinamičkoj teoriji, uspostavljanje termodinamičke ravnoteže pri obrazovanju mikroemulzija je u vezi sa smanjenjem ukupne energije sistema. Naime, u slučaju mešanja vodene i uljane faze, vrednost međupovršinskog napona je visoka i spontano obrazovanje mikroemulzija nije

moguće. Međutim, za dostizanje ovog cilja neophodno je smanjenje njegove vrednosti. Kako je međupovršinski napon (γ) pri konstantnoj temperaturi i pritisku direktno proporcionalan Gibsovoj slobodnoj energiji sistema (ΔG), odnosno razlici energetske stanja mikroemulzije i smeše u kojoj su vodena i uljana faza razdvojene, sledi da je za formiranje mikroemulzija neophodno smanjenje slobodne energije sistema, što se postiže dodatkom surfaktanata i kosurfaktanata. Ovaj proces se može opisati sledećom jednačinom:

$$\Delta G = \gamma\Delta A - T\Delta S \quad \text{Jednačina 1.1}$$

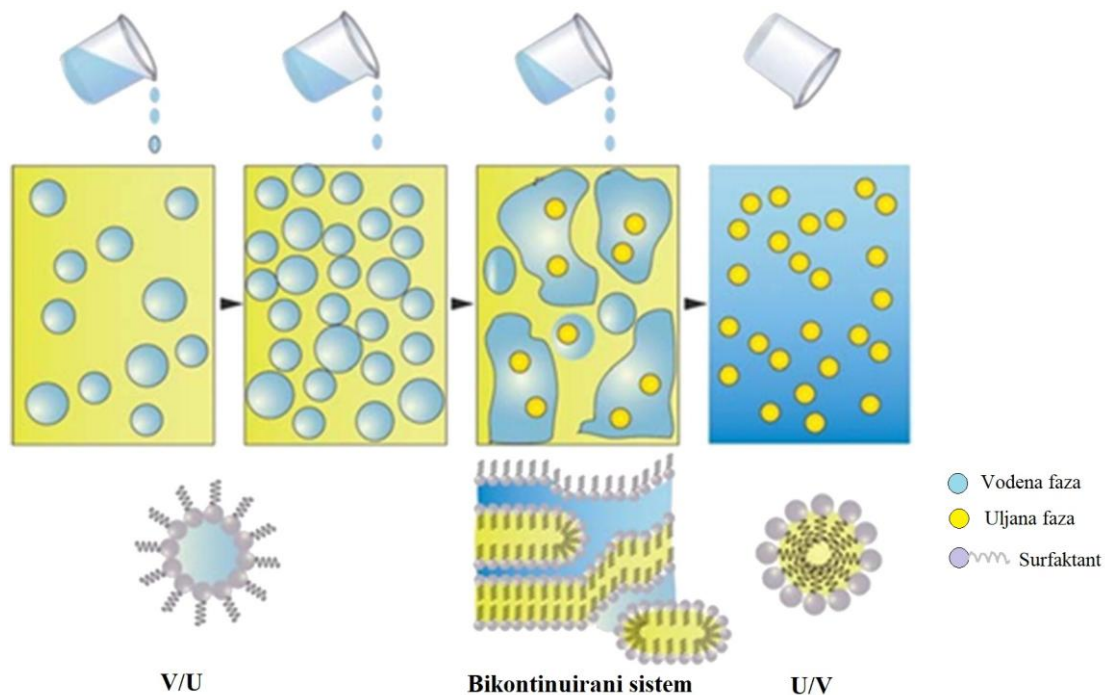
gde je ΔA promena u dodirnoj površini između faza, T temperatura i ΔS promena entropije u sistemu. Prilikom mikroemulgovanja dolazi do velike promene u veličini međupovršine zbog smanjenja veličine kapi. Sa druge strane međupovršinski napon opada dramatično zbog prisustva surfaktanata na međupovršini između ulja i vode, ali sve vreme ima pozitivnu vrednost. Ipak, za postizanje veoma niskih vrednosti međupovršinskog napona ($\leq 10^{-2} - 10^{-3}$ mN/m), najčešće je potreban dodatak kosurfaktanta koji penetrira na međupovršinu i povećava njenu zakrivljenost i fluidnost. Dakle, $\gamma\Delta A$ je uvek pozitivna vrednost, što predstavlja faktor koji se odupire obrazovanju mikroemulzija. Međutim, uticaj ovog faktora kompenzuje drastična promena entropije sistema uzrokovana povećanjem broja kapi malih veličina koje se mogu organizovati na različite načine. Na porast entropije sistema utiču i ostali dinamički procesi kao što je difuzija molekula surfaktanta u međupovršinski film i njihova razmena između micela. Dakle, zbog velikog povećanja međupovršine i značajnog porasta entropije sistema, slobodna energija sistema dostiže negativnu vrednost ($T\Delta S \gg \gamma\Delta A$) i dolazi do spontanog obrazovanja termodinamički stabilnog mikroemulzionog sistema [15, 16, 21].

Dakle, mikroemulzije su pod određenim uslovima termodinamički stabilni sistemi i trebalo bi da se obrazuju spontano kada se pomešaju surfaktant, ulje i voda i ostanu stabilne neograničen vremenski period, ukoliko uslovi ostanu nepromenjeni. Međutim, u praksi se može dogoditi da ne dođe do spontanog nastanka mikroemulzije zbog postojanja kinetičke energetske barijere i/ili sporog procesa transporta masa. Zbog toga za pripremu mikroemulzija može biti neophodno mehaničko mešanje sastojaka ili zagrevanje sistema [15, 17].

1.2.2. Struktura mikroemulzija

U zavisnosti od sastava, odnosa između pojedinih sastojaka i organizacije njihovih molekula, mogu se uopšteno razlikovati tri tipa mikroemulzija: ulje u vodi (U/V) kod kojih su kapljice ulja dispergovane u vodenoj fazi; voda u ulju (V/U) u kojima su kapi vode dispergovane u ulju; i bikontinuirani sistemi koji se karakterišu međusobno isprepletenom vodenom i uljanom fazom (Slika 1.3) [15, 18]. U početku se smatralo da struktura bikontinuiranih mikroemulzija odgovara strukturi liotropne faze tečnih kristala, međutim sada je opšteprihvaćeno da mikroemulzije, za razliku od tečnih kristala, ne ispoljavaju uređenost dugog opsega, nego je njihova struktura neorganizovana [18]. Kao posledica takve strukture, i vodena i uljana faza su u principu slobodne za difuziju na makroskopskom nivou zbog čega su i koeficijenti difuzije visoki. Moguće je razlikovati više tipova bikontinuiranih sistema, a različiti tipovi agregata mogu da se obrazuju i između tri osnovna tipa mikroemulzija [22]. U svakom od navedenih tipova mikroemulzija, vodena i uljana faza su razdvojene međupovršinskim filmom sastavljenim od surfaktanta (i kosurfaktanta).

Smeša ulja, vode i surfaktanata može da obrazuje veliki broj različitih struktura i faza u zavisnosti od količina pojedinih sastojaka. U tom smislu, fleksibilnost surfaktanta predstavlja ključni faktor. Fleksibilan film amfifila omogućuje nastanak velikog broja različitih struktura kao što su kapljični tip strukture, agregati i bikontinuirani sistemi, što dovodi do širenja oblasti postojanja mikroemulzija. Sa druge strane, ukoliko je međupovršinski film rigidan, bikontinuirani sistem ne može da se formira. Unutrašnja struktura mikroemulzija kao nosača za isporuku lekova je veoma važna osobina jer od nje zavisi difuzivnost faza i difuzija leka koji je rastvoren u sistemu [23]. Iz tog razloga istraživači revnosno pokušavaju da objasne komplikovano fazno ponašanje i različite mikrostrukture koje se formiraju u mikroemulzionim sistemima.



Slika 1.3. Šematski prikaz strukture V/U, bikontinuiranih i U/V mikroemulzija (preuzeto i prilagođeno prema referenci [24])

Treba da se napomene da se prilikom interpretacije strukture mikroemulzija uglavnom koristi podela na tri osnovna tipa mikroemulzija. Međutim, ovakav pristup je uprošćen, s obzirom da je poznato da su mikroemulzije visokodinamični sistemi, podložni stalnim spontanim fluktuacijama tokom kojih se odigrava transfer jona, molekula i naelektrisanja unutar sistema [25]. U tom kontekstu, razmatraju se dve vrste promena: inverzije (fluktuacije pri kojima sistem lokalno prelazi iz U/V u V/U i obratno) i promene veličine kapi koje se nadovezuju na inverziju faza [16]. Do ovih promena dolazi delovanjem dva različita mehanizma:

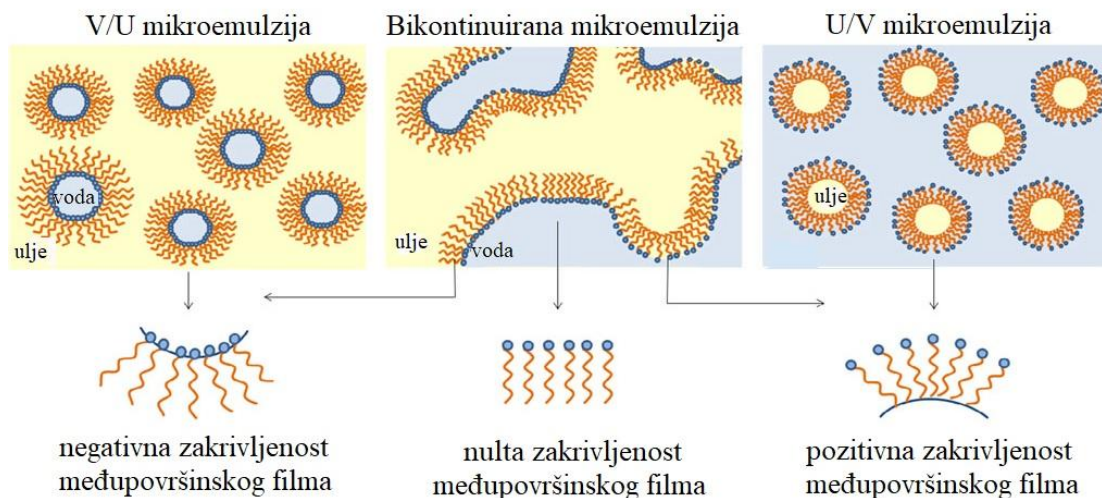
- sudaranjem kapi dispergovane faze i njihovim privremenim spajanjem u veće kapi (kolizija i fuzija), koje se potom razbijaju u nove, manje kapi (fisija);
- parcijalnom fragmentacijom kapi pri čemu dolazi do udruživanja nastalih fragmenata sa drugim kapima (koagulacija).

Prvi mehanizam je prisutan kod V/U mikroemulzija, dok je drugi mehanizam održiv kod U/V mikroemulzija. Brzina promena koje se odigravaju u sistemu je određena fleksibilnošću međupovršinskog filma, što je determinisano vrstom surfaktanta. Kako nejonski surfaktanti formiraju fluidnu međupovršinu, transfer materijala je brži te su i promene veoma brze [26, 27].

Kao što je prethodno navedeno, pod pojmom mikroemulzija se podrazumevaju različiti sistemi koji u zavisnosti od udela sastojaka mogu da budu bogati vodenom ili uljanom fazom, ili mogu imati intermedijarnu strukturu. Fazni prelaz iz sistema V/U u U/V se najčešće dešava posredstvom obrazovanja bikontinuirane strukture, što je uslovljeno promenama u zakrivljenosti međupovršinskog filma amfifila (Slika 1.4) nakon promene udela sastojaka ili promene temperature. Međutim, osim homogenih, jednofaznih sistema – mikroemulzija, mešanjem ulja, vode i amfifila mogu da se obrazuju i različite vrste polifaznih sistema, koji se obično opisuju Winsor-ovom terminologijom: (i) mikroemulzija U/V tipa u ravnoteži sa uljanom fazom u višku (*Winsor I*), (ii) mikroemulzija V/U tipa u ravnoteži sa vodenom fazom u višku (*Winsor II*), (iii) trofazni sistem kod koga je mikroemulzija bikontinuiranog tipa u ravnoteži sa uljem i vodom u višku (*Winsor III*) i (iv) homogeni, jednofazni mikroemulzioni sistemi (*Winsor IV*) [25].

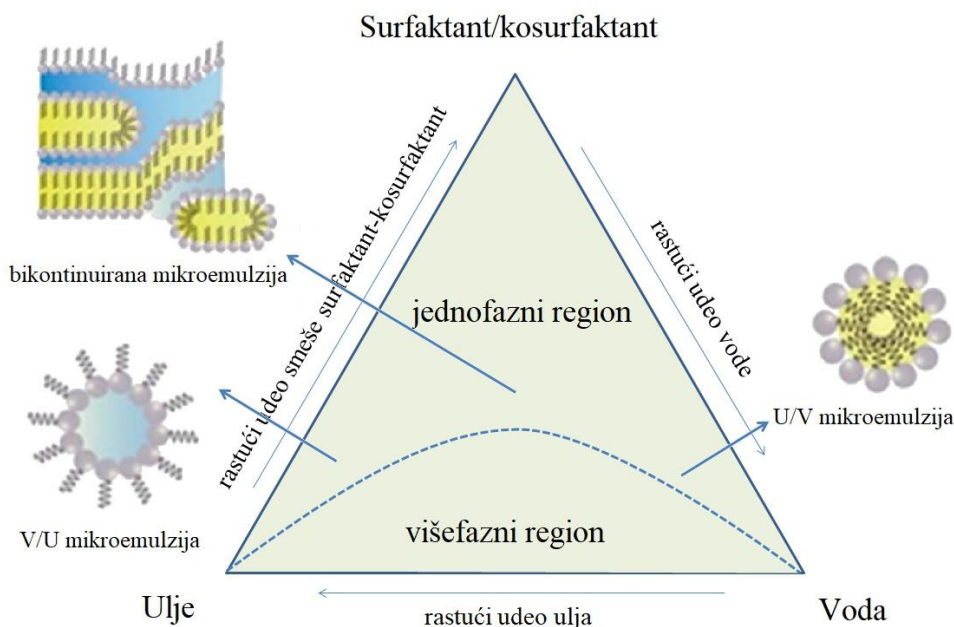
Fazno ponašanje sistema koji sadrže veći broj promenljivih (poput mikroemulzija) je veoma složeno i uslovljeno velikim brojem faktora. U svrhu istraživanja faznog ponašanja smeše sastojaka,

odnosno ispitivanja odnosa između udela sastojaka i rezultujuće strukture sistema, koriste se različiti tipovi faznih dijagrama [15, 16].



Slika 1.4. Zakrivljenost međupovršinskog filma amfifila kod različitih tipova mikroemulzija (preuzeto i prilagođeno prema referenci [28])

U slučaju mikroemulzija za farmaceutsku primenu, sistem najčešće sadrži ulje, vodu, surfaktante, kao i dodatne komponente poput kosurfaktanta i/ili lekovite supstance te se fazno ponašanje određenog mikroemulzionog sistema opisuje *pseudoternarnim faznim dijagramom* (Slika 1.5). Kod ovakvog tipa dijagrama vrh jednakostraničnog trougla odgovara binarnoj smeši dve različite komponente (npr. surfaktant/kosurfaktant, voda/lek ili ulje/lek) u određenom masenom odnosu, koja se tretira kao jedna komponenta [15].



Slika 1.5. Šematski prikaz teorijskog pseudoternarnog dijagrama sa obeleženim oblastima jednofaznih i višefaznih sistema u sistemu ulje/voda/surfaktant-kosurfaktant

Pri formulaciji mikroemulzija za farmaceutsku primenu, konstruisanje pseudoternarnih faznih dijagrama najčešće se vrši primenom metode titracije binarne odnosno pseudobinarne smeše (ulje i surfaktant (sa kosurfaktantom)) trećim sastojkom (vodenom fazom), smeše se posmatraju

vizuelno i određuje se oblast transparentnih izotropnih uzoraka (Slika 1.5). Veoma je važno da se tokom izvođenja titracije precizno kontroliše temperatura, ali i da se posmatranje uzoraka ne vrši na metastabilnim sistemima, odnosno da se omogući uspostavljenje termodinamičke ravnoteže u uzorku. Međutim, u praksi posmatranje metastabilnih sistema ne može sa sigurnošću da bude isključeno, iako centrifugiranje može da bude korisno za ubravanje procesa separacije višefaznih sistema. Prelazi između različitih faza mogu biti indukovani promenom odnosa između pojedinih sastojaka u sistemu dodatkom jednog od sastojaka, dodatkom novih komponenti u sistem (lekovite supstance ili elektroliti) ili promenama temperature. Promena strukture mikroemulzija tipa V/U u U/V mikroemulzije se može desiti preko različitih struktura, kao što su lamelarna faza, multifazni sistemi ili bikontinuirane mikroemulzije (na Slici 1.5 je prikazan prelazak V/U u U/V mikroemulzija preko bikontinuiranih mikroemulzija) [15].

1.2.3. Izbor surfaktanata u formulaciji mikroemulzija

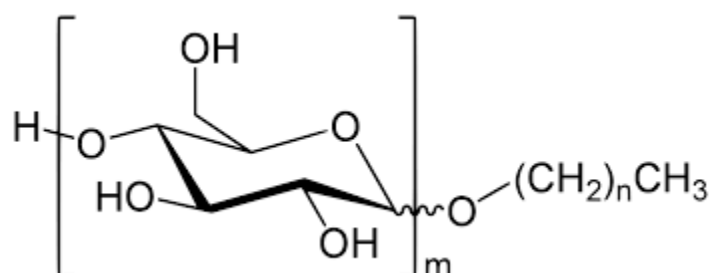
Za obrazovanje i stabilizaciju mikroemulzija mogu da se koriste različiti surfaktanti, smeše surfaktanata i kosurfaktanata jonskog, nejonskog i amfoternog tipa. U preparatima za kožu, prednost se daje nejonskim surfaktantima koji su nenaelektrisani i imaju nizak potencijal da iritiraju kožu. Međutim, bez obzira na vrstu surfaktanta, da bi se omogućio nastanak mikroemulzija, surfaktant mora da obezbedi sniženje međupovršinskog napona na veoma niske vrednosti i obrazovanje fleksibilnog međupovršinskog filma koji lako može da se deformiše. Takođe mora da ima i dovoljnu lipofilnost kako bi međupovršina imala odgovarajuću zakrivljenost za formiranje određene strukture mikroemulzija [23]. Hidrofilni/lipofilni balans (HLB), koji pokazuje odnos hidrofilnih i hidrofobnih grupa u molekulu, može da bude koristan vodič pri izboru surfaktanata za formulaciju mikroemulzija. Opšte je prihvaćeno da su surfaktanti sa nižim HLB vrednostima (3-6) pogodniji za mikroemulzije tipa V/U, dok se surfaktanti sa višim vrednostima HLB (> 12) više koriste za obrazovanje mikroemulzija tipa U/V. Surfaktanti sa HLB vrednostima višim od 20 često zahtevaju upotrebu dodatnog kosurfaktanta koji smanjuje njihovu efektivnu HLB na vrednost potrebnu za formiranje mikroemulzije [23]. Osim HLB vrednosti surfaktanta, u formulaciji farmaceutskih mikroemulzija, značajan parametar koji se razmatra je i kritični parametar pakovanja (*CPP*) koji opisuje zavisnost sposobnosti surfaktanta da obrazuje određene agregate od geometrijskih karakteristika njegovih molekula, pod kojima se podrazumevaju zapremina nepolarnog (hidrofobnog) dela molekula surfaktanta (v), optimalna površina polarnog (hidrofilnog) dela molekula (a) i dužina alkil lanca molekula (l). U zavisnosti od vrednosti *CPP* se može definisati tip agregata koji će surfaktant najverovatnije obrazovati [15]. Naravno, promenom sastava mikroemulzija dolazi i do promena u mikrosredini u kojoj se nalazi surfaktant, što se odražava i na vrednost njegovog *CPP*. Tako npr. penetracija malih molekula ulja između hidrofobnih lanaca surfaktanta može da poveća efektivni volumen hidrofobnog dela molekula, dok se od ulja velikih molekulskih masa ne očekuje značajan uticaj na *CPP*. Promene *CPP* vrednosti mogu da se očekuju i sa promenama jonske jačine u sredini u kojoj se nalaze jonski surfaktanti, sa promenama temperature ili usled prisustva hidrofilnih molekula poput glicerola ili sorbitola u vodenoj fazi mikroemulzije. Za uspešno formiranje mikroemulzionih sistema često nije dovoljan samo jedan surfaktant, nego je neophodna upotreba dodatnog kosurfaktanta koji će dovesti do daljeg snižavanja međupovršinskog napona i povećanja fluidnosti međupovršinskog filma i entropije sistema. U te svrhe se veoma često koriste alkoholi srednje dužine lanca koji povećavaju mobilnost ugljovodoničnih lanaca surfaktanta i utiču na međusobnu rastvorljivost uljane i vodene faze jer se raspodelju između ovih dveju faza [15].

Imajući u vidu da je koncentracija surfaktanata i kosurfaktanata koja je neophodna kako bi se obrazovale mikroemulzije pogodnih fizičko-hemijskih i biofarmaceutskih karakteristika obično relativno visoka, u fokusu savremenih istraživanja u dermalnoj isporuci lekovitih supstanci putem mikroemulzija jeste upotreba dobro podnošljivih surfaktanata kako bi se rizik za iritaciju kože sveo na minimum [16, 29, 30]. Alternativu konvencionalno korišćenim nejonskim polietoksilovanim

surfaktantima (npr. polisorbati) koji su se pokazali funkcionalnim u formulaciji mikroemulzija [31], ali su ispoljii i određen potencijal za iritaciju kože [32, 33], predstavljaju noviji biodegradabilni, netoksični nejonski surfaktanti, prirodnog ili sintetskog porekla. Naročito su interesantni oni dobijeni iz sirovina prirodnog porekla (npr.alkil poliglukozidi, estri saharoze i masnih kiselina, kaprilno/kaprinski makrogolgliceridi, estri poliglicerola i masnih kiselina) [15, 23]. Usmeravanju istraživanja ka primeni ovakvih polihidroksilnih surfaktanata koji su ekotoksikološki prihvatljiviji, značajno doprinosi i povećane svesti ljudi o važnosti zaštite životne sredine [34, 35]. Dakle, inovacija u razvoju mikroemulzija kao nosača za lekove kojima se tretira obolela koža, podrazumeva upotrebu sastojaka koje koža dobro podnosi, koji su ekološki prihvatljivi, koji se dobijaju iz obnovljivih izvora [36] i mogu se označiti kao prijatelji kože i čovekove okoline. Ove zahteve potpuno zadovoljavaju alkil poliglukozidni tenzidi, koji se već upotrebljavaju u različitim proizvodima široke potrošnje, kao i proizvodima za negu kože [16, 37]. Pored toga, u značajnom broju studija se ispituje i potencijal mikroemulzija u čiji sastav ulaze noviji polietoksilovani surfaktanti, poput polioksietilen(glicerol) estara masnih kiselina [16]. Takođe, uprkos bojaznima vezanim za izazivanje iritacije, rezultati eksperimenata u kojima je ispitivan iritacioni potencijal mikroemulzija zasnovanih na polietoksilovanim surfaktantima su preliminarno pokazali njihovu prihvatljivu podnošljivost [38-40]. Ipak, efikasnost svakog novog do tada nekorisćenog tenzida u formulaciji mikroemulzija, potrebno je posebno ispitati.

1.2.3.1. Alkil poliglukozidi u formulaciji mikroemulzija

Alkil poliglukozidi (APG), poznati i kao alkil glukozidi, predstavljaju relativno novu generaciju prirodnih, visoko efikasnih surfaktanata, niske toksičnosti, ekološki sigurnih, dobijenih iz obnovljivih izvora (glukoza i masni alkoholi iz skroba i palminog ulja), sa zanimljivim međufaznim svojstvima. Glavna karakteristika im je dužina alkil lanca i prosečan broj monosaharidnih jedinica vezanih za alkil lanac (stepen polimerizacije) (Slika 1.6), čime su determinisane njihove fizičko-hemijske osobine. Komercijalno dostupni APG najčešće predstavljaju kompleksne smeše molekula sa stepenom polimerizacije 1,1-3. Takođe, neki od proizvoda prisutnih na tržištu su smeše APG sa vodom, pri čemu je sadržaj aktivne supstance obično iznad 50%. APG su stabilni pri visokim vrednostima pH, dok pri niskim pH dolazi do njihove hidrolize na šećer i masni alkohol. U poređenju sa odgovarajućim polietoksilovanim surfaktantima, šećerna glava je više hidrosolubilna (zbog većeg broja –OH grupa), a manje rastvorljiva u uljima. Povećanjem broja monosaharidnih jedinica u molekuli APG, dolazi do dramatičnog porasta njegove hidrofилnosti. Takođe, hidrofobni deo u molekulu APG ima više izražena hidrofobna svojstva nego lanci propilenoksida u strukturi polietoksilovanih surfaktanata. Zbog toga su njihove fizičko-hemijske karakteristike drugačije nego kod konvencionalnih nejonskih surfaktanata. Primera radi, temperatura predstavlja faktor od minornog značaja za fazno ponašanje APG u vodi, mogu da tolerišu visoke koncentracije elektrolita i kompatibilni su sa većinom ostalih vrsta surfaktanata. Međutim, njihova biodegradabilnost, praćena prirodnim poreklom, čini ih najvažnijim surfaktantima iz grupe tenzida zasnovanih na šećerima [34, 35, 37].



Slika 1.6. Šematski prikaz strukture APG (m – prosečan broj monosaharidnih jedinica, n – broj atoma ugljenika u ugljovodoničnom lancu)

Sa dermatološkog aspekta, APG se smatraju grupom vrlo blagih tenzida, koji su izuzetno pogodni za upotrebu bilo sami, kao surfaktanti, ili kao kosurfaktanti u formulaciji proizvoda koji se smatraju blagim za kožu [41].

Prema zaključcima izveštaja ekspertskog tela za procenu bezbednosti kozmetičkih sastojaka iz 2011. godine (*Cosmetic Ingredient Review (CIR) Expert Panel*), veliki broj APG emulgatora, njih 19 (npr. decil-glukozid, kaprilil/kapril-glukozid, koko-glukozid, cetearil-glukozid), se može koristiti u kozmetičkim proizvodima na teritoriji Evropske unije [42]. Iz tog razloga, ali i zbog ekonomske proizvodnje i povoljnih ekoloških i tehničkih osobina, primena APG u formulaciji različitih naprednih sistema za (trans)dermalnu isporuku lekovitih supstanci postaje sve šira [41]. Međutim, formulacija mikroemulzija sa APG kao primarnim surfaktantima je dosta zahtevna i predstavlja značajan izazov za istraživače, te su mogućnosti njihove primene u formulisanju mikroemulzija, faktori koji na to utiču, unutrašnja struktura i fizičko-hemijske osobine mikroemulzionih sistema još uvek nedovoljno proučene. Mnoge istraživačke grupe su fokusirane na pronalaženje odgovarajućeg kosurfaktanta koji bi imao ulogu u povećanju rastvorljivosti APG u uljima, a što bi dalje dovelo do obrazovanja mikroemulzija [43, 44]. U relevantnoj naučnoj literaturi su, u dosada publikovanim radovima, kao surfaktanti iz grupe APG u formulaciji farmaceutskih i kozmetičkih mikroemulzija ispitani decil-glukozid, kaprilil/kapril-glukozid, koko-glukozid i lauril-glukozid (Tabela 1.2).

Rezultati koji su dobijeni u ovom ograničenom broju studija (Tabela 1.2) su generalno ukazivali na to da su APG-mikroemulzije pogodni nosači za poboljšanu dermalnu i transdermalnu isporuku inkorporiranih lipofilnih i hidrofilnih lekovitih supstanci. Primera radi, količina isporučenog takrolimusa u dermis, kao i količina leka koja je prošla kroz humanu kožu *in vitro* je bila značajno viša nakon primene APG-mikroemulzije u odnosu na komercijalno dostupan preparat [45]. Slično je dokumentovano i u slučaju lokalne primene linoleinske kiseline [36], α -tokoferola [46], retinoinske kiseline [47], likopena i askorbinske kiseline [48] u formi mikroemulzija zasnovanih na APG, gde su mikroemulzije obezbedile značajno povećanje isporučenih lekova u odnosu na kontrolne formulacije (npr. likopena 3,3-8 puta, a askorbinske kiseline 1,5-3 puta). S obzirom da je pokazano da APG surfaktanti mogu da povećaju permeabilnost kože zahvaljujući vlaženju površinskih slojeva kože vezivanjem vode za veliki broj slobodnih hidroksilnih grupa u molekulima APG [49], verovatno je da su i kao sastojci mikroemulzija doprineli povećanju difuzije pomenutih ispitivanih jedinjenja u/kroz kožu. Schwarz i sar. [50] su demonstrirali da se odlična difuzivnost flufenaminske kiseline i flukonazola iz mikroemulzija na bazi prirodnih surfaktanata, uključujući i APG, može objasniti na molekularnom nivou, primenom atenuisane ukupne refleksije-infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (ATR-FTIR). Naime, u ovoj studiji je interakcija mikroemulzija sa kožom svinje indukovala pomeranje simetričnih i asimetričnih istezanja $-\text{CH}_2$ veza prema višim frekvencijama, ukazujući na heksagonalno uređenje lipidnih lanaca SC, odnosno veći stepen neuređenosti i povećanje fluidnosti i pokretljivosti alkil lanaca, što je za rezultat imalo brzu difuziju model lekova kroz kožu.

Osim toga, značajno je da se pomene da su Goebel i sar. [36, 45] primenom testa iritacije na horioalantoinskoj membrani inkubiranih kokošijih jaja (engl. *Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane*, HET-CAM test) nakon 5-minutnog tretmana zabeležili dobru podnošljivost mikroemulzija u kojima je sadržaj APG tenzida bio do 10,6%. Takođe, demonstrirana je i prihvatljiva podnošljivost (koja je bila bolja od podnošljivosti surfaktanta oktksinola-9 (Triton X-100)) mikroemulziona formulacije sa 50% decil-glukozida na ekvivalentima kože dobijenim bioinžinjeringom [48]. *In vivo* studije na pacovima su takođe potvrdile povoljan bezbednosni profil mikroemulzije sa visokim udelom surfaktanata i kosurfaktanta (45%), pri čemu je udeo APG u smeši bio 18,18% [51]. Međutim, kao što se može uočiti, nijedna od sprovedenih studija nije uzajamno konzistentna niti je vršena na humanim subjektima.

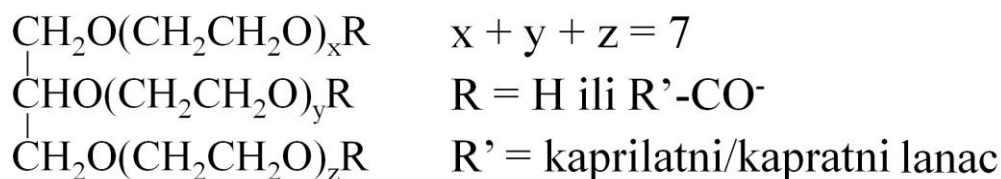
Tabela 1.2. Pregled korišćenih APG u formulaciji mikroemulzija za primenu na koži

Surfaktant/kosurfaktant	Uljana faza	Vodena faza	Lekovita supstanca/ aktivni princip	Literatura
Kaprilil/kapril-glukozid/lecitin/etanol Kaprilil/kapril-glukozid/lecitin/1,2-heksandiol	Izopropilmiristat	Fosfatni pufer pH 6,4	Retinoinska kiselina	[47]
Decil-glukozid/lecitin/etanol kaprilil/kapril-glukozid/lecitin/etanol	Izopropilmiristat	Voda	Insulin	[52]
Decil-glukozid/lecitin/propilenglikol/ 1,2-heksandiol Decil-glukozid/propilenglikol/ 1,2-heksandiol	1-dekanol:1-dodekanol = 2:1 (m/m)	Fosfatni pufer pH 5,8	Mikonazol-nitrat	[53]
Decil-glukozid/sorbitan-monolaurat	Dioktilcikloheksan/ Tečni parafin	Voda	Askorbinska kiselina	[54]
Lauril-glukozid/cetearil glukozid	Linoleinska kiselina	Voda/1,2-pentilenglikol 20%	Linoleinska kiselina	[36]
Koko-glukozid/lecitin/etanol Decil-glukozid/lecitin/etanol	Oleoil makrogol-6-gliceridi	Voda	5-fluorouracil	[51]
Decil-glukozid/fosfatidilholin	Dibutil-adipat	Voda/1,2-pentilenglikol 20%	Takrolimus	[45]
Decil-glukozid/propilenglikol	IPM/gliceril-monooleat IPM/gliceril- monokaprilat IPM/gliceril-monolaurat	Voda	Likopen i askorbinska kiselina	[48]
Koko-glukozid/izopropanol Koko-glukozid/lecitin/izopropanol	Izopropilmiristat	Voda	Flufenaminska kiselina Flukonazol	[50]
Decil-glukozid/propilenglikol	Mono- i digliceridi srednje dužine lanca	Voda	α -tokoferol i lipoinska kiselina	[46]

1.2.3.2. Polietoksilovani surfaktanti u formulaciji mikroemulzija

Najvažniji kriterijum za kliničku primenu lekovitog preparata jeste njegova fiziološka kompatibilnost, što u slučaju mikroemulzija znači da glavnu ulogu imaju surfaktanti, tačnije njihova vrsta i količina u kojoj su upotrebljeni. Kako bi se koncentracija pojedinačnog surfaktanta svela na najmanju moguću, često se koriste smeše nejonskih surfaktanata. Kao rezultat opsežnih ispitivanja u ovoj oblasti, veoma često se u formulaciji farmaceutskih mikroemulzija, pored surfaktanata prirodnog porekla koji nemaju oksietilenske grupe u svojoj strukturi, koriste polietoksilovani surfaktanti ili njihove kombinacije: polisorbati (Tween®), (PEGilovani)glicerol estri masnih kiselina (Labrasol®, Cremophor®, Solutol®), PEGilovani masni alkoholi (Brij®, Tagat®) i poloksameri.

Potencijal (PEGilovanih)glicerol estara masnih kiselina u formulaciji mikroemulzionih nosača različitih lekovitih supstanci je proučavan od strane većeg broja istraživačkih grupa. Iako se pokazalo da ova vrsta surfaktanata ima ogroman potencijal za obrazovanje mikroemulzionih sistema u kombinaciji sa raznovrsnim uljima i kosurfaktantima i da su razvijene mikroemulzije smatrane za efikasan vehikulum za poboljšanu (trans)dermalnu isporuku mnogih lekova poput klotrimazola [55], lokalnih anestetika [56], nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL) [57], kurkumina [58] i retinoida [39, 59], neki od tenzida koji su dostupni na tržištu nisu još uvek ili su slabo proučavani kao stabilizatori mikroemulzionih sistema. Ovoj kategoriji pripada i Emanon® EV-E (glicerol-7-kaprilat/kaprat; PEG-7-kaprilno/kaprinski glicerid) (Slika 1.7), čija primena u formulaciji mikroemulzija, prema dosadašnjim saznanjima, nije dokumentovana u naučnim publikacijama, izuzev onima koje su rezultat rada naše istraživačke grupe. Takođe, može da se uoči da je primena ovog surfaktanta u formulaciji bilo naprednih bilo konvencionalnih nosača za lokalnu primenu generalno slabo proučavana.



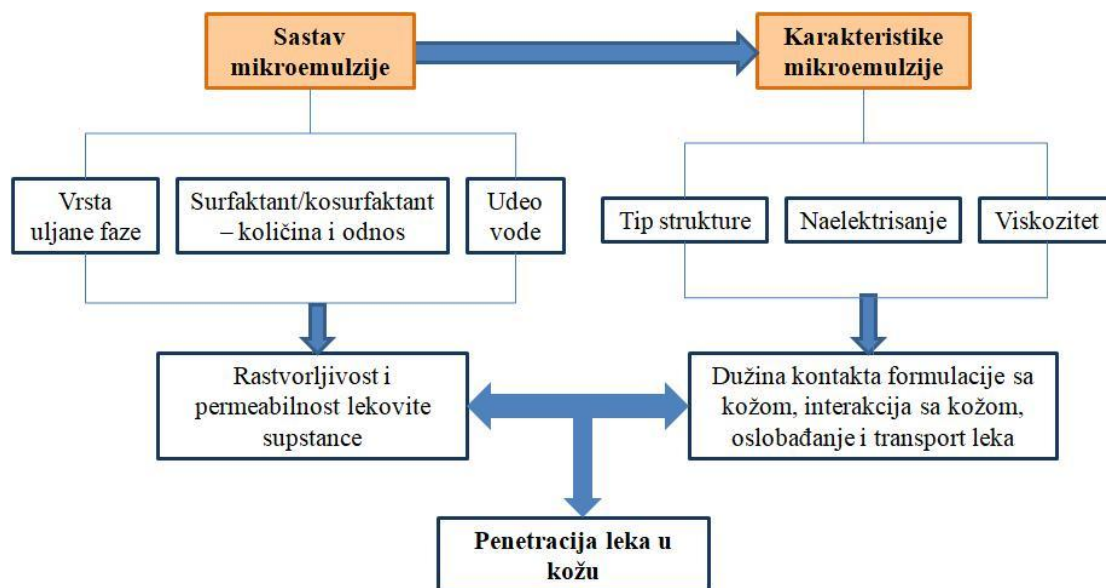
Slika 1.7. Hemijska struktura Emanon®-a EV-E (EV)

Ipak, imajući u vidu da se primena etoksilovanih surfaktanata često dovodi u vezu sa iritacijom kože i da se oni zbog toga smatraju manje bezbednim od polihidroksilnih surfaktanata [34], shodno osobinama koje proizvođač navodi za EV, poput biodegradabilnosti, niske toksičnosti, dobijanja iz sirovina biljnog porekla, odsustva sporednih proizvoda i konzervanasa u proizvodu, visoke HLB vrednosti i ekološke sigurnosti, mogu se očekivati i povoljne osobine mikroemulzija zasnovanih na Emanon®-u EV-E. Tako je, u skladu sa tržišnim trendovima koji su usmereni na inkorporiranje sastojaka prirodnog porekla (ulja, vitamini, ekstrakti) u kozmetičke proizvode, EV omogućio formulisanje kremova za tuširanje i šampona koji sadrže ulja ili silikone, poboljšavajući penenje i isporuku kozmetički aktivnih supstanci u kožu i kosu. Osim za formulaciju proizvoda koji se nakon primene spiraju sa kože, pogodan je i za proizvode koji ostaju duže vreme u kontaktu sa kožom. Zbog svoje visoke vrednosti HLB (~17), koristi se kao koemulgator u kremovima i kao primarni surfaktant u formulaciji losiona kojima se impregniraju vlažne maramice i sredstava za skidanje šminke. Treba da se napomene da su pomenuti kozmetički proizvodi zasnovani na EV okarakterisani kao neiritirajući za kožu, što je zasnovano na rezultatima Zein testa i testa hemolize crvenih krvnih zrnaca (engl. *Red Blood Cell* – RBC test) [60].

Shodno svemu navedenom, može se pretpostaviti da bi EV kao polietoksilovana PAM mogao imati sposobnost da obrazuje biokompatibilne mikroemulzije kao nosače za lekovite supstance, koje bi takođe bile i ekološki prihvatljive, čime bi se ispunila očekivanja savremenih pacijenata u pogledu korišćenja proizvoda na bazi sastojaka prirodnog porekla.

1.2.4. Dermalna isporuka lekovitih supstanci putem mikroemulzija – mehanizmi i faktori koji utiču na povećanje penetracije lekova

Sposobnost mikroemulzionog sistema da poboljša transport lekovitih supstanci u/kroz kožu u velikoj meri zavisi od unutrašnje strukture sistema i tipa mikroemulzije, koji su određeni sastavom i koncentracijom sastojaka. Pokazano je da vrsta surfaktanta i/ili kosurfaktanta, njihov međusobni odnos, vrsta korišćenog ulja i prisustvo inhensera penetracije u formulaciji određuju penetracioni profil leka [61, 62]. U zavisnosti od fizičko-hemijskih osobina aktivne supstance, različiti tipovi mikroemulzija mogu da budu njen optimalan nosač. Međutim, nije dovoljno samo da se kombinuju različiti sastojci i obrazuje mikroemulzija pogodnih karakteristika, nego je neophodno da se pronađu odgovarajući sastojci u optimalnoj koncentraciji kako bi se maksimalno pojačala efikasnost sistema. Pored toga, u zavisnosti od fizičko-hemijskih karakteristika leka i mikrostrukture sistema, lekovita supstanca može da bude solubilizovana u dispergovanoj fazi mikroemulzije (unutar dispergovanih kapi), kontinuiranoj fazi sistema i/ili međupovršinskom filmu sačinjenom od amfifila (bar delimično). Primera radi, verovatno mesto solubilizacije lipofilnih, u vodi slabo rastvorljivih lekovitih supstanci u U/V mikroemulzijama je dispergovana uljana faza i/ili hidrofobni deo međupovršine kojeg grade molekuli surfaktanata, dok su molekuli hidrosolubilnih lekovitih supstanci rastvoreni u kapima vodene faze V/U mikroemulzija [15, 18, 63]. Na Slici 1.8 su sumirani faktori koji utiču na karakteristike mikroemulzija i posledično na njihovu sposobnost da pojačaju penetraciju lekovitih supstanci i mogućnost njihove upotrebe kao nosača za isporuku lekova putem kože.



Slika 1.8. Parametri koji utiču na penetraciju i dermalnu isporuku lekovitih supstanci iz mikroemulzija (preuzeto i prilagođeno prema referenci [18])

Mnogobrojne studije su pokazale da su mikroemulzije dragoceni nosači čijom primenom na koži može značajno da se unapredi i poboljša lokalizacija lekova u koži ili sistemske cirkulaciji. Međutim, veoma je važno da se istakne da se u sprovedenim *in vitro* studijama, prisustvo leka u receptorskoj fazi smatra pokazateljem transdermalne isporuke (uprkos ograničenjima metoda da imitiraju transfer leka u krv). Očigledno, potpuno odvajanje dermalne i transdermalne isporuke leka nije moguće, ali pažljivim dizajnom formulacije može da se postigne optimalan balans kojim bi se favorizovala isporuka leka u kožu, odnosno u sistemske cirkulaciju [18]. U brojnim studijama je pokazano da primenom mikroemulzija može da se postigne značajno povećanje retencije leka u koži u odnosu na povećanje perkutane permeacije. Iako je ovaj koncept očigledno veoma značajan

za formulaciju kozmetičkih proizvoda, lokalizacija u koži takođe predstavlja benefit i za lekove iz nekih farmakoterapijskih grupa. Mikroemulzije su korišćene kako bi se poboljšala lokalizacija anestetika u koži i obezbedio brži početak delovanja u odnosu na komercijalne formulacije [64]. Bikontinuirane mikroemulzije su ispitivane i kao nosači za ciklosporin A, pri čemu je pokazano *in vivo* da je deponovanje leka u koži i potkožnom masnom tkivu bilo gotovo 30, odnosno 15 puta veće, nego kada je lek primenjen oralno [65]. Ovi rezultati su sugerisali da sporedni efekti pri sistemskoj primeni leka mogu da se minimizuju lokalnom primenom leka. Uspešna isporuka u kožu primenom mikroemulzija uključuje mnoge druge molekule – lidokain [56], alfa-tokoferol [66], 8-metoksalen [67], paklitaksel [68] i linoleinsku kiselinu [36]. Međutim, treba da se naglasi da iako je u nekim istraživanjima postignuta selektivna isporuka leka u kožu [69], izabrana eksperimentalna postavka (*in vitro*) nije obezbedila *sink* uslove, zbog čega se zaključci o odsustvu transdermalne isporuke leka (koji nisu provereni *in vivo*) moraju uzeti sa rezervom.

Međutim, iako je opšteprihvaćeno da mikroemulzije pojačavaju transport lekova u/kroz kožu, tačan mehanizam njihovog delovanja još uvek nije u potpunosti rasvetljen. Kao razlog za to se navodi kompleksnost mikroemulzionih sistema, na čije karakteristike utiču mnoge varijable. Kako bi se objasnio način na koji mikroemulzije dovode do efekta pojačane penetracije lekova, zapravo je predloženo nekoliko različitih mehanizama. Najverovatnije je da sveobuhvatna kombinacija svih ovih mehanizama ima za rezultat poboljšanu penetraciju jer nijedan od njih pojedinačno ne obezbeđuje dovoljno argumenata kojima bi se objasnila superiornost mikroemulzija u poređenju sa ostalim sistemima za isporuku lekova.

➤ Prvi razlog za pojačanu penetraciju je **mala veličina kapi dispergovane faze i visok odnos površine i zapremine**. U mnogim studijama je pokazan uticaj veličine kapi dispergovane faze na transport leka u/kroz kožu. Primera radi, značajna poboljšanja u transdermalnoj isporuci diazepama, betametazon valerata i dipropionata, indometacina, diklofenaka, piroksikama i naproksena su ostvarena primenom mikroemulzija u poređenju sa standardnim emulzijama i kremovima [70, 71]. Međutim, nisu svi sistemi sa dispergovanom fazom u nanometarskom opsegu podjednako efikasni, naprotiv. Shim i sar. [72] su pokazali da je isporuka lidokain-hidrohlorida bila manja kada su primenjene lipidne micle nego putem liposoma istog kvalitativnog sastava, što je pripisano različitoj interakciji sa SC zbog različite morfologije micela i liposoma. Ovakva razmatranja sugerišu da smanjenje veličine unutrašnje faze nanonosača može da favorizuje penetraciju, ali to možda nije dovoljno, ukoliko se ovaj faktor posmatra odvojeno od ostalih mehanizama za poboljšanje penetracije [18].

➤ Sposobnost mikroemulzija da pojačaju penetraciju solubilizovanih supstanci može da se pripiše i **uticaju individualnih sastojaka formulacije**, koji ispoljavaju efekte penetracionih inhensera [18, 23]. Određeni monomeri surfaktanata i kosurfaktanata, komponenti uljane faze i ostali penetracioni inhenseri uključeni u formulaciju mogu da difunduju u kožu i povećaju permeaciju lekova, bilo narušavajući strukturu lipida SC (što olakšava difuziju kroz kožnu barijeru), bilo povećavajući rastvorljivost leka u koži (povećanjem particionog koeficijenta leka između kože i nosača) [18]. U studiji u kojoj je ispitivan efekat mikroemulzija na promene u SC je uočeno da svaki sastojak mikroemulzije narušava strukturu ovog sloja proporcionalno svojoj koncentraciji u koži [73]. Ulja u sastavu mikroemulzija imaju kritičnu ulogu u formulaciji, s obzirom da utiču na rastvorljivost i permeaciju inkorporiranih supstanci [48, 74]. Oleinska kiselina, na primer, smanjuje uređenost konformacije lipida u koži i povećava propustljivost kožne barijere [73]. Isto važi i za surfaktante i kosurfaktante, čija efikasnost u povećanju penetracije zavisi od strukture, dužine alkil lanca i polarosti molekula. Kada je reč o nejonskim surfaktantima, mehanizam njihovog delovanja uključuje sledeće efekte: (i) na nivou lipida: povećanje fluidnosti lipidnog dvosloja, solubilizaciju i ekstrakciju lipida; (ii) na proteinskom nivou: interakcije sa keratinskim filamentima u korneocitima; i (iii) na nivou leka: menjanje termodinamičke aktivnosti leka, obezbeđujući efikasniju penetraciju u kožu [75]. U formulaciju mikroemulzija mogu biti uključeni i dodatni sastojci koji povećavaju rastvorljivost leka i njegovu permeaciju. Kada je poređeno preuzimanje sastojaka mikroemulzije u kožu u odnosu na primenu samih pojedinačnih sastojaka, zaključeno je da mikroemulzije

obezbeđuju veću koncentraciju sastojaka u SC, što je ukazalo na prednost primene mikroemulzije umesto individualnih komponenti [73].

➤ Primena mikroemulzija vodi ka povećanju **hidratacije kože**. Imajući na umu da se voda takođe smatra penetracionim inhenserom, ovakav efekat može da doprinese penetracionoj efikasnosti formulacije [18]. Ranije studije su pokazale da sa povećanjem udela vode u mikroemulzijama dolazi do povećanja hidratacije SC [73, 76]. Takođe, permeacija lipofilnih (ketoprofen, lidokain) i hidrofилnih lekova (kofein) iz mikroemulzija je pokazala trend porasta sa porastom udela vode [77]. Sa porastom količine vode u mikroemulzijama uočeno je povećanje količine adapalena i klotrimazola u svim slojevima kože, kao i folikulima dlaka [55, 69]. Osim toga, i brzina oslobađanja leka je funkcija udela vode. Naime, pokazano je da fluks leka kroz membranu raste proporcionalno sa povećanjem udela vode u mikroemulzijama [78]. Zaista, količina vode u sistemu određuje unutrašnju strukturu mikroemulzija, što se zauzvrat odražava na isporuku leka u kožu. Ipak, u većini studija promene sadržaja vode u sistemu posledično su uzrokovale i promene udela ostalih sastojaka, te uticaj drugih faktora koji utiču na penetraciju lekova ne bi trebalo da bude zanemaren. Povećavajući sadržaj vode pri prelazu V/U do U/V mikroemulzija može doći do: (i) promena u termodinamičkoj aktivnosti lekova (uglavnom lipofilnih) zbog izmenjene rastvorljivosti leka u spoljašnjoj fazi sistema; (ii) povećane hidratacije kože; i (iii) promena u permeabilnosti kože zbog variranja koncentracije penetracionih inhensera (obično surfaktanata i sastojaka uljane faze) [18, 79]. Dakle, i neki sastojci uljane faze (npr. biljna ulja) imaju okluzivna svojstva, pa je moguće da ovakve komponente spreče ili umanje isparavanje i promene gradijent vode u gornjim slojevima kože. Treba imati na umu da ovaj efekat zavisi od vrste sastojaka i njihove koncentracije u formaciji. Tako npr. okluzivni efekat V/U emulzija sa niskim sadržajem vode je više sličan efektu samog ulja nego V/U sistemu sa višim udelom vode ili U/V formulaciji, koja može da ispolji efekat okluzije tek nakon isparavanja slobodne vode [18].

➤ Efekat poboljšanja penetracije lekova putem mikroemulzija se može pripisati i **visokom solubilizacionom kapacitetu** ovih sistema za hidrofилne, lipofilne i amfifилne lekove [16, 18]. Strukturna organizacija uljane i vodene faze, kao i postojanje amfifилnog međusloja stvara dodatne regione za rastvaranje lekova, što povećava solubilizacioni kapacitet mikroemulzija u odnosu na nestrukturirane nosače [80]. Ovaj efekat je posebno izražen u slučaju bikontinuiranih mikroemulzija [14]. Rastvorljivost mnogih lekovitih supstanci (npr. progesteron, estradiol) je višestruko veća u mikroemulzijama nego u vodi ili pojedinačnim sastojcima mikroemulzija [81]. Kada se postigne maksimalna termodinamička aktivnost, visok koncentracioni gradijent obezbeđuje silu za povećanje transporta lekovite supstance [16]. Međutim, iako povećanje rastvorljivosti leka u nosaču može da vodi ka njegovoj pojačanoj penetraciji zbog povećanog koncentracionog gradijenta, u različitim studijama je pokazan suprotan efekat, pokazujući da još uvek nije u potpunosti razjašnjena veza između rastvorljivosti i postizanja maksimalnog transporta molekula leka kroz kožu [18, 77].

Dakle, mikroemulzije, u odnosu na konvencionalne topikalne farmaceutske oblike, povećavaju penetraciju lekova menjajući i lipofilne i polarne putanje za prolaz molekula zahvaljujući sinergističkim interakcijama komponenti nosača sa SC. Premda se generalno smatra da je intercelularni put najznačajniji način ulaska leka u SC, **folikularni put transporta** u nekim slučajevima može da bude potencijalno mnogo korisniji nego što se pretpostavlja, bez obzira na to što folikuli dlaka čine svega 0,1% ukupne površine kože [1]. Isporuka lekovitih supstanci u/kroz folikule dlaka zavisi od više faktora, od fizičko-hemijskih karakteristika leka do stepena aktivnosti dlaka [82]. Biju i sar. [83] su ispitivali pod *in vitro* uslovima folikularnu depoziciju ulja čajevca primenjenog putem različitih formulacija (mikroemulzija, disperzija liposoma, višestrukih emulzija) koristeći perfuzirani model kravljeg vimena. Pokazano je da su mikroemulzija, kao i disperzija liposoma obezbedile oko 2 puta višu transfolikularnu penetraciju ulja u odnosu na višestruku emulziju. Sično, Teichmann i sar. [84] su primenom laserske skenirajuće mikroskopije uočili različitu distribuciju kurkumina nakon aplikacije amfifилnog krema i U/V mikroemulzije na kožu humanih dobrovoljaca. Pokazano je da je kurkumin iz mikroemulziona formulacije dospio u dublje

slojeve SC, ali i niže delove folikula dlake (infundibulum), dok je lokalna primena amfifilnog krema rezultovala u dospevanju leka samo do otvora folikula. Povećanje akumulacije ispitivanih supstanci u folikulima dlaka je pripisano veoma niskom međupovršinskom naponu mikroemulzija, što omogućuje izvanredan kontakt sa kožom, kao i kompatibilnosti mikroemulzija sa lipofilnom sredinom u folikulima dlaka, što sve skupa čini da primenjena formulacija ima sposobnost da lakše pristupi unutrašnjosti folikula olakšavajući dalji transport inkorporiranih supstanci. Treba takođe da se naglasi da je u slučaju drugih nosača nanometarskih dimenzija potvrđena uspešna folikularna penetracija lipofilnih i hidrofilnih model supstanci [82]. Imajući u vidu rezultate navedenih studija, bez obzira na izuzetna barijerna svojstva kože, jasno je da penetracija (kapi) mikroemulzija u folikule dlaka može da doprinese njihovom delovanju penetracionih inhensera, kao i to da predstavlja uverljiv način za ciljnu isporuku leka u folikule dlaka, što može da bude posebno značajno u lečenju akni.

1.3. MIKROIGLE KAO FIZIČKI POJAČIVAČI PENETRACIJE LEKA U/KROZ KOŽU

Unatoč nastojanjima da se isporuka lekovitih supstanci pospeši/unapredi dizajnanjem pogodnih nosača koji imaju potencijal da premoste barijernu funkciju SC, postizanje optimalne dermalne isporuke lekova često izostaje. Ovo je razlog sve većeg interesovanja istraživača za mikroigle kao fizičke pojačivače penetracije koji mogu isporučiti lekove na minimalno invazivne načine i koje su relativno jednostavne i jeftine. Primenom mikroigala moguće je da se lekovite supstance isporuče ciljno i kontrolisano u specifične delove kože, što posledično potencijalno može da dovede do smanjenja doze leka [85]. Tipična dužina mikroigala se kreće od 70 μm do nekoliko mm. Dizajn mikroigala je takav da se njihovom primenom na koži obezbeđuje stvaranje pora mikronskih dimenzija. U zavisnosti od njihove dužine, mikroigle penetrišu kroz SC i epidermis do dubine od 70 do 200 μm ne dopirući do nervnih završetaka, zbog čega je njihova primena u najvećem broju slučajeva bezbolna [85-87].

1.3.1. Vrste mikroigala

Kako bi se optimizovalo mesto ili stepen isporuke leka u zavisnosti od potreba pacijenata, dizajnirane su mikroigle sa različitim oblicima, veličinom i gustom po jedinici površine membrane (adhezivne ili potporne) [85].

Uopšteno, mikroigle za dermalnu isporuku lekovitih supstanci se mogu podeliti u dve klase: čvrste i šuplje mikroigle (Slika 1.9, Slika 1.10). **Čvrste mikroigle** (engl. *solid microneedles*) se uspešno upotrebljavaju za isporuku proteina, peptida, oligonukleotida i nanočestica. Sa druge strane, **šuplje mikroigle** (engl. *hollow microneedles*) sadrže šuplje jezgro kroz koje se može ubrizgati bolus doza leka [86].

Aplikacija čvrstih silikonskih mikroigala se smatra relativno jednostavnom, i podrazumeva njihovo insertovanje na kožu, a nakon kratkog perioda sledi njihovo uklanjanje, a potom nanošenje ispitivane formulacije sa lekom („*poke and patch*“ pristup) (Slika 1.9, Slika 1.10). Stvaranje mikropora je kratkotrajan i reverzibilan proces, a kako bi se produžilo vreme u kojem mikropore ostaju otvorene mogu da se primene dodatne formulacije lekova (npr. diklofenak). Čvrste mikroigle se izrađuju od čvrstih materijala poput silikona, nerđajućeg čelika, titanijuma i niki-željeza [86, 88, 89].

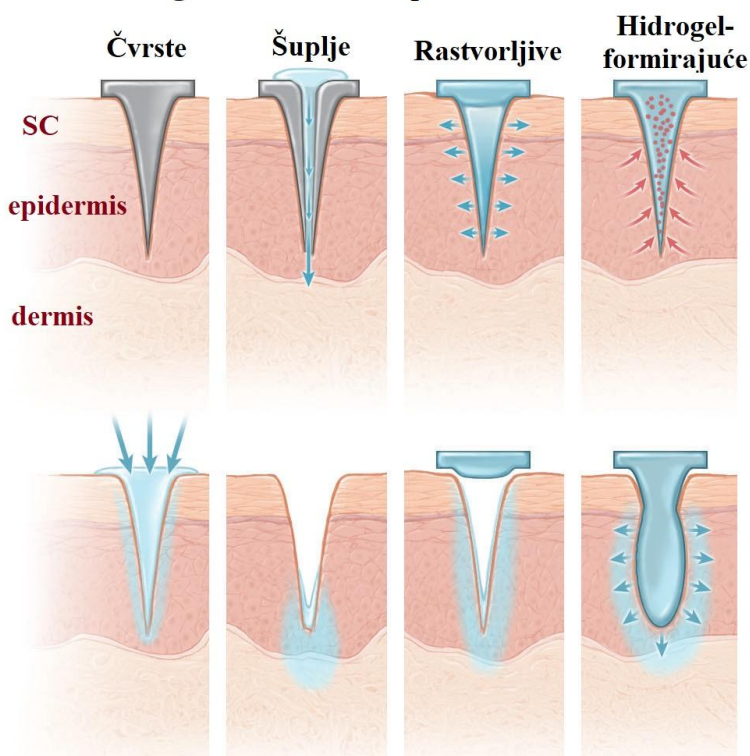
Površina čvrstih mikroigala može da se obloži lekom ili formulacijom leka koji se oslobađa rastvaranjem filma u određenom sloju kože nakon insercije **obloženih mikroigala** (engl. *coated microneedles*) u kožu („*coat and poke*“ pristup) (Slika 1.10). Imajući u vidu da se oblaganjem smanjuje fizička otpornost i oština mikroigala, samo male količine leka mogu da se nanose u vidu

tankog filma na površinu čvrstih mikroigala. Iz tog razloga je nedostatak ovog pristupa što je ograničen samo na veoma potentne lekove, kao što su vaccine, ili na tretmane gde nije potrebna isporuka velikih količina aktivnih entiteta (kozmetičke procedure) [88, 89].

Za razliku od obloženih mikroigala, upotrebom šupljih mikroigala je omogućena primena visokih doza lekova. Takođe, doza leka koja se isporučuje u određeni sloj kože može lakše da se kontroliše u skladu sa potrebama pacijenta. Formulacija leka (obično rastvor leka) koja se primenjuje na kožu može da protiče kroz šuplje mikroigle pasivnom difuzijom ili aktivno, primenom pritiska („*poke and flow*“ pristup) (Slika 1.9 i Slika 1.10). Kako bi se postiglo kontrolisano oslobađanje leka iz rezervoara, na niz mikroigala se ugrađuje mikrofluidni čip ili mikropumpa [88, 89].



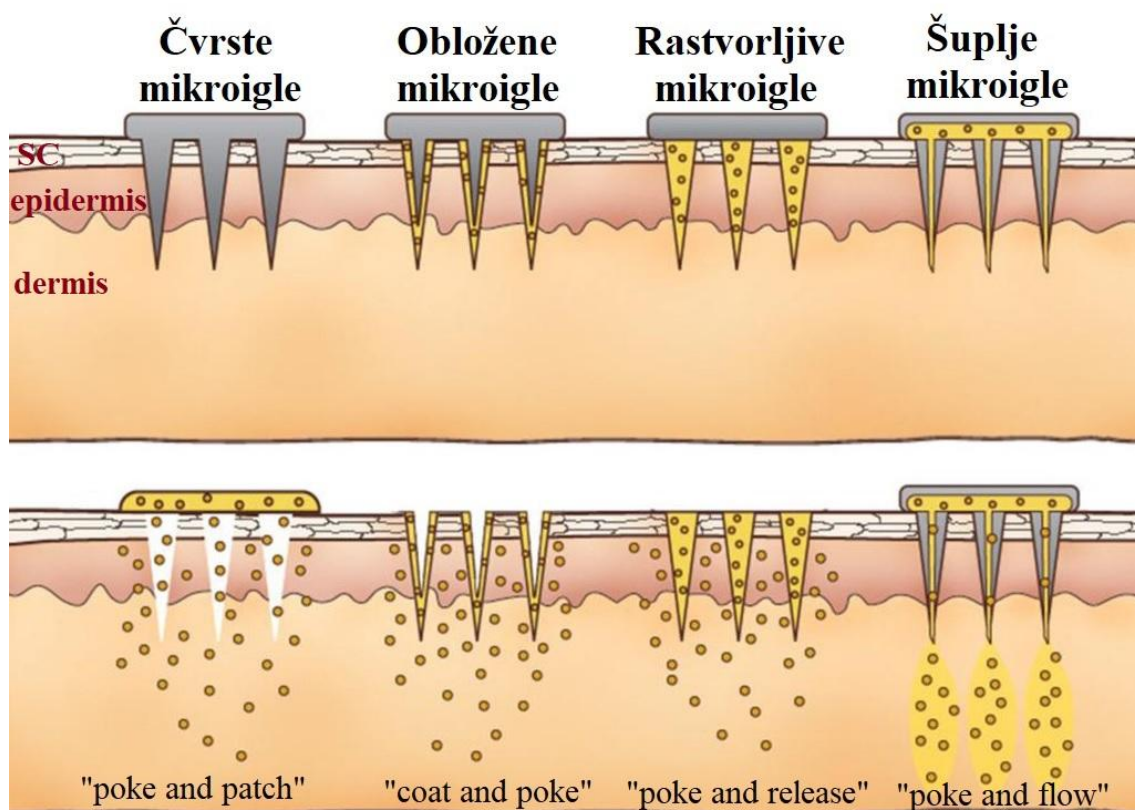
Vrste mikroigala i mehanizmi isporuke leka



Slika 1.9. Osnovne vrste mikroigala (preuzeto i prilagođeno prema referenci [87])

Kao alternativa nerastvorljivom materijalu od kojeg su izgrađene prethodno pomenute vrste mikroigala, upotrebom biokompatibilnih, u vodi rastvorljivih polimera i ugljenih hidrata, kao i biljnih proteina, su formulisane **rastvorljive mikroigle** (engl. *dissolvable microneedles*). Kod ovog tipa mikroigala, lekovita supstanca se inkorporira u matriks i oslobađa degradacijom matriksa ili se polako rastvara u telesnim tečnostima nakon aplikacije („*poke and release*“ pristup) (Slika 1.9 i Slika 1.10) [86, 88, 90]. Ovakav pristup podrazumeva da mikroigle moraju ostati u koži nakon njihove aplikacije dok se lek ne oslobodi. Oslobađanje leka može da bude kontrolisano tako da

izborom odgovarajućeg polimera ono može da traje od nekoliko minuta do nekoliko meseci [91]. Za fabrikaciju rastvorljivih mikroigala se koriste različiti materijali, uključujući polivinil alkohol, polivinilpirolidon, dekstran, karboksimetilcelulozu, hondroitin-sulfat, hijaluronsku kiselinu ugljene hidrate (maltoza, trehaloza, saharoza, manitol, ksilitol), hitozan, poli-laktid-koglikolid, zein (iz kukuruza). Takođe, u poređenju sa obloženim mikroiglama, formulacija rastvorljivih mikroigala omogućuje inkorporiranje veće količine lekovite supstance, međutim inkapsulacija više od 10% aktivne supstance može da dovede do nedovoljne mehaničke snage mikroigala. Ipak, dizajniranjem rastvorljivih mikroigala moguće je rešavanje problema skladištenja nedegradabilnog, biokontaminiranog materijala, ali i sprečavanje komplikacija koje bi potencijalno mogle da se dogode nakon lomljenja čvrstih mikroigala u koži [85, 89, 92-94].



Slika 1.10. Načini isporuke leka u kožu koristeći različite vrste mikroigala (preuzeto i prilagođeno prema referenci [91])

Karakteristike navedenih mehanizama za dermalnu, odnosno transdermalnu isporuku lekova upotrebom različitih vrsta mikroigala su sumirane u Tabeli 1.3.

Relativno nova istraživanja u oblasti mikroigala kao sistema za isporuku lekova putem kože su usmerena ka mikroiglama koje se formulišu iz hidrogelova obrazovanih korišćenjem polimera – **hidrogel-formulišućim mikroiglama** (Slika 1.9). Razlika i prednost ove vrste mikroigala u odnosu na klasične rastvorljive mikroigle je ta što doze lekova i biomolekula koje se isporučuju nisu više ograničene količinom koja može da se inkorporira u same mikroigle. Sastoje se od umreženih polimernih mikroigala bez lekovite supstance i čvrste podloge na kojoj se nalazi flaster sa rezervoarom leka. Nakon aplikacije, insertovani vrhovi mikroigala apsorbuju intersticijsku tečnost i bubre, pri čemu se obrazuju kontinuirani kanali između dermalne cirkulacije i rezervoara leka, što posledično indukuje difuziju leka iz flastera. Dakle, mikroigle predstavljaju alatku za premošćavanje barijere SC, a nakon bubrenja postaju membrana koja kontroliše brzinu difuzije leka. Hidrogel-formulišuće mikroigle mogu da se izrađuju u širokom opsegu veličina flastera i

geometrija, mogu lako da se sterilišu, odupru zatvaranju pora kada su insertovane u kožu i da se u potpunosti uklone intaktne iz kože. Polimeri koji omogućuju fabričaku ovog tipa mikroigala uključuju poli(metilvinileter-ko-maleinska kiselina) umrežena poli(etilenglikolom), hitozan, polilaktid-ko-glikolid i polivinil alkohol. Međutim, dodatni napori treba da se ulože kako bi se proširio izbor materijala koji bi bili pogodni za formulaciju ovih veoma korisnih i obećavajućih sistema za isporuku lekovitih supstanci [90, 93].

Tabela 1.3. Karakteristike različitih mehanizama za isporuku lekova upotrebom mikroigala (preuzeto i prilagođeno prema referencama [89, 95])

Pristup	Faktori koji ograničavaju isporuku lekova	Glavne prednosti	Glavni nedostaci
<i>„poke and flow”</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Proticanje tečnosti kroz otvor mikroigle - Otpor kože proticanju tečnosti pri primeni većih volumena 	<ul style="list-style-type: none"> - Moguća regulacija brzine protoka (npr. upotrebom pumpe) - Moguća isporuka velikog volumena formulacije leka (tečne) - Doziranje je precizno - Nije potrebna ili je potrebna minimalna reformulacija leka 	<ul style="list-style-type: none"> - Rizik od začepljenja mikroigle - Narušene mehaničke osobine mikroigle - Rizik od curenja kroz otvor igle - Moguća neophodnost upotrebe složenih uređaja za aplikaciju
<i>„poke and patch”</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Difuzija leka zavisi od broja i veličine formiranih pora i koncentracije leka u formulaciji 	<ul style="list-style-type: none"> - Jednostavna primena - Bez potrebe za primenom pumpe ili oblaganja - Mogućnost postizanja produženog oslobađanja leka 	<ul style="list-style-type: none"> - Isporka male frakcije primenjenog leka (ograničeno na veoma potentne lekove) - Primena u dva koraka - Neprecizno doziranje - Neophodno je reformulisanje formulacije leka
<i>„coat and poke”</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Sa površine mikroigala dolazi do odvajanja obloge, a u slučaju debljih obloga brzina rastvaranja leka iz obloge 	<ul style="list-style-type: none"> - Oblaganjem se zadržava mehanička jačina - Nema potrebe za primenom flastera ili pumpe za aplikaciju - Precizno doziranje 	<ul style="list-style-type: none"> - Potreba za efikasnom metodom oblaganja mikroigala - Pogodne za primenu niskih doza lekova - Potreba za rekonstitucijom leka - Oblaganje dovodi do smanjenja oštine i sposobnosti penetracije mikroigle
<i>„poke and release”</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Kod rastvorljivih mikroigala: brzina rastvaranja leka iz formulacije 	<ul style="list-style-type: none"> - Gubitak male količine leka pri inkapsulaciji/apsorpciji - Nepotrebna pumpa za aplikaciju ili flaster - Bez štetnog otpada - Precizno doziranje 	<ul style="list-style-type: none"> - Smanjena mehanička otpornost (povećana lomljivost i oštećena geometrije mikroigala) - Pogodna za niske doze lekova - Neophodna rekonstitucija (reformulacija) leka

1.3.2. Faktori koji utiču na penetraciju mikroigala u kožu

Glavna svrha mikroigala jeste da penetriraju u kožu ili drugo biološko tkivo bez lomljenja ili savijanja. Optimalan dizajn mikroigala podrazumeva mikroigle za koje je potrebna mala sila za

insertovanje, a visoka za lomljenje. Kako bi se ovo postiglo neophodno je da se optimizuje više različitih faktora – materijal, način izrade i dizajn mikroigala. Očigledno, postoje i faktori koji mogu da spreče uspešnu penetraciju mikroigala u kožu. Posebno treba da se izdvoji elastična priroda kože zbog koje prilikom insercije mikroigala u kožu dolazi do savijanja kože i izostanka penetracije, naročito u slučaju tupih i kratkih mikroigala. Zbog robusnosti kože, sile insercije mikroigala mogu da prevaziđu silu lomljenja mikroigala (mehaničku otpornost mikroigala) što za posledicu ima oštećenje strukture mikroigala. Ovo je naročito izraženo kod mikroigala veće dužine i onih koje su izrađene od slabijih (mekših) materijala [89, 93, 96, 97].

Prema tome, da bi isporuka leka na ciljno mesto u koži ili kroz kožu bila efikasna, odnosno kako bi terapijski odgovor bio odgovarajući, mikroigle treba da ispune zahteve u pogledu geometrije mikroigala, kao i načina njihove primene. Geometrijske osobine mikroigala su prepoznate kao ključni faktor koji utiče na efikasnu dermalnu i transdermalnu isporuku lekova, zato što određuju čvrstinu mikroigala, koja je u direktnoj korelaciji sa njihovom sposobnošću obrazovanja mikropora u koži, brzinu protoka formulacije (u slučaju šupljih mikroigala) i stoga i frakciju isporučenog leka. Geometrija mikroigala podrazumeva njihov oblik, dužinu, površinu vrha, gustinu po jedinici potporne membrane, odnos širine i visine mikroigle (engl. *aspect ratio*), kao i međusobno rastojanje između mikroigala. Do sada su pripremljene mikroigle različitog oblika – cilindričnog, pravougaonog, piramidalnog, koničnog, oktogonalnog, četverougaoanog, različite dužine i širine. Oštrina vrha mikroigle je važan faktor za penetraciju u kožu, s obzirom da oštrije igle imaju veći potencijal da penetriraju u kožu kada se primeni određena sila. Tako je u slučaju mikroigala sa većim dijametrom vrha, odnosno površinom vrha, potrebna primena više sile insertovanja. Osim toga, primenom oštrijih mikroigala postiže se bolja penetracija lekova kroz kožu u poređenju sa mikroiglama ravnog vrha i ivica. Kada je reč o polimernim mikroiglama pokazano je da je sila lomljenja u direktnoj proporciji sa prečnikom baze mikroigle i Young-ovim modulom materijala, a obrnuto je proporcionalna njenoj dužini. Dakle, sposobnost mikroigala da podnesu silu pritiska prilikom aplikacije je određena mehaničkim osobinama mikroigala, koje su sa druge strane uslovljene vrstom materijala od kojeg su izrađene, metodom njihove proizvodnje i dužinom igle [85, 89, 92, 95]. Istraživanja u ovoj oblasti su ukazala na to da je prilikom dizajniranja mikroigala pogodnih za kliničku primenu neophodno da se uzmu u obzir i razlike u debljini kože na različitim mestima, razlike u koži uslovljene različitom starosti, polom, rasom i indeksom telesne mase. Međutim, rezultati studije koja je sprovedena na 342 ispitanika pokazali su da se mikroiglama može uspešno isporučiti vakcina dermalnim putem bez obzira na različitu starost, pol, etničko poreklo, indeks telesne mase i debljinu kože ispitanika [98].

U slučaju primene i šupljih i čvrstih mikroigala, pri njihovoj penetraciji u kožu, manja gustina igala po jedinici površine potporne membrane se smatra prednošću, jer se na ovaj način povlači deo kože između samih igala. Sa druge strane, velika gustina mikroigala vodi ka manjoj efikasnosti zbog pojave efekta „kreveta od eksera”. Naime, ukoliko je međusobno rastojanje između pojedinačnih mikroigala malo, pritisak koji je korišćen za njihovu aplikaciju je nedovoljan za njihovu uspešnu inserciju u kožu zbog raspoređivanja na veliki broj mikroigala. Iz tog razloga dizajniranje mikroigala podrazumeva iznalaženje kompromisa, kao i korišćenje uređaja ili naprava za njihovu aplikaciju u kožu [10, 85, 89, 95].

Važno je naglasiti i činjenicu da je, usled elastičnih osobina kože, dubina do koje mikroigle penetriraju u kožu uglavnom manja od njihove dužine. Generalno je prihvaćeno da je za isporuku lekovitih supstanci u vijabilni epidermis dovoljna dužina igala od 200 μm , dok se primena dužih mikroigala može preporučiti ukoliko je cilj oslobađanje leka u dermisu [85, 95]. Povećanjem dužine mikroigala se smanjuje dužina puta za difuziju leka, što dovodi do povećane isporuke leka putem dermalne mikrocirkulacije. Međutim previše velika dužina mikroigala može da uzrokuje bol zbog kontakta sa nociceptorima u dubljim slojevima dermisa. Sa druge strane, prekratke igle mogu da budu neučinkovite. Rezultati različitih studija su ukazali i na različitu optimalnu dužinu mikroigala za isporuku različitih supstanci u kožu [93]. Ipak, u najvećem broju istraživanja, kod ručne aplikacije nizova mikroigala, najčešće korišćene su mikroigle sa tipičnom dužinom od 500 μm [99].

1.3.3. Metode izrade mikroigala

Fabrikacija mikroigala je kritičan faktor u prevođenju procesa izrade sa laboratorijskog nivoa na industrijsku proizvodnju i najverovatnije će značajno uticati na cenu finalnog proizvoda [99]. Selekcija metode izrade ili proizvodnje mikroigala je uslovljena vrstom, geometrijskim karakteristikama i materijalom za izradu mikroigala [100]. Materijali poput metala i silikona zahtevaju primenu sofisticiranih tehnika, dok se polimeri i šećeri koji obrazuju filmove lako mogu prevesti u željeni oblik otapanjem i izlivanjem otopljene mase ili izlivanjem rastvora polimera i šećera u pogodnom rastvaraču [93, 97, 101, 102].

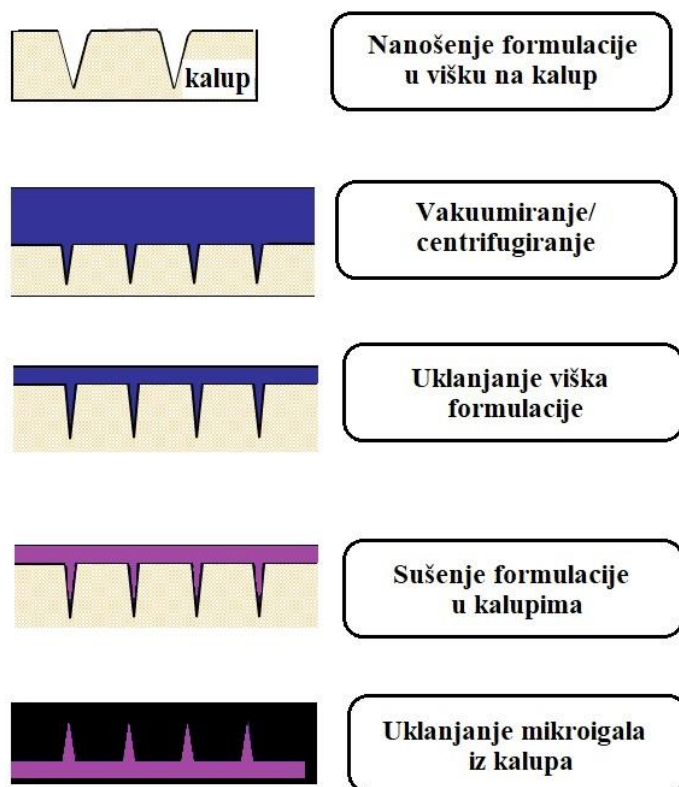
Tabela 1.4. Metode za fabrikaciju različitih tipova mikroigala (prilagođeno prema referencama [100, 101])

Vrsta mikroigala	Metoda izrade
Čvrste silikonske mikroigle	Suvo graviranje Mokro graviranje Deponovanje pare Mikrostereolitografija Trodimenzionalna laserska ablacija
Metalne mikroigle	Lasersko rezanje Laserska ablacija Mokro graviranje Primena galvanizacije (engl. <i>metal electroplating method</i>) Mikrostereolitografija
Keramičke mikroigle	Fotolitografija Mikrokalupljenje i livenje Dvofotonska polimerizacija
Obložene mikroigle	Potapanje/uranjanje Raspršivanje
Šuplje mikroigle	Fotolitografija Duboka litografija X-zracima Suvo graviranje Mokro graviranje Izvlačenje pipeta (engl. <i>pulling pipettes</i>) Galvanizacija metala Litografsko iscrtavanje (engl. <i>drawing lithography</i>) Dvofotonska polimerizacija
Rastvorljive (polimerne i šećerne) i hidrogel-formulišuće mikroigle	Fotolitografija Duboka litografija X-zracima Litografsko iscrtavanje Mikrokalupljenje i livenje (rastvora polimera/šećera ili otopljenog polimera/šećera) Oblikovanje iz kapljica koje se suše vazduhom Dvofotonska polimerizacija

Do sada je opisan veliki broj metoda za fabrikaciju različitih vrsta mikroigala različitog dizajna, uključujući hemijsko izotropno graviranje, injektovanje u kalupe, reaktivno jonsko graviranje, polisilikonsko mikrokalupljenje, litografiju, lasersko rezanje i dvofotonsku polimerizaciju [93]. Izrada mikroigala je započeta 1990-ih godina kada je mikroelektronska

industrija osigurala alate za mikroizradu igala pogodnih za farmaceutsku primenu. Prvi rad [103] u kojem su prikazani podaci o isporuci lekova primenom mikroigala je rezultat istraživanja koje su sprovedi Mark Praunzitz, ekspert u oblasti transdermalne isporuke lekova, i Mark Allen, ekspert u oblasti mikrofabrikacije. Silikon je bio prvi upotrebljeni materijal za izradu mikroigala alatima mikrofabrikacije. Od tada počinje izrada različitih vrsta mikroigala primenom tehnologije mikroelektro-mehaničkih sistema (MEMS tehnologija). U Tabeli 1.4 su prikazane tehnike koje se koriste za fabrikaciju različitih tipova mikroigala, dok je izrada čvrstih silikonskih i rastvorljivih mikroigala koje su predmet ove doktorske disertacije opisana u nastavku teksta.

➤ **Silikonske mikroigle** se uglavnom izrađuju uz primenu MEMS tehnologije koja koristi različite alate i metodologije kako bi se kreirale male 3D strukture veličine u opsegu od milimetarskih do nanometarskih dimenzija. Ova tehnologija je prvobitno bila razvijena za proizvodnju integrisanih strujnih kola. MEMS procesovanje uključuje niz sekvencionalnih operacija. Tri osnovna koraka u izradi čvrstih mikroigala MEMS tehnologijom podrazumevaju formiranje tankih filmova debljine između nekoliko nanometara i 100 μm – nanošenje (engl. *deposition*), prenošenje kalupa na formirani film primenom litografskih metoda – kalupljenje (engl. *patterning*) i urezivanje i formiranje dizajna – graviranje (engl. *etching*) primenom kaustičnih sredstava ili jakih kiselina [85, 93, 95].



Slika 1.11. Konvencionalna metoda za izradu polimernih i mikroigala izrađenih od ugljenih hidrata (preuzeto i prilagođeno prema referenci [104])

➤ Polimerne mikroigle se izrađuju korišćenjem raznovrsnih tehnika zasnovanih na kalupljenju. Neke od ovih tehnika su livenje, toplo kovanje, injekciono livenje, litografsko crtanje, laserska mikroobrada i primena X-zraka. Zbog fleksibilnosti i vernog preslikavanja master strukture, najčešća vrsta kalupa koja se koristi u fabrikaciji **polimernih i mikroigala izrađenih od ugljenih hidrata** su kalupi izrađeni od polidimetilsiloksana (PDMS). Generalno, kod ovog tipa mikroigala isporuka leka ili vakcina zavisi od načina rastvaranja, degradacije ili bubrenja materijala nakon

insercije mikroigala u kožu i njihovog kontakta sa intersticijskom tečnošću [93]. Najveći broj metoda za izradu polimernih i mikroigala izrađenih od ugljenih hidrata se bazira na punjenju tečne formulacije (rastvor polimera/šećera ili otopljenog polimera/šećera) [93, 97, 101, 102] u kalup sa porama koje definišu strukturu i sastav obrazovanih nizova mikroigala. Naredni korak u izradi je sušenje i/ili očvršćavanje materijala (Slika 1.11). Punjenje kalupa tečnom formulacijom nije spontano zbog submikronskih dimenzija pora, površinskog napona i često velikog viskoziteta same formulacije. Nepotpuno punjenje pora kalupa ima za rezultat nastanak mikroigala nepravilnih vrhova ili nemogućnost uklanjanja mikroigala iz kalupa. Kako bi se ovaj problem prevazišao, primenjuju se različiti pristupi, poput centrifugiranja, punjenja kalupa pod pritiskom, vakuumiranja kalupa sa formulacijom na površini i/ili uključivanja surfaktanata u formulaciju. Kada se formulacija u kalupima osuši, čvrsti materijal se vadi iz kalupa [104]. Osim opisanih načina punjenja kalupa, u iste svrhe je uspešno dokazana primena tehnike atomizacije tečnog uzorka, koja se koristi i za oblaganje čvrstih silikonskih mikroigala [85, 94]. Nedavno je predložen i novi način izrade polimernih mikroigala koji podrazumeva prethodno punjenje šupljina kalupa rastvaračem, uklanjanje viška rastvarača i nanošenja formulacije na pore kalupa napunjene rastvaračem. Na ovaj način se izbegava gubitak formulacije pri izradi i omogućen je kontinuirani proces izrade mikroigala, pri čemu na jednom nizu mogu lako da se izrađuju mikroigle različite strukture [104]. Pored opisane metode izrade rastvorljivih mikroigala, u poslednje vreme veliko interesovanje vlada i za primenu tehnike 3D štampanja kako u fabrikaciji kalupa, tako i fabrikaciji samih nizova mikroigala [105, 106].

1.3.4. Primena mikroigala u (trans)dermalnoj isporuci lekova

Tokom poslednjih 20 godina efikasnost mikroigala za poboljšanje (trans)dermalne isporuke lekova je pokazana u velikom broju studija. Henry i sar. [103] su objavili prve rezultate istraživanja u kojem su čvrste silikonske mikroigle korišćene kao predtretman za transdermalnu isporuku kalceina primenom „*poke and patch*“ pristupa, i od tada je započelo intenzivno dokumentovanje njihovog potencijala u naučnoj literaturi. Tako su različite vrste mikroigala upotrebljene za poboljšanje perkutane penetracije malih molekula, kao što su kofein i lidokain [107], metformin [108], ibuprofen-natrijum [109], kardiovaskularni lekovi [110], naltrekson [111], antiepileptički lekovi [112] i gentamicin [113], ali i makromolekula uključujući insulin [114, 115], niskomolekularni heparin [116], ovalbumin [117] i humani hormon rasta [118]. Osim lekova, mikroigle su našle svoju primenu i u isporuci DNK [119] i RNK [120], što može da bude atraktivno i efikasno rešenje za genetska oboljenja kože i različite tipove kancera kože.

Osim sa ciljem da se poboljša transdermalna ili dermalna isporuka lekova i unapredi vakcinacija, koncept mikroigala se primenjuje i u dijagnostici i monitoringu pacijenata. Takođe, kozmetička industrija pokazuje ogroman interes za tehnologiju mikroigala koje se koriste za tretiranje fleka i ožiljaka na koži, kao i isporuku kozmetički aktivnih sastojaka u kožu.

S obzirom da se rastvorljive i hidrogel-formulišuće mikroigle izrađuju od polimera ili ugljenih hidrata, kod njihove primene najčešće ne zaostaje oštri, štetni materijal, te se one smatraju sigurnijim izborom u odnosu na čvrste ili šuplje mikroigle. Ipak, biokompatibilnost korišćenih polimera/ugljenih hidrata treba da bude procenjena kako bi se osigurala komplijansa pacijenata. Rastvorljive i hidrogel-formulišuće mikroigle su intenzivno korišćene kao sistemi za uspešno poboljšanje transdermalne i dermalne isporuke brojnih lekovitih supstanci i biofarmaceutskih makromolekula. Rastvorljive mikroigle su vrsta mikroigala koja se najviše koristi za svrhe vakcinacije. Poboljšanja u isporuci pomoću polimernih mikroigala su uočena u slučaju isporuke klinički relevantnih visokih doza lekova niske potentnosti, malih hidrofилnih molekula, lekova većih molekulskih masa, ali i u brzom isporuci proteina [121-123].

U mnogim slučajevima, primena mikroigala je kombinovana sa drugim metodama za poboljšanje penetracije lekova, poput jontoforeze, sonoforeze ili inkapsuliranja leka u nanočestice, kako bi se postiglo sinergističko delovanje različitih mehanizama za poboljšanje njihove isporuke

u/kroz kožu. Međutim, kombinovana primena mikroigala i submikronskih emulzionih sistema (mikroemulzije i nanoemulzije), što je predmet ove doktorske disertacije, je još uvek slabo dokumentovana u literaturi [124-127]. Takođe, iako su zabeleženi slučajevi izrade rastvorljivih mikroigala korišćenjem disperzija naprednih nosača lekova poput nanočestica [85, 128-131], nanospenzija [132, 133] ili mikročestica [134], prema dosadašnjim saznanjima nije bilo pokušaja da se mikroemulzije koriste kao prekursor za prevođenje u materijal pogodan za fabričaku bilo koje vrste mikroigala. Rezultati svih pomenutih studija su pokazali da se prevođenjem nanolekova u rastvorljive mikroigle značajno poboljšava isporuka inkorporiranih model lekova u vijabilne slojeve kože. Primenom pristupa kombinovane primene nanostrukturiranih nosača i mikroigala je takođe moguće produžiti oslobađanje lekova u koži u odnosu na aplikaciju samih nanoformulacija, posebno u slučaju nanočestica koje mogu da prođu u kožu kroz mikrokanale obrazovane aplikacijom mikroigala [135]. Isti efekat je moguće postići i direktnim insertovanjem nanoformulacija prevedenih u rastvorljive mikroigle [85, 133].

Prema prethodno navedenim primerima jasno je da primenom različitih vrsta mikroigala mogu da se postignu poboljšanja u pasivnom transportu niskodoziranih i visokodoziranih lekova malih molekulskih masa inkorporiranih u konvencionalne i napredne nosače, bioloških lekova poput DNK, RNK i proteina, kao i vakcina u/kroz kožu. Međutim, ne treba zanemariti činjenicu da stepen penetracije primenjenog jedinjenja zavisi pre svega od njegovih fizičko-hemijskih karakteristika, ali i od osobina mikroigala i formulacije putem koje je supstanca primenjena. Tako je i obećavajuća isporuka lekovitih supstanci kombinovanom primenom mikroigala i različitih nanostrukturiranih nosača [93, 124, 127, 135] uslovljena karakteristikama nanonosaa, ali i geometrijskim i mehaničkim osobinama mikroigala. Primera radi, penetracija propranolola u kožu tretiranu čvrstim mikroiglama izrađenim od čelika, dužine 750 µm, se razlikovala kada su na tretiranu kožu primenjene mikroemulzije različitog kvantitativnog sastava i fizičko-hemijskih osobina [125]. U tom smislu, formulacije koje su imale viši udeo surfaktanta i kosurfaktanta su obezbedile veći stepen akumulacije lekovite supstance u koži u odnosu na uzorak bogatiji vodom, odnosno uzorak koji je sadržavao sličan udeo surfaktanta i vode. Takođe, najefikasnija mikroemulzija je imala najveći viskozitet među ispitivanim uzorcima. Interesantno je da ovakav trend nije ustanovljen prilikom procene penetracije propranolola u intaktnu kožu. Slično tome, *in vivo* primenom nanoemulzija aceklofenaka stabilizovanih različitim koemulgatorima na kožu Wistar pacova tretiranu čvrstim mikroiglama, pokazano je da je biološka raspoloživost aceklofenaka iz nanoemulzije kostabilizovane polisorbatom bila značajno viša nego iz formulacije kostabilizovane saharoza-palmitatom, iako aplikacijom istih formulacija na intaktnu kožu nije dobijen isti efekat [124]. U konzistenciji sa prethodnim zapažanjima, rastvorljive mikroigle fabrikovane iz nanospenzija ili nanočestica su obezbedile veći stepen prelaska kurkumina [133] i holekalciferola [130] u kožu nego sama nanospenzija odnosno flaster sa polaznom disperzijom nanočestica, što je pripisano smanjenoj mogućnosti suspendovanih nanokristala/nanočestica leka da prođu kroz intaktnu barijeru SC. Imajući u vidu navedene rezultate, jasno je da se kontakt i interakcije kapi nanometarskih dimenzija sa tkivom u mikrokanalima (formiranim u koži aplikacijom mikroigala) razlikuje od interakcija koloidnih nosača lekova sa intaktnom kožom, pre svega SC.

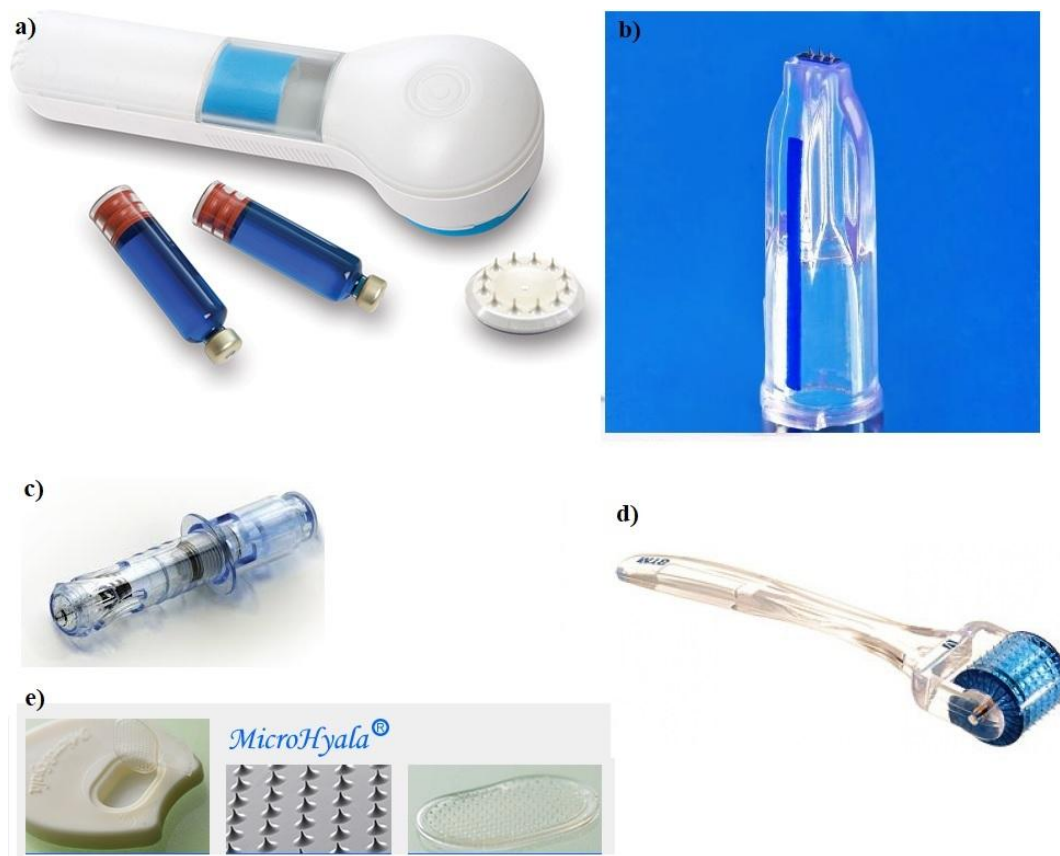
1.3.5. Komercijalizacija mikroigala

Tehnologija mikroigala je relativno nova i zbog toga još uvek nema posebnih regulatornih zahteva koje treba da ispune preparati zasnovani na mikroiglama. Konvencionalni transdermalni flasteri se primenjuju na površinu kože dok se mikroiglama narušava barijera SC i one mogu da se infiltriraju u vijabilni epidermis i dermis. Narušavanje kožne barijere je jedan potpuno drugačiji mehanizam delovanja koji zahteva postavljanje dodatnih naučnih/regulatornih zahteva.

Ipak, poslednjih godina je na tržište dospeo značajan broj uređaja zasnovanih na mikroiglama koji su razvile različite kompanije: Becton-Dickinson (BD) Technologies (SAD), Zosano Pharma (SAD), Microneedle Therapy System (SAD), Sanofi Pasteur MSD (SAD), Valeritas (SAD), Nanopass Technologies (Izrael), 3M (SAD), Rodan+Fields (SAD), Vaxxas (Australija), Corium (SAD) i Lohmann Therapie- Systeme AG (Nemačka/SAD).

Tabela 1.5. Sistemi mikroigala koji su dostupni na tržištu (prilagođeno prema referencama [100, 136])

Naziv proizvoda	Kompanija	Opis proizvoda	Primena
Dermaroller®	Dermaroller® Germany, White Lotus	Cilindrični roler sa čvrstim ili metalnim mikroiglama sa dužinom 0,2-2,5 mm	Poboljšava teksturu kože, tretman ožiljaka i hiperpigmentacija
C-8 (Kozmetički tip)	The Dermaroller Series by Anastassakis K.	Dužina igle 130 µm	Pojačava penetraciju topikalno primenjenih supstanci
CIT-8 (Kolagen indukciona terapija)	The Dermaroller Series by Anastassakis K.	Dužina igle 500 µm	Indukcija sinteze kolagena i remodelovanja kože
MF-8 tip	The Dermaroller Series by Anastassakis K.	Dužina igle 1500 µm	Tretman ožiljaka
MS-4	The Dermaroller Series by Anastassakis K.	Mali cilindar, dužine 1 cm, prečnika 2 cm, i 4 kružna niza igala sa dužinom od 1,5 mm	Tretman ožiljaka od akni na licu
MicroHyal®	CosMed transdermal drug delivery	Flaster sa rastvorljivim mikroiglama sa hijaluronskom kiselinom	Tretman bora
LiteClear®	Nanomed skincare	Čvrste silikonske mikroigle za predtretman kože nakon kojeg se aplikuje lek	Tretman akni i crvenila kože
Soluvia®	Sanofi Pasteur Europe	Šuplja mikroigla prikačena na špric	Vakcina influence
h-patch	Valeritas	Mali adhezivni sistem sličan flasteru	Isporuka lekova u subkutano tkivo (insulin)
Microstructured transdermal system	3M	Šuplja mikroigla	Isporuka biofarmaceutika i malih molekula
MicronJet®	Nanopass	Četiri šuplje mikroigle (kraće od 500 µm) prikačene na plastični uređaj koji se može povezati sa konvencionalnim špricovima	Isporuka formulacija lekova i vakcina (lidokain, insulin, vakcina influence)



Slika 1.12. Primeri komercijalno dostupnih proizvoda baziranih na mikroiglama: a) Microstructured Transdermal System (MTS), b) MicronJet®, c) Intanza®, d) MTS Roller™, e) MicroHyal®

Prvi proizvod zasnovan na mikroiglama je Dermaroller® (Dermaroller® Germany, White Lotus) koji predstavlja cilindrični roler sa čvrstim ili metalnim mikroiglama dužine 0,2-2,5 mm, a koristi se za tretiranje oziljaka i hiperpigmentacija [100]. Microstructured Transdermal System® (3M) se sastoji od obloženih mikroigala i omogućuje brzu i poboljšanu isporuku određenih lekova i vakcina. Pokazano je da se primenom ovog sistema može postići brza i produžena isporuka lidokaina. Kompanija BD Technologies je razvila i Microinfusor sistem sa šupljim mikroiglama kapaciteta 0,2-15 ml čijom primenom lekovi mogu da se isporučuju u potkožno masno tkivo tokom različitog vremenskog intervala (od nekoliko sekundi do nekoliko minuta). U pretkliničkim studijama je pokazano da ovaj automatski sistem obezbeđuje efikasnu isporuku vakcine influence, komparabilnu sa primenom konvencionalne intramuskularne injekcije. Macroflux® (Alza/Johnson & Johnson) je zasnovan na obloženim titanijskim mikroprojektorima za poboljšanje isporuke biofarmaceutika, a sistem za aplikaciju omogućuje konzistentnu regulaciju dubine njihove penetracije u kožu [137].

Kliničke studije su otkrile da je stimulacija proizvodnje kolagena i elastina efikasnija nakon primene mikroigala nego kada se koriste konvencionalni tretmani, što je dovelo do porasta njihove komercijalizacije u kozmetičke svrhe (Tabela 1.5). Tako je 2010. godine FDA (engl. *Food and Drug Administration*) odobrila MTS Roller™ (Slika 1.12) za primenu u kozmetičke svrhe [137]. Rastvorljive mikroigle koje sadrže hijaluronsku kiselinu - MicroHyal® (Slika 1.12) su od kraja 2014. godine odobrene za kozmetičke svrhe. Međutim, iako se koncept mikroigala primenjuje u istraživanjima na veliki broj lekova, još uvek nema registrovanih preparata zasnovanih na mikroiglama koji sadrže lekovite supstance. Zapravo, MicronJet® (Nanopass) i Soluvia® (BD) su dostupni na svetskom tržištu, ali oni nisu pravi nizovi mikroigala nego kratke šuplje igle koje omogućuju intradermalnu primenu konvencionalnih injekcija iz šprica [93]. MicronJet® (Slika 1.12)

je korišćen za isporuku vakcine influence i pokazao je sličnu imunogenost konvencionalnoj vakcini gripa, pri čemu je doza primenjena uz sistem mikroigala bila 20% od konvencionalne doze. MicronJet[®] je FDA odobrila 2010. godine. Sanofi Pasteur MSD Limited je koristio isti pristup u dizajnu intradermalnog mikroinjekcionog sistema za vakcinu gripa - Intanza[®] (Slika 1.13) koji koristi Soluvia[®] injektor (BD Technologies). Dakle, Soluvia[®] i MicronJet[®] su trenutno jedini sistemi za farmaceutsku primenu zasnovani na mikroiglama. Osim Intanza[®] sistema, Soluvia[®] je trenutno na svetskom tržištu registrovana i kao IDflu[®] i Fluzone Intradermal[®] za intradermalnu vakcinaciju [137].

Pored registrovanih preparata, trenutno se sprovode brojne kliničke studije za različite preparate zasnovane na tehnologiji mikroigala. Faza III kliničkih studija u kojima je insulin primenjivan u sprezi sa šupljim mikroiglama je sprovedena i okončana 2013. godine. Pokazano je da je na ovaj način primena bila manje bolna, a početak delovanja i uspostavljanje ravnoteže su bili brži kod dece i adolescenata [138]. Takođe, faza III kliničkih ispitivanja je završena (2017. godine) i za sistem mikroigala sa zolmitriptanom za terapiju migrene gde je pokazano da sistem mikroigala omogućuje efikasno uklanjanje simptoma u odnosu na placebo i da je primena dobro podnošljiva [139]. Zosano Pharma (SAD) je razvila ZP-PTH flaster za isporuku paratiroidnog hormona (PTH) kod žena u postmenopauzi koji je zasnovan na Macroflux tehnologiji. Sistem se sastoji od mikrostruktura od titana koje su obložene formulacijom PTH i takođe je u III fazi kliničkih studija [140].

Tokom poslednjih godina može se primetiti da broj preparata sa mikroiglama u kliničkim ispitivanjima značajno raste što je posledica povećanog istraživačkog interesa za tehnologiju mikroigala. Većina ovih studija uključuje testiranje uređaja za injektovanje mikroigala, dok je manji broj studija u kojima se ispituje primena samih flastera sa mikroiglama. Takođe, ispituje se njihova primena u ograničenim uslovima. Stoga će se u narednom periodu biti potreban dodatni klinički razvoj koji će dokazati efikasnost i prednosti primene sistema za isporuku lekova putem mikroigala u odnosu na tradicionalne sisteme za dostavu lekova na određeno mesto u koži.

1.4. MODEL LEKOVITE SUPSTANCE – KANDIDATI ZA DERMALNU ISPORUKU

Gljivične infekcije kože, nokata i kose su u stalnom porastu i prema procenama oko 25% svetske populacije boluje od gljivičnih oboljenja kože uzrokovanih uglavnom dermatofitima (*Trichophyton* spp, *Epidermophyton* spp. i *Microsporum* spp), *Candida* spp. ili plesnima. Doprinos dramatičnom porastu incidence gljivičnih infekcija daje sve veći broj imunokompromitovanih pacijenata. Lokalna terapija predstavlja atraktivnu opciju lečenja kožnih infekcija zbog toga što se lek primenjuje ciljno na mesto oboljenja i što se na taj način umanjuju rizici za pojavu sistemskih neželjenih efekata. Trenutno su antifungalni lekovi uglavnom dostupni u konvencionalnim farmaceutskim oblicima za spoljašnju primenu poput kremova i gelova. Međutim, kako bi lokalna terapija bila efikasna, u vijabilnom epidermisu se mora dostići odgovarajuća koncentracija antifungalnog leka [141-143]. SC dakle predstavlja veoma efikasnu barijeru za penetraciju antifungalnih lekova u dublje slojeve kože i različite formulacione strategije se primenjuju kako bi se obezbedila efikasna isporuka antifungalnih lekova u ciljno tkivo u koži.

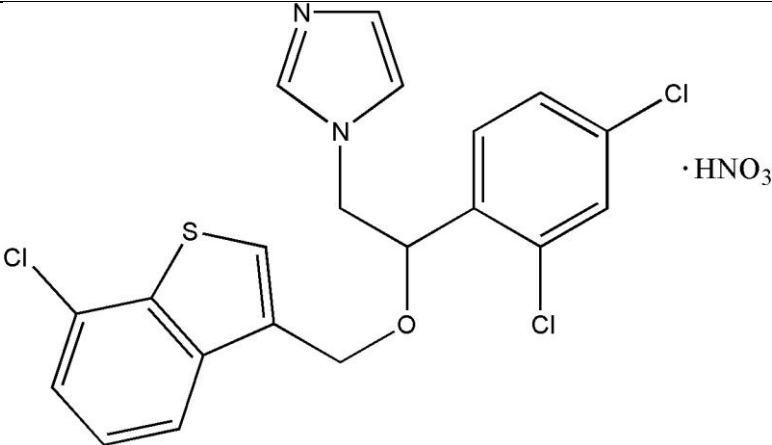
Pored lokalnog lečenja gljivičnih infekcija kože, i u tretmanu akni retinoidima je glavni cilj da se lek isporuči u određene slojeve kože koji su mesto njihovog delovanja (epidermis i folikuli dlaka) [144-146]. Međutim, neželjeni efekti povezani sa primenom postojećih formulacija retinoida poput eritema, svraba, fotoosetljivosti i suvoće kože mogu da umanje komplijansu pacijenata. Takođe, njihovo prisustvo u sistemske cirkulaciji može da dovede do teratogenih efekata, pa je primarni cilj u razvoju preparata za lokalnu primenu da se izbegne prolazak leka kroz kožu u sistemske cirkulaciju. Kako bi se poboljšala isporuka retinoida u kožu i posledično umanjili neželjeni efekti postojećih formulacija, a time i osigurala bolja komplijansa, neophodna je primena

novih formulacionih pristupa [39]. Međutim, s obzirom na izuzetnu lipofilnost mnogih lekova iz ove grupe, odnosno njihovu veoma nisku rastvorljivost u vodi, ali i inherentnu nestabilnost nekih od retionoida, razvoj formulacija kojima bi se poboljšala ili sačuvala efikasnost uz umanjeње neželjenih efekata predstavlja prilično kompleksan zadatak.

1.4.1. Fizičko-hemijske osobine, delovanje i upotreba sertakonazol-nitrata

Sertakonazol-nitrat (SN) je antifungalni lek širokog spektra delovanja, koji pored toga ispoljava i antiinflamatorno i antibakterijsko delovanje, što ga sve skupa čini veoma korisnim u tretmanu mešanih infekcija kože [147]. Pripada klasi novijih imidazolskih antifungalnih lekova (Tabela 1.6), a razvijen je kao dodatna opcija za tretman kožnih i mukoznih infekcija kože. Sertakonazol ima slabo bazni karakter ($pK_a = 7,26$), teško se rastvara u vodi ($< 0,1$ mg/ml), sa koeficijentom lipidno-vodene raspodele ($\log P$) 6,2 [141].

Tabela 1.6. Hemijska struktura i osobine molekula sertakonazol-nitrata (Ph. Eur. 9.0).

Strukturna formula	
Molekulska formula	$C_{20}H_{16}Cl_3N_3O_4S$
IUPAC nomenklatura	(RS)-1-[2-[(7-hloro-1-benzotiofen-3-il)metoksi]-2-(2,4-dihlorofenil)etil]-1H-imidazol nitrat
CAS broj	99592-39-9
Mr	500,8
Osobine	Beo ili skoro beo prašak, praktično nerastvorljiv u vodi, rastvorljiv u metanolu, umereno rastvorljiv u etanolu i metilenhloridu
Tačka topljenja	156-161 °C
log P sertakonazol-baze	6,2

Kako bi se povećala antimikotička aktivnost i olakšala penetracija u keratinizovane slojeve kože bez prolaska u sistemsku cirkulaciju, molekula SN je sintetisana tako da sadrži lipofilni benzotiofenski prsten, vezan etarskom vezom za imidazol [148]. Benzotiofen u strukturi SN predstavlja značajnu razliku SN u odnosu na ostale azole i razlog je bolje rastvorljivosti leka u organskim rastvaračima poput etanola (1,7%), hloroforma (1,5%), acetona (0,95%) i n-oktanola (0,069%) u poređenju sa nerastvorljivošću u vodi [147].

Slično ostalim imidazolima, SN ispoljava fungicidnu i fungistatičku aktivnost, a mehanizam delovanja se zasniva na dva efekta na ćelije gljivica. Prvo, inhibira sintezu ergosterola tako što blokira P450-zavisni enzimski put za katalizu metilacije lanosterola do ergosterola, glavnog konstituenta ćelijskog zida gljivica. Drugo, vezujući se direktno za nesterolske lipide membrane ometa regulaciju njihove permeabilnosti. Sa jedne strane, inhibicija sinteze ergosterola sprečava rast i razmnožavanje ćelija gljivica, dok sa druge strane, direktna interakcija sa ćelijskom membranom

uzrokuje curenje intercelularnih komponenti, naročito adenozin-trifosfata (ATP), uzrokujući smrt ćelije [148].

Spektar dejstva SN uključuje dermatofite rodova *Trichophyton*, *Epidermophyton* i *Microsporum*, kvasce rodova *Candida* i *Cryptococcus*. Osim toga, efikasan je i protiv oportunističkih filamentoznih gljivica i Gram-pozitivnih bakterija. Zbog molekularnih promena na prstenu imidazola, ispoljava poboljšanu aktivnost protiv *Aspergillus*-a, dermatofita i Gram-pozitivnih bakterija u poređenju sa ostalim azolima. Dodatno je utvrđeno da SN takođe ispoljava i antiinflamatorno i antipruritičko delovanje. Sve ovo ga čini veoma korisnim u lečenju pacijenata sa gljivičnim infekcijama rezistentnim na ostale lekove iz grupe azola, čak i flukonazol [147, 148].

Na teritoriji EU je indikovano u tretmanu kožnih mikoza, poput dermatofitoza (*Tinea pedis*, *Tinea corporis*, *Tinea cruris*, *Tinea manus*, *Tinea barbae* i *Tinea pedis*), kutane kandidijaze, seboroičnog dermatitisa vlasišta i *Pityriasis versicolor*, dok je u SAD jedina indikacija za primenu SN *Tinea pedis* (atletsko stopalo). Dostupan je u različitim farmaceutskim oblicima za primenu na koži (krem, gel, rastvor, prašak) u koncentraciji od 2%, ali i vaginalnu upotrebu (ovule, vaginalne tablete, vaginalni krem). U terapiji kožnih infekcija uzrokovanih gljivicama, primenjuje se 1-2 puta dnevno na obolelo mesto, dok dužina terapije varira, ali je generalno preporučljivo da lečenje traje 4 nedelje kako bi se osigurao potpun klinički oporavak i eliminacija mikroorganizama, kao i sprečio povratak bolesti [147, 148].

Međutim, bez obzira na interesantne karakteristike koje se pripisuju SN, njegova klinička primena je ograničena izuzetno niskom rastvorljivošću u vodi, što ima za posledicu i lošu dermalnu raspoloživost [143]. Primenom konvencionalnih farmaceutskih oblika visoke, terapijski relevantne koncentracije sertakonazola ne mogu da budu postignute u dubljim slojevima kože [149], što može da kompromituje njegovu efikasnost u terapiji dermatomikoza koje su zahvatile i ove kompartmente. Osim toga, primena topikalnih antifungalnih lekova može ponekad da prouzrokuje iritaciju kože, pruritus, kontaktni dermatitis, suvoću kože, ekcem i senzibilizaciju kože [147]. Neželjeni efekti se mogu desiti zbog naglog oslobađanja leka na mestu aplikacije, a kako bi se to sprečilo neophodno je da se oslobađanje leka na određeno mesto modifikuje i kontroliše [150, 151].

Sve ovo je stimulisalo istraživače za razvoj potencijalno superiornih nosača kojima bi se poboljšala isporuka SN u dublje slojeve kože, ali i izbegla sistemska resorpcija leka, umanjila mogućnost incidence neželjenih efekata i poboljšala komplijansa pacijenata obolelih od dermatomikoza. Tako su trenutno u fokusu istraživanja različiti napredni sistemi za lokalnu isporuku ovog leka kao što su fleksisomi [150], anhidrovani gelovi [142], nanovezikularni sistem (liposomi, glicerosomi, transferosomi i etosomi) [152, 153] i mikrospužve [151].

Mogućnost upotrebe mikroemulzija kao potencijalnih nosača za poboljšanu isporuku leka u kožu je do sada veoma oskudno ispitana. U naučnim bazama podataka dokumentovane su tri studije koje se bave ovim pitanjem [143, 154-156]. Sahoo i sar. [155, 156] su istraživali formulacije hidrogelova dobijenih ugušćivanjem mikroemulzija karbomerom za topikalnu aplikaciju SN. Mikroemulzije su se sastojale od oleinske kiseline (ulje), Tween[®] 80 je upotrebljen kao surfaktant, propilenglikol kao kosurfaktant, a voda je korišćena kao vodena faza. Rezultati ispitivanja su pokazali da je odabrana formulacija bila stabilna, da je *in vitro* brzina permeacije leka kroz epidermis kože miša bila veća iz ispitivanog uzorka, kao i da je retencija leka u koži miša pune debljine bila tri puta veća u poređenju sa komercijalnim preparatom. Takođe, i antifungalna aktivnost ispitana na soju *Candida albicans* je bila viša u slučaju mikroemulzionih hidrogela u odnosu na lek sa tržišta. U sličnoj studiji koju su sprovedi Radwan i sar. [143] je takođe uz dodatak karbomera formulisan hidrogel iz mikroemulzije koja je imala optimalne karakteristike. Ova mikroemulzija je bila takođe bazirana na Tween[®]-u 80, a ostali sastojci su bili Peceol[®], Transcutol[®] i voda. Takođe, i u ovom slučaju je pokazano da su retencija leka u koži procenjena *in vitro* i antifungalna aktivnost SN više naglašene primenom mikroemulzionog hidrogela nego komercijalnog preparata.

Zabeleženo je i svega nekoliko pokušaja pojačavanja isporuke antifungalnih lekova primenom mikroigala, ali nijedan u kojem je takva mogućnost ispitana na primeru SN. U studiji

koju su realizovali Boehm i sar. [157] i Sachan i sar. [158] su kombinovanom primenom punjenja kalupa injektovanjem i litografije fabrikovane mikroigle na bazi poliglikolne kiseline, koje su u narednoj fazi obložene vorikonazolom [157], odnosno amfotericinom B [158]. U studijama je potvrđena antifungalna aktivnost nizova mikroigala sa lekovitim supstancama, međutim njihove performanse na koži u smislu depozicije leka nisu ispitane. Amfotericin B je korišćen i za modifikaciju površine mikroigala na bazi Gantrez-a AN 169 BF (polivinilmetiletar/anhidrid maleinske kiseline) [159]. Ispitivanje antifungalne efikasnosti *agar plate* metodom je pokazalo da fabrikovane mikroigle mogu da uspešno spreče rast *Candida parapsilosis*. Osim toga, nedavno je pokazano da rastvorljive mikroigle takođe mogu da se fabrikuju upotrebom hitozan-polietilenamin kopolimera kao nosač za isti antifungalni lek (amfotericin B) [160]. Autori svih pomenutih radova su zaključili da mikroigle mogu da se koriste za dermalnu i transdermalnu isporuku antifungalnih lekova u lečenju kožnih gljivičnih infekcija, kao i kožne lajšmanijaze.

U dostupnoj naučnoj literaturi nema dokumentovanih podataka o ispitivanju nejonskih mikroemulzija na bazi novijih PAM – APG i EV, kao potencijalnih nosača za poboljšanu dermalnu isporuku SN. Takođe, uvidom u baze podataka nije zabeležena mogućnost pojačavanja isporuke antifungalnih lekova kombinovanom primenom mikroemulzija i čvrstih mikroigala, dok su podaci o rastvorljivim ili hidrogel-formulišućim mikroiglama za poboljšanu isporuku antifungalnih lekova veoma ograničeni, ali obećavajući [160].

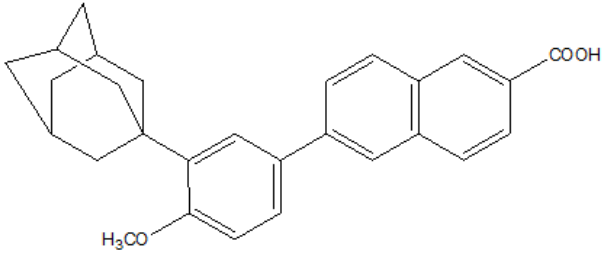
1.4.2. Fizičko-hemijske osobine, delovanje i upotreba adapalena

Adapalen (ADA) je sintetski retinoid (analog vitamina A) 3. generacije koji se koristi kao prva linija odbrane u gotovo svim slučajevima akni [161]. ADA ima slabo kiseo karakter ($pK_a = 4,23$), teško je rastvorljiv u vodi, sa koeficijentom lipidno-vodne raspodele ($\log P$) 8,04 [69]. Prilikom razvoja retinoida koji će biti stabilniji od tretinoina, ali očuvati sličnu efikasnost, u strukturi tretinoina su izvršene velike izmene koje su dovele do sinteze ADA. Uveden je aromatični prsten naftoinske kiseline umesto nestabilnog bočnog lanca tretinoina, dodatno je uvedena fenoksiadamantil grupa koja je uslovlila višu tačku topljenja, nižu rastvorljivost, veću lipofilnost i, prema tome, niži fluks leka kroz kožu, kako bi se poboljšao njegov bezbednosni profil [162].

U polju dermatologije, akne predstavljaju jedno od najčešćih oboljenja kože, naročito među adolescentima i mlađim ljudima [163]. Ova multifaktorijalna kožna bolest zahvata područje folikula dlaka i lojnih žlezda i karakterišu je komedoni, papule, pustule, nodule, ciste i ožiljci [164]. U patogenezu akni su uključena četiri ključna mehanizma: (i) abnormalna proliferacija i diferencijacija keratinocita, (ii) povećana produkcija sebuma, (iii) hiperproliferacija *Cutibacterium acnes* (ranije *Propionibacterium acnes*), i (iv) inflamatorna reakcija inicirana bakterijskim antigenima i citokinima [165, 166]. Stoga, kako bi se bolest lečila ovi faktori treba da se ciljaju odgovarajućim lekovima koji su inkorporirani u odgovarajuće sisteme za njihovu isporuku.

Prema savremenim vodičima za terapiju akni [163, 167], topikalni preparati (retinoidi, bezoil-peroksid, azelainska kiselina i antibiotici) su jedina terapija za pacijente sa blagim i umerenim oblicima akni, dok se u ozbiljnijim slučajevima koriste komplementarno sa sistemskom terapijom. U poređenju sa ostalim topikanim retinoidima (tretinoin, tazaroten), ADA ispoljava sličnu efikasnost, ali je za razliku od njih hemijski i fotohemijski stabilan i selektivan je. ADA je aktivni metabolit i stoga se za ispoljavanje njegove aktivnosti ne zahteva metabolička konverzija. Mehanizam njegovog dejstva je zasnovan na selektivnom vezivanju za receptore za retinoinsku kiselinu (engl. *retinoic acid receptors* – RAR) u jezgru ćelije – RAR- β i RAR- γ , dok se ne veže za receptore u citosolu. Ovaj kompleks se zatim vezuje za DNK i indukuje transkripciju gena, što dovodi do nishodne proliferacije i diferencijacije keratinocita. Kao rezultat toga, ADA umanjuje formiranje mikrokomedona, dolazi do ekfolijacije zrelih komedona i antiinflamatornih efekata (zbog inhibicije hemotaktičkih i hemokinetičkih odgovora humanih polimorfonuklearnih leukocita, kao i lipoksidacije arahidonske kiseline u medijatore upale) [164, 168].

Tabela 1.7. Hemijska struktura i osobine molekula adapalena (Ph. Eur. 9.0).

Strukturna formula	
Molekulska formula	C ₂₈ H ₂₈ O ₃
IUPAC nomenklatura	6-[3-(1-adamantil)4-metoksifenil]-2-naftoinska kiselina
CAS broj	106685-40-9
Mr	412,5
Osobine	Beo ili gotovo beo prašak, praktično nerastvorljiv u vodi (4,01 ng/ml) i etanolu, umereno rastvorljiv u tetrahidrofuranu
Tačka topljenja	325-327 °C
log P	8,04
pKa	4,23

ADA se uobičajeno primenjuje jednom dnevno (uveče) u obliku komercijalno dostupnih registrovanih (rastvor, krem ili gel) ili preparata izrađenih *ex tempore* u apoteci prema različitim oficinalnim propisima u kojima je koncentracija leka 0,1% ili 0,3%. Za razliku od ostalih retinoida, ADA je jedini koji može da se izdaje bez lekarskog recepta u terapiji akni, a osim toga se koristi i izvan zvanično odobrenih indikacija („*off label*“ upotreba) za lečenje bradavica, *molluscum contagiosum*, *Darier*-ovog oboljenja, *Fox-Fordyce* bolesti, *Dowling-Degos* oboljenja, fotostarenja, poremećaja pigmentacije, aktinične keratoze i *alopecije areate* [168]. Pokazano je da je ADA sigurna i efikasna opcija za tretman sunčanih mrlja i ostalih znakova fotoostarele kože, dovodeći do poboljšanja finih i grubih bora i hiperpigmentacija [169]. Imajući u vidu prethodno navedeno, može se očekivati proširivanje njegove upotrebe u dermofarmaciji.

Međutim, iako se smatra da ADA ima bolju podnošljivost nego ostali retinoidi, neželjeni efekti koji se vezuju za primenu postojećih formulacija ADA poput eritema, svraba, fotoosetljivosti i suvoće kože mogu da utiču na adherencu pacijenata [161, 166]. Osim toga, dermalna raspoloživost leka nakon primene konvencionalnih farmaceutskih oblika je veoma ograničena. Sa druge strane, sistemska primena je veoma efikasna, ali prouzrokuje teratogene efekte [145].

Kako bi se obezbedila ciljna isporuka leka (u folikule dlaka i epidermis) i poboljšala efikasnost, kao i u cilju umanjenja neželjenih reakcija na lek i osiguranja bolje komplijanse, neophodna je primena novih strategija za poboljšanu isporuku ADA. Međutim, s obzirom na izuzetnu lipofilnost ovog leka i veoma nisku rastvorljivost u vodi, razvoj formulacija kojima bi se navedeno i postiglo je prilično kompleksan i težak zadatak [170]. Zbog toga se u poslednje vreme intenzivno radi na razvoju sofisticiranih sistema za dermalnu isporuku ovog leka. U fokusu novijih istraživanja su topikalne nanoemulzije [171], liposomi [166, 172], polimerne micelle [170], nanosfere [173], nanostrukturirani lipidni nosači [174], nanočestice [161] i mikročestice [175, 176]. Uprkos njihovom velikom potencijalu za poboljšanje dermalne isporuke lekova, u naučnim bazama podataka je za sada opisana samo jedna studija u kojoj je ispitana mogućnost obrazovanja mikroemulzija koje služe kao nosači za primenu ADA na kožu [69]. Sastojci ove formulacije su oleinska kiselina, Tween[®] 20, Transcutol[®] P i destilovana voda. Autori ove publikacije su zapazili da je penetracija ADA u kožu svinje pod *in vitro* uslovima bila značajno viša iz mikroemulzija u odnosu na komercijalno dostupan preparat. Primećeno je da se količina leka u folikulima dlaka povećavala sa povećanjem udela vode u formulaciji, što je pratila i promena strukture sistema iz

V/U u bikontinuirani, ukazujući još jednom na uticaj unutrašnje strukture mikroemulziona formulacije na njene biofarmaceutske karakteristike. Treba da se naglasi da je ovo jedini zabeleženi slučaj primene mikroemulzija za pojačavanje dermalne i folikularne isporuke ADA. Takođe, o potencijalu mikroemulzija zasnovanih na surfaktantima iz grupe ostalih polietoksilovanih (npr. gliceret-7-kaprilat/kaprat) ili prirodnih tenzida (npr. APG) nema publikovanih podataka u dostupnoj literaturi.

2. CILJEVI RADA

U fokusu istraživanja ove doktorske disertacije bila je procena različitih mogućnosti za unapređenje/poboljšanje dermalne isporuke slabo rastvorljivih model lekovitih supstanci. Preciznije, razvijeni su i sveobuhvatno okarakterisani emulzioni nosači sa nanostukturom na bazi nejonskih surfaktanata – mikroemulzije (kao hemijski pojačivači penetracije penetracije), pri čemu su korišćeni surfaktanti novije generacije – APG i polioksietilen(glicerol) estri masnih kiselina. Dodatni cilj naučnog istraživanja je bio usmeren i na razvoj i primenu inoviranih tehnika biofarmaceutske karakterizacije, odnosno *in vitro* (tzv. *ex vivo*) procenu dermalne raspoloživosti dve model lekovite supstance iz različitih farmakoterapijskih grupa (SN i ADA), različitih fizičkohemijskih svojstava, koje se iz prethodno razvijenih biokompatibilnih mikroemulzija primenjuju u različitim terapijskim koncentracijama. Kako bi se uporedio doprinos različitih tipova nosača u poboljšanju dermalne raspoloživosti model leka, posebna pažnja bila je usmerena na mikroigle, kao fizičke inhensere penetracije, odnosno na procenu mogućnosti značajnog poboljšanja isporuke SN u/kroz kožu primenom različitih vrsta mikroigala (čvrste silikonske vs. rastvorljive mikroigle). Dodatno je izvršena komparativna evaluacija efikasnosti fizičkih inhensera penetracije (mikroigle) u odnosu na primenu mikroemulzija kao koloidnih nanostrukturiranih nosača, odnosno opcije hemijskog pojačivača penetracije. Navedeni ciljevi su realizovani kroz četiri faze istraživanja, a pojedinačni ciljevi svake faze su opisani u nastavku ovog poglavlja.

2.1. CILJ PRVE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA

Cilj prve faze istraživanja je bio razvoj nejonskih, biokompatibilnih emulzionih nanostrukturiranih sistema – mikroemulzija, na bazi APG, kao i etoksilovanih glicerida masnih kiselina te odabir nosača optimalnih karakteristika za dermalnu isporuku dve model lekovite supstance – SN i ADA. U svrhu realizacije ovog cilja, sprovedeno je ispitivanje faznog ponašanja pseudoternarnih sistema ulje/surfaktant-kosurfaktant/visokoprečišćena voda, pri čemu su kao surfaktanti korišćeni različiti APG (decil-glukozid i kaprilil/kapril-glukozid), kao i etoksilovani surfaktant (gliceret-7-kaprilat/kaprat – Emanon[®] EV-E). Osim toga, u odabranim sistemima su ispitane promene u tipu, odnosno nanostrukтури mikroemulzija sa povećanjem sadržaja visokoprečišćene vode, što je vršeno uz primenu kako direktnih, tako i indirektnih fizičkohemijskih tehnika. Na osnovu solubilizacionog kapaciteta mikroemulzija za model lekovite supstance odabrane su formulacije za dalja ispitivanja.

2.2. CILJ DRUGE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA

Druga faza eksperimentalnog rada imala je za cilj sveobuhvatnu fizičkohemijsku karakterizaciju optimalnih formulacija izabranih u prethodnoj fazi istraživanja u pogledu viskoziteta, morfologije, interakcija između nosača i leka i preliminarne procene stabilnosti, kao i preliminarne *in vivo* procene bezbednosti odabranih uzoraka. U cilju poređenja mikroemulzija zasnovanih na polietoksilovanom surfaktantu, formulisana je mikroemulzija istog kvantitativnog sastava sa polisorbatom 80 kao konvencionalno korišćenim nejonskim surfaktantom.

2.3. CILJ TREĆE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA

U okviru treće faze istraživanja, cilj je bio da se stekne uvid u uticaj varijacija u sastavu formulacije (tip surfaktanta/ulja na performanse uzoraka sa APG, odnosno tip polietoksilovanog surfaktanta i vrste kosurfaktanta na ispitivane karakteristike sistema sa polietoksilovanim surfaktantom) i fizičkohemijskih karakteristika nosača na dermalnu raspoloživost model lekova, primenom komplementarnih fizičkohemijskih *in vitro* biofarmaceutskih metoda. Takođe, jedan od ciljeva ove faze je bio i da se proceni značaj folikularnog puta transporta u penetraciji ADA iz

mikroemulzija, kao i ispitivanje antifungalne aktivnosti uzoraka sa SN. Ova faza je imala za cilj i da se na osnovu dobijenih rezultata proceni potencijalni značaj primene naprednih sistema kao hemijskih inhensera penetracije u odnosu na konvencionalne preparate.

2.4. CILJ ČETVRTE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA

Na kraju, u četvrtoj fazi eksperimentalnog rada cilj je bio da se proceni sposobnost rastvorljivih mikroigala, kao nosača leka i fizičkih inhensera, da značajno poboljšaju isporuku SN u kožu iz ispitivanih sistema. U tu svrhu je bila razmotrena mogućnost izrade rastvorljivih mikroigala iz mikroemulzija sa SN u uz dodatak različitih biokompatibilnih polimera kako bi se razvio nosač koji kombinuje prednosti ova dva različita pristupa isporuci leka u/kroz kožu. Mogućnost fabrikacije rastvorljivih mikroigala je paralelno bila ispitana rastvaranjem leka u različitim koncentracijama u rastvoru biokompatibilnog polimera. Takođe, jedan od ciljeva ove faze je bio i da se proceni potencijal kombinovane upotrebe mikroemulzija sa čvrstim silikonskim mikroiglama kako bi se obezbedila poboljšana isporuka SN u kožu. Konačno, poslednji cilj ove faze je bio da se uporedi efikasnost različitih pristupa u poboljšanju isporuke slabo rastvorljivog leka u kožu: mikroemulzije (hemijski inhenser penetracije) vs. rastvorljive mikroigle (fizički inhenser penetracije) vs. čvrste silikonske mikroigle + mikroemulzije (hemijski + fizički inhenser penetracije).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. MATERIJALI

Za izradu biokompatibilnih mikroemulzija sa ili bez lekovitih supstanci bili su korišćeni ekscipijensi navedeni u Tabeli 3.1 i Tabeli 3.2. Kao surfaktanti su korišćeni APG različite dužine ugljovodoničnog lanca: decil-glukozid (Plantacare[®] 2000 UP) (P2000) i kaprilil/kapril-glukozid (Plantacare[®] 810 UP) (P810) (BASF, Ludwigshafen, Nemačka). Prilikom ispitivanja njihove efikasnosti u formulaciji mikroemulzija kao kosurfaktant je korišćen propilenglikol (Kemig, Zagreb, Hrvatska), a kao uljana faza propilenglikol-monokaprilat (Capryol[™] 90; Gattefosse, Lyon, Francuska) (C90). Dodatno, za ispitivanje uticaja vrste ulja na efikasnost P2000, korišćeni su različiti estri masnih kiselina: glicerol-monokaprilat (Imwitor[®] 988, I988), glicerol-monokaprilat/kaprat (Imwitor[®] 742, I742), propilenglikol-dikaprilat/dikaprat (Miglyol[®] 840), svi proizvođača CremerOleo (Witten, Nemačka) i trigliceridi srednje dužine lanca (Saboderm TCC; Sabo S.p.A., Levate, Italija). Iz kategorije polietoksilovanih surfaktanata, u svrhe razvoja biokompatibilnih mikroemulzija su korišćeni gliceret-7-kaprilat/kaprat (Emanon[®] EV-E, Kao Chemicals, Barbera del Valles, Španija) (EV) i polisorbit 80 (Tween[®] 80, Sigma–Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Nemačka). Za komparativnu analizu njihove efikasnosti kao kosurfaktant je bio upotrebljen visokoprečišćeni dietilenglikol monoetiletar (Transcutol[®] P, Gattefosse, Lyon, Francuska), a kao uljana faza C90. U slučaju ispitivanja efikasnosti EV kao novijeg i nedovoljno korišćenog surfaktanata u formulaciji mikroemulzija, dodatno su varirani: etanol (ZorkaPharm, Šabac, Srbija), izopropanol (Lach-Ner, Neratovice, Češka), glicerol (Lach-Ner, Neratovice, Češka) i propilenglikol. Kao vodena faza u izradi svih mikroemulzija je korišćena sveže pripremljena visokoprečišćena voda (GenPure apparatus, TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Nemačka). Model lekovite supstance su bile sertakonazol-nitrat (SN) (Shanghai Pengteng Fine Chemical, Šangaj, Kina) i adapalen (ADA) (Beijing Mesochem Technology, Peking, Kina).

Sve ostale upotrebljne hemikalije i reagensi bili su farmakopejskog (Ph. Eur, USP) ili hromatografskog (HPLC) kvaliteta i korišćeni su bez daljeg prečišćavanja.

U tabelama 3.1 i 3.2 su prikazane najznačajnije karakteristike surfaktanata i ulja korišćenih u ovoj doktorskoj disertaciji.

Tabela 3.1. Osobine surfaktanata korišćenih za formulaciju mikroemulzija

Hemijski naziv	Decil-glukozid ¹	Kaprilil/kapril-glukozid ¹	Gliceret-7-kaprilat/kaprat ¹
Komercijalni naziv	Plantacare 2000 [®] UP	Plantacare 810 [®] UP	Emanon [®] EV-E
Proizvođač	BASF, Nemačka	BASF, Nemačka	Kao Chemicals Europe, Španija
CAS broj			361459-38-3
Osobine	Žućkasta tečnost niskog viskoziteta	Žućkasta tečnost niskog viskoziteta	Žućkasta tečnost niskog viskoziteta
Rastvorljivost u vodi	Potpuno se meša sa vodom	Potpuno se meša sa vodom	Rastvorljiv u vodi
HLB broj	15-16	12-13	~17
Dužina alkil lanca	8-16 C-atoma	8-10 C-atoma	8-10 C-atoma
Viskozitet (mPas)	1000-6000 (20 °C)	500-1500 (20 °C)	max. 300 (20 °C)
Napomene	Plantacare 810 [®] UP sadrži 62-65% surfaktanta i 35-38% vode; pH vrednost 10% rastvora u izopropanolu (15%) je 11,5-12,5	Plantacare 2000 [®] UP sadrži 51-55% surfaktanta i 45-49% vode; pH vrednost 20% rastvora u izopropanolu (15%) je 11,5-12,5	Emanon [®] EV-E sadrži 100% surfaktanta; pH vrednost 5% rastvora u vodi je 5,5-7

¹ INCI – Međunarodna nomenklatura kozmetičkih sastojaka (engl. *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*) – srpski naziv

Tabela 3.2. Osobine ulja korišćenih za formulaciju mikroemulzija

Hemijski naziv	Propilenglikol-monokaprilat ^{1,2}	Glicerol-monokaprilat ^{1,3} Mono- i digliceridi ²	Glicerol-monokaprilat/kaprat ¹ Mono- i digliceridi ² monokaprilokapat ³	Kaprilno/kaprilni trigliceridi ¹ Trigliceridi, srednje dužine lanca ² Srednjelančani trigliceridi ³	Propilenglikol-dikaprilat/kaprat ¹ Propilenglikol-dikaprilokapat ³
Komercijalni naziv	Capryol™ 90	Imwitor® 988	Imwitor® 742	Saboderm TCC	Miglyol® 840
Proizvođač	Gattefosse, Francuska	Cremeroleo, Nemačka	Cremeroleo, Nemačka	Sabo S.p.A., Italija	Cremeroleo, Nemačka
CAS broj	31565-12-5	11140-04-8	85536-07-8	73398-61-5	77466-09-2
Osobine	Bistra, bezbojna, uljasta tečnost	Žućkasto-bela kristalna masa, blagog mirisa na kokos	Žućkasto-bela kristalna masa, blagog mirisa na kokos	Bistra tečnost, gotovo bezbojna	Bezbojna tečnost niskog viskoziteta, neutralnog mirisa
HLB broj	5	3-4	3-4	/	/
Viskozitet (mPas)	20 (20 °C)	/	/	25	9-12 (20 °C)
Ostale napomene	Capryol™ 90 sadrži uglavnom monoestre (≥ 90%) propilenglikola i kaprilne kiseline, sa malom frakcijom diestara (≤ 10%)	Imwitor® 988 predstavlja smešu mono- (45-58%), di- (20-50%) i triglicerida (max. 10%) uglavnom kaprilne kiseline. Topi se na oko 25 °C u uljastu tečnost žućkaste boje. Rastvorljiv u etanolu, acetonu, etru, heptanu i heksanu. Slabo rastvorljiv u vodi (10%), meša se sa mastima i uljima.	Imwitor® 742 predstavlja smešu mono- (45-55%), di- (20-50%) i triglicerida (max. 10%) uglavnom kaprilne i kaprinske kiseline. Topi se na oko 25 °C u uljastu tečnost žućkaste boje. Rastvorljiv u u etanolu, acetonu, etru, heptanu i heksanu. Slabo rastvorljiv u vodi (10%), meša se sa mastima i uljima.	/	Rastvorljiv u u etanolu, izopropanolu, acetonu, dietil etru,etil-acetatu toluenu i heksanu. Meša se u svim odnosima sa parafinskim ugljovodonicima i prirodnim uljima.

¹ INCI, ² USP/NF, ³ Ph. Eur.

3.2. METODE

3.2.1. Prva faza eksperimentalnog rada

U prvoj fazi eksperimentalnog rada je izvršena evaluacija potencijala različitih surfaktanata za obrazovanje mikroemulzionih sistema konstruisanjem pseudoternarnih faznih dijagrama (ulje/surfaktant-kosurfaktant/visokoprečišćena voda) i ispitano je njihovo fazno ponašanje. Kako bi se pronašle mikroemulzije za model lekovite supstance koje imaju optimalan sastav, solubilizacioni kapacitet sistema je određen dodatkom lekovitih supstanci u njihovim terapijskim koncentracijama (SN (2%, m/m) i ADA (0,1%, m/m)) u formulacije sa rastućim udelima visokoprečišćene vode. Dodatno, kombinovanjem indirektnih fizičko-hemijskih tehnika, kojima se obezbeđuju pretpostavke o nanostrukтури koloidnih sistema, i direktnih mikroskopskih tehnika, izvršena je karakterizacija nanostrukture mikroemulzija duž izabrane linije razblaženja.

3.2.1.1. Konstruisanje pseudoternarnih faznih dijagrama

Fazno ponašanje sistema ulje/surfaktant-kosurfaktant/voda, odnosno identifikacija mikroemulzionih oblasti, je ispitana konstruisanjem pseudoternarnih faznih dijagrama. U te svrhe je korišćena konvencionalna metoda titracije vodom na sobnoj temperaturi. Najprije su surfaktant i kosurfaktant (S-CoS) mešani na magnetnoj mešalici (Falc, Italija) u odnosu 1/1 (m/m) u svim ispitivanim sistemima i ovaj odnos je zadržan tokom čitavog ispitivanja. Treba da se naglasi da su APG surfaktanti korišćeni u okviru ove doktorske disertacije komercijalno dostupni u obliku smeša sa vodom, i to P2000 sadrži prosečno 53% (m/m) decil-glukozida, dok P810 sadrži 63,5% (m/m) kaprilil/kapril-glukozida. Stoga je u ovim sistemima stvarni odnos S-CoS 0,53/1 i 0,635/1, respektivno. Nakon priprema smeša S-CoS pripremljene su smeše sa uljem, u kojima je odnos ulja i smeše S-CoS bio variran na sledeći način: 9/1, 8/2, 7/3, 6/4, 5/5, 4/6, 3/7, 2/8 i 1/9 (m/m). Nakon toga je u tako pripremljene pseudobinarne sisteme ulje/S-CoS sukcesivno dodavana visokoprečišćena voda u malim zapreminama od po 10 μ l sve dok se sistem nije zamutio, čime je determinisana maksimalna količina solubilizovane vode. Pojava opalescencije ili turbiditeta je smatrana indikatorom separacije faza. Nakon dodavanja svake porcije vode, uzorci su intenzivno mešani (Vortex Mixer, Velp Scientifica, Italija) i ostavljeni 15 min da stoje kako bi se postigla ravnoteža u sistemu. Tok titracija je praćen vizuelno, a homogeni, transparentni, jednofazni sistemi niskog viskoziteta su definisani kao mikroemulzije. Granice mikroemulzione oblasti su detektovane na osnovu maksimalne količine vode koja je inkorporirana u sisteme bez pojave zamućenja polaznog transparentnog, izotropnog sistema.

3.2.1.2. Izrada mikroemulzija

Mikroemulzione formulacije selektovane sa odabrane linije razblaženja, kao potencijalni nosači za model lekovite supstance, su izrađivane na sobnoj temperaturi uz korišćenje magnetne mešalice (Falc, Italija). Prvo su bile pripremljene smeše S-CoS u masenom odnosu 1:1 a zatim je dodana uljana faza i mešanje nastavljeno dodatnih 15 min. Potom je dodana prethodno precizno definisana količina visokoprečišćene vode uz umereno mešanje u trajanju od 30 min do obrazovanja homogenih transparentnih uzoraka. Svi uzorci su čuvani 48 h na sobnoj temperaturi pre daljih ispitivanja u dobro zatvorenim staklenim kontejnerima sa šlifovanim zatvaračem. U slučaju pripreme uzoraka sa model lekovitim supstancama, odmerena količina SN u koncentraciji 2% (m/m), tj. ADA u koncentraciji 0,1% (m/m), je rastvorena u prethodno pripremljenim mikroemulzijama uz mešanje na magnetnoj mešalici u toku 2h, nakon čega su uzorci tretirani na ultrazvučnom kupatilu tokom 15 min.

3.2.1.3. Ispitivanje rastvorljivosti model lekovitih supstanci – SN i ADA u sastojcima mikroemulzija i određivanje kapaciteta mikroemulzija za solubilizaciju SN i ADA

Rastvorljivost model lekovitih supstanci u uljanoj i vodenoj fazi, surfaktantima i kosurfaktantima (ili njihovom smešom), te odabranim mikroemulzijama, ispitana je „shake flask“ metodom na sobnoj temperaturi, a eksperimenti su vršeni u triplikatu. Svaki lek (SN i ADA) je

dodan u višku u 5 ml odgovarajućeg medijuma i pripremljene smeše su mešane na laboratorijskom šejkeru IKA® KS 260 basic shaker (IKA® Werke GmbH & Company KG Staufen, Nemačka) tokom 48 h brzinom od 300 obr/min. Nakon toga, uzorci su centrifugirani (Centrifuge Rotofix 32 A, Hettich, Tuttlingen, Nemačka) na 3000 obr/min u toku 30 min kako bi se uklonila nerastvorena frakcija leka. Supernatanti su potom filtrirani kroz membranske filtre (0,22 µm) (Chromafil® Xtra PTFE-20/25, Macherey-Nagel, Düren, Nemačka). Koncentracija SN je određena spektrofotometrijskom metodom na 260 nm (UV-1800 spectrophotometer, Shimadzu, Japan), po potrebi uz razblaživanje uzoraka metanolom. Sa druge strane, ADA je kvantifikovan pomoću metode tečne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom (UHPLC-MS/MS), koja je opisana kasnije u okviru metodologije koja se odnosi na treći deo eksperimentalnog rada.

Imajući na umu da je pri formulaciji mikroemulzija cilj da se količina S-CoS svede na minimum, za ispitivanje solubilizacionog kapaciteta sistema odabrana je serija formulacija duž izabrane linije razblaženja u pseudoternarnom faznom dijagramu (S-CoS:ulje = 8:2). U odmerenu količinu sveže pripremljenih mikroemulzionih vehikuluma sa različitim udelom vode, dodan je SN u koncentraciji od 2% (m/m), odnosno ADA u koncentraciji od 0,1% (m/m). Uzorci su mešani na magnetnoj mešalici (Falc, Italija) tokom 12 h i nakon dodatnih 48 h čuvanja na sobnoj temperaturi, izvršen je njihov vizuelni pregled s ciljem detekcije precipitacije lekova ili zamućenosti sistema.

3.2.1.4. Polarizaciona mikroskopija

Kako bi se procenila izotropnost transparentnih placebo mikroemulzija, kao i uzoraka sa lekom, te se ispitalo da li su lekovite supstance potpuno rastvorene u mikroemulzijama, korišćen je polarizacioni mikroskop (Olympus BX51-P, Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Polarizaciona mikroskopija je veoma korisna tehnika pomoću koje se mikroemulzije mogu razlikovati od tečno-kristalnih faza [52]. S obzirom da mikroemulzije kao izotropni sistemi ne interferiraju sa linearno polarizovanom svetlošću, prilikom njihovog posmatranja na polarizacionom mikroskopu može se uočiti tamno polje.

3.2.1.5. Karakterizacija mikrostrukture sistema

U cilju rasvetljavanja unutrašnje strukture odabranih mikroemulzionih vehikuluma kao nosača za SN i ADA, primenjene su različite indirektno fizičko-hemijske i direktne mikroskopske tehnike koje su opisane u nastavku ovog potpoglavlja.

Električna provodljivost

Kako bi se indirektno detektovale promene u strukturi mikroemulzija sa odabrane linije razblaženja kontinuiranim dodatkom vodene faze (prelazak iz V/U sistema do U/V preko bikontinuiranih mikroemulzija), voda je postepeno dodavana u smešu S-CoS i ulja i uzorak promešan na magnetnoj mešalici. Nakon postizanja ravnoteže, na sobnoj temperaturi je izmerena njegova električna provodljivost na konduktometru (SensION EC71 instrument, Hach Company, Loveland, Kolorado) sa konstantom ćelije $1,0 \text{ cm}^{-1}$, direktnim uranjanjem elektrode uređaja u uzorak. Uzimajući u obzir da fazno ponašanje nejonskih tenzida i, prema tome, i mikrostruktura sistema, mogu da budu promenjeni u prisustvu elektrolita zbog modifikacija jonske jačine i hemijskog potencijala vodene faze [63, 177], ispitivanje je sprovedeno bez dodatka elektrolita. Osim toga, dodatak elektrolita u sisteme sa APG nije neophodan zbog toga što oni sadrže elektrolite koji potiču iz procesa proizvodnje [45]. Za svaki uzorak su izvedena po tri merenja.

Reološke karakteristike

Procena reološkog ponašanja mikroemulzija je izvršena korišćenjem reometra (DV-III ULTRA Programmable Rheometer) i pratećeg softvera (Rheocalc v.4.3) (oba proizvođača Brookfield Engineering Laboratories, Middlesboro, SAD), uz upotrebu mernog sistema tipa kupa i ploča (engl. *cone and plate*) pri temperaturi $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Uzorci mikroemulzija odabranih duž odgovarajuće linije razblaženja su izlagani postepenom povećanju brzine smicanja od 75 do 750 s^{-1} , i obrnuto. Očitane vrednosti prividnog viskoziteta sa krivih viskoziteta pri brzini smicanja od 375 s^{-1} su korišćene za

ispitivanje zavisnosti viskoziteta formulacija i sadržaja vode u njima, što može da bude indikator faznih promena u sistemu. Merenja su izvršena u triplikatu.

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (engl. *Differential scanning calorimetry* – DSC)

Sa ciljem istraživanja fizičkog stanja vode u odabranim mikroemulzijama, koje obezbeđuje dodatne informacije o unutrašnjoj strukturi i tipu izrađenih koloidnih sistema, uzorci mikroemulzija su analizirani primenom DSC uz korišćenje uređaja Mettler Toledo DSC 1, opremljenog STAR^e softverom (Mettler Toledo GmbH Analytical, Giessen, Nemačka). Ispitivane formulacije su odmerene u aluminijumskom lončiću (oko 10 mg) i brzo hermetički zatvorene kako bi se sprečilo isparavanje uzoraka, a potom su podvrgnute hlađenju brzinom od 5 °C/min sa 25 na -60 °C, pri konstantnom protoku azota od 50 ml/min. Kao referentni uzorak je služila hermetički zatvorena prazna aluminijumska posuda.

Mikroskopija atomskih sila (engl. *Atomic Force Microscopy* – AFM)

Direktan uvid u tip i unutrašnju strukturu mikroemulzija je obezbeđen primenom mikroskopije atomskih sila (AFM). Za analizu je korišćen NTEGRA Prima Atomic Force mikroskop integrisan sa Image Analysis 2.2.0 softverskim paketom (NT-MDT, Moscow, Rusija). S obzirom na tečnu konzistenciju uzoraka, snimanje je obavljeno u kontaktnom modu, korišćenjem sledećih parametara: konstanta nominalne sile 5.1 N/m, rezonantna i pokretačka frekvencija 87–230 kHz i 148 kHz, respektivno, i frekvencija linije skeniranja 1 Hz. Uzorci (10 µl) su direktno nanošeni na mica pločice (Highest Grade V1 AFM Mica Discs, Ted Pella Inc., Redding, Kalifornija) i sušeni u eksikatoru tokom 48 h kako bi se uklonila voda.

Elektron paramagnetna rezonantna spektroskopija (engl. *Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy* – EPR)

Procena i komparacija osobina međufaznog filma odabranih mikroemulzija i sticanje uvida u njegovu fluidnost/fleksibilnost na mikro nivou, obezbeđena je korišćenjem EPR metode [25, 29, 178]. EPR metodom mogu da se detektuju i identifikuju paramagnetne vrste (vrste sa nesparenim elektronima), a zasniva se na unutrašnjem magnetnom momentu elektrona koji raste sa njegovim spinom. Kao *spin* proba koja ima kapacitet da reflektuje uređenost i dinamičnost međufaznog filma korišćena je 5-doksilstearinska kiselina ([5-(1-oksil-2,2-dimetil-oksazolidin)stearinska kiselina, 5-DSA). Kao masna kiselina, 5-DSA je molekula amfifilne prirode zbog prisustva polarne glave (-COOH grupa) i hidrofobnog dela u strukturi. Zbog ovakve strukture i naročito položaja nitroksidnog paramagnetnog prstena (doksil grupa) na 5. C-atomu ugljovodoničnog lanca, nespareni elektron se nalazi blizu polarne glave molekula. Kao posledica ovakve strukture, kada se 5-DSA solubilizuje u mikroemulzijama, nespareni elektron će biti blizu polarnih grupa S-CoS u sastavu međufaznog filma [179] i, prema tome, ukazati na mobilnost slojeva filma amfifila koji je blizu njegovom hidrofilnom delu.

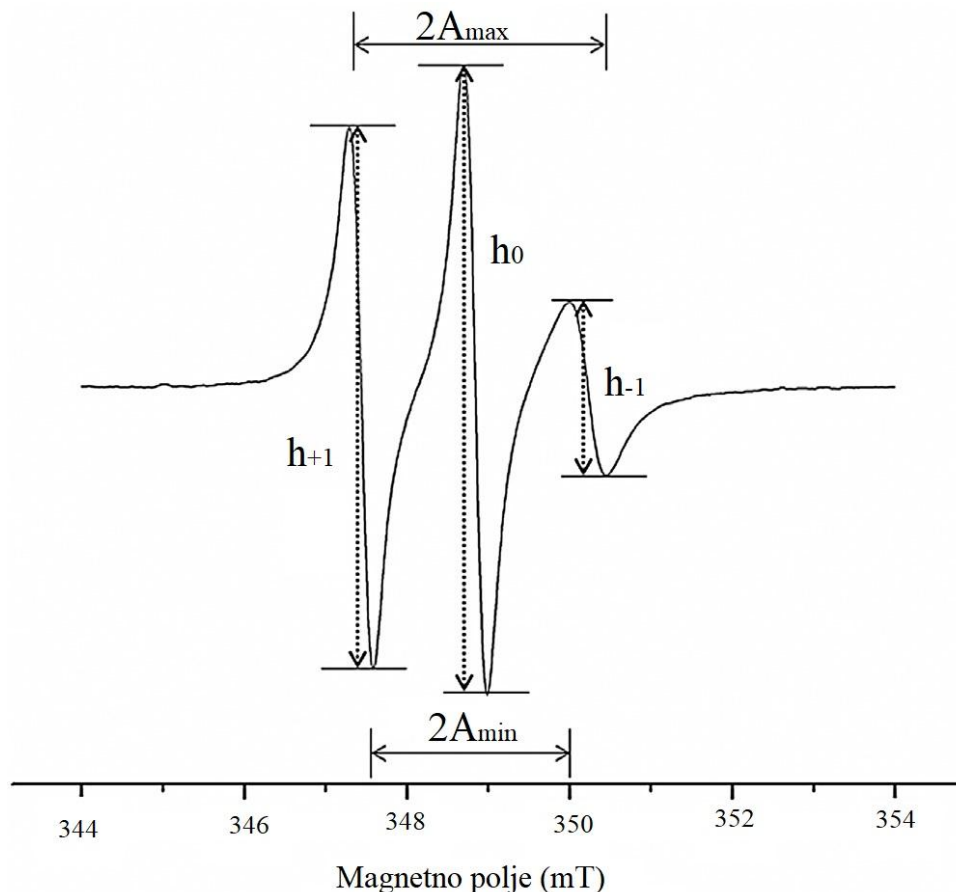
Kako bi se dobila željena koncentracija *spin* probe u uzorcima za analizu, najpre je pripremljen rastvor 5-DSA u etanolu u koncentraciji od 7,8 mM. Potom je 15 µl ovog rastvora preneseno u tubu i iz rastvora je evaporisan etanol te je u svaku tubu dodan uzorak odabrane mikroemulzije (1 ml). Ispitivani uzorci su potom intenzivno izmešani i ostavljeni preko noći u vodenom kupatilu na 25 °C. Finalna koncentracija *spin* probe u svakom uzorku je bila 0,117 mM. Nakon prethodno opisane pripreme, uzorak je postavljen u ravnu ćeliju specijalnog dizajna (WG-813-Q Wilmad, Buena, NJ, SAD). Uslovi pri kojima su snimljeni EPR spektri (Bruker EMX EPR spektrometar sa X-zracima) su bili sledeći: konstantna temperatura od 25°C, širina dometa 0,01 T, centralno polje 0,349 T, prijemnik $5,64 \times 10^{-3}$, vremenska konstanta 5,12 ms, vreme prevođenja 5 ms, modulacija frekvencije 100 kHz, modulacija amplitude 4 G i frekvencija 9,87 GHz. Za prikupljanje i analizu podataka primenjen je Bruker WinEPR program.

Rezultati su izraženi kao rotaciono vreme korelacije (τ_R), parametar uređenosti (S) i izotropna hiperfina konstanta cepanja (α'_0). Rotaciono vreme korelacije *spin* probe, τ_R , je izračunato sa EPR spektra na osnovu sledeće jednačine [180]:

$$\tau_R = (6 \times 10^{-10})[(h_0/h_{+1})^{1/2} + (h_0/h_{-1})^{1/2} - 2]\Delta H_0 \text{ (s)}$$

Jednačina 3.1

gde h_{+1} , h_0 , and h_{-1} predstavljaju amplitude triju hiperfinskih linija na EPR spektru, i ΔH_0 je širina centralne linije (Slika 3.1). Jednačina je primenljiva u području brzih promena, u kojem su *spin* probe osetljive na male promene uslova mikrosredine ($10^{-11} < \tau_R < 3 \times 10^{-9}$ s). Stoga, varijacije τ_R vrednosti oslikavaju ograničenja u pokretljivosti probe uslovljena specifičnim mikrookruženjem. U oblasti sporih promena, gde je $\tau_R > 3 \times 10^{-9}$ s, τ_R se izračunava primenom kompjuterskih simulacija.



Slika 3.1. Šematski prikaz EPR spektra *spin* probe sa nitroksidnim prstenom

Na osnovu EPR spektara se izračunavaju još dva parametra: parametar uređenosti (S) i izotropna hiperfina konstanta cepanja (α'_0). S opisuje uređenost orijentacije *spin* probe u zavisnosti od mikrookruženja u kojem se nalazi. S vrednost se kreće od $S = 1.0$ kada je proba u potpuno uređenom stanju, do $S = 0$, kada je proba u potpuno randomizovanom stanju. S se iz EPR spektra računa na osnovu Jednačine 3.2 [178]:

$$S = (A_{\parallel} - A_{\perp})/[A_{ZZ} - 1/2(A_{XX} + A_{YY})](\alpha'_0/\alpha_0)$$

Jednačina 3.2

gde su A_{XX} , A_{YY} , i A_{ZZ} pojedinačne kristalne vrednosti *spin* probe sa vrednostima 0,63, 0,58 i 3,36 mT, respektivno. Odnos α'_0/α_0 predstavlja faktor korekcije polarosti (hiperfinskih konstanti cepanja), pri čemu je $\alpha_0 = (A_{YY} + A_{XX} + A_{ZZ})/3$ dok je α'_0 izotropna hiperfina konstanta cepanja *spin* probe i definisana je kao $\alpha'_0 = (A_{\parallel} + A_{\perp})/3$. A_{\parallel} odgovara polovini rastojanja spoljašnjeg maksimuma finog cepanja (A_{max}), a A_{\perp} je definisano Jednačinama 3.3 i 3.4 [180]:

$$A_{\perp} = A_{min} + 1.4(1 - S^{app})$$

Jednačina 3.3

$$S^{app} = (A_{max} - A_{min})/[A_{ZZ} - (1/2)(A_{XX} + A_{YY})]$$

Jednačina 3.4

A_{min} predstavlja polovinu rastojanja unutrašnjeg minimuma hiperfinog cepanja.

Hiperfina konstanta cepanja (α'_0) koja ukazuje na polarnost mikrookruženja u kojem se nalazi paramagnetni doksil prsten, može takođe da se izračuna direktno sa EPR spektra. α'_0 vrednost je

udaljenost između prvog i drugog pika prvog izvoda EPR spektra. Ova vrednost je osetljiva na polarnost mikrouslova sredine i povećava se sa povećanjem polarnosti medijuma.

3.2.2. Druga faza eksperimentalnog rada

Druga faza ekperimentalnog rada obuhvatala je fizičko-hemijsku karakterizaciju placebo uzoraka, kao i uzoraka sa lekovima, kako bi se procenila njihova pogodnost za lokalnu primenu na koži. Pored toga, izvršena je i evaluacija uticaja sastava formulacije (tipa surfaktanta te vrste ulja na karakteristike uzoraka sa APG, odnosno vrste tipa etoksilovanog surfaktanta i tipa kosurfaktanta na ispitivane performanse sistema sa etoksilovanim surfaktantom). Mikroemulzije su okarakterisane u pogledu pH vrednosti, električne provodljivosti, viskoziteta (reološka merenja), te interakcija lekovitih supstanci sa nosačima (infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom) i njihove lokalizacije u sistemima (solubilizacioni kapacitet sastojaka za lekovitu supstancu, merenja dinamičkog međupovršinskog napona između vodene faze i odabranog ulja i elektronska paramagnetna rezonantna spektroskopija). U ovoj fazi je ispitana preliminarna stabilnost mikroemulzija. Procena preliminarne bezbednosti odabranih placebo formulacija obezbeđena je *in vivo* studijom na humanim dobrovoljcima, a primenjene su neinvazivne biofizičke tehnike zasnovane na merenju eritema indeksa (EI), stepena hidratisanosti *stratum corneum*-a (SCH) i transepidermalnog gubitka vode (TEGV).

3.2.2.1. Merenje pH vrednosti

Merenje pH vrednosti svih placebo i uzoraka sa model lekovitim supstancama je izvedeno direktnim postupkom pomoću pH metra (HI 9321; Hanna Instruments Inc., Ann Arbor, Mičigen) na temperaturi od 23 ± 2 °C. Merenja su vršena u triplikatu za svaki uzorak.

3.2.2.2. Merenje električne provodljivosti

Konduktometrijskom metodom je izmerena vrednost električne provodljivosti svih placebo i uzoraka sa SN i ADA, direktnim uranjanjem elektode konduktometra (SensION EC71 instrument, Hach Company, Loveland, Colorado, SAD) u ispitivani uzorak. Svaki uzorak je analiziran u triplikatu na temperaturi od 23 ± 2 °C.

3.2.2.3. Ispitivanje reoloških karakteristika

Primenom reometra (DV-III ULTRA Programmable Rheometer) koji je opremljen softverom Rheocalc v.4.3 (Brookfield Engineering Laboratories, Middlesboro, SAD) ispitano je reološko ponašanje odabranih mikroemulzija sa i bez lekovitih supstanci. Korišćen je merni sistem tipa kupa i ploča (engl. *cone and plate*) pri temperaturi od 20 ± 1 °C, a merenje napona smicanja je vršeno u intervalu brzine smicanja od 75 do 750 s⁻¹, i obrnuto. Dobijeni podaci o zavisnosti napona smicanja i brzine smicanja su uklapani (fitovani) sa različitim modelima korišćenjem softverskog paketa. Za poređenje različitih uzoraka, vrednosti prividnog viskoziteta očitane su sa krivih viskoziteta pri brzini smicanja od 375 s⁻¹. Eksperimenti su sprovedeni u triplikatu za svaki uzorak.

3.2.2.4. Procena interakcija lek-nosač – infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR spektroskopija)

Za ispitivanje potencijalno prisutnih intermolekulskih hemijskih interakcija između model lekovitih supstanci i sastojaka mikroemulzionog nosača primenjena je FTIR spektroskopija. FTIR spektri placebo i uzoraka sa solubilizovanim lekovima snimljeni su pomoću BOMEM Hartmann & Braun MB-Series FTIR spektrofotometra (ABB Bomem Inc., Quebec, Kanada). Za svaki spektar je vršeno 10 skeniranja u opsegu talasnih dužina od 4000 do 400 cm⁻¹, sa rezolucijom od 4 cm⁻¹. Za dobijanje spektara tečnih uzoraka nanošeno je 10 µl uzorka na KRS-5 pločicu, dok je u slučaju čistih model lekovitih supstanci korišćena metoda KBr diska.

3.2.3. Procena lokalizacije lekovitih supstanci u mikroemulzijama

3.2.3.1. Merenje dinamičkog međupovršinskog napona

Kako bi se detaljnije istražile interakcije ADA sa sastojcima mikroemulzija i ispitala potencijalna amfifilna priroda leka, dinamički međupovršinski napon između odabrane uljane faze i vode je izmeren u prisustvu (konc. ADA 0,5 mg/ml) i odsustvu leka. Merenja su sprovedena na sobnoj temperaturi u vremenskom opsegu od 1 do 900 s, koristeći tenziometar PAT1 (SINTERFACE Technologies, Nemačka). Kapi ulja su se obrazovale na vrhu kapilare uronjene u kivetu sa visokoprečišćenom vodom. Svako merenje je ponovljeno pet puta.

3.2.3.2. Elektron-paramagnetna rezonantna spektroskopija (EPR)

Tehnika koja je korišćena za ispitivanje nanostrukture mikroemulzija (detaljno objašnjena u okviru metoda koje se odnose na prvi deo eksperimentalnog rada), u smislu procene karakteristika međufaznog filma različitih placebo formulacija, je primenjena i na procenu stepena interakcije SN kao model lekovite supstance sa S-CoS koji se nalazi na međufazi mikroemulzionih vehikuluma. Analizirani su placebo i uzorci sa lekom sa ciljem da se proverí da li solubilizovani lek utiče i na koji način na EPR spektre placebo uzoraka.

3.2.4. Preliminarno ispitivanje stabilnosti mikroemulzija

Fizička i hemijska stabilnost placebo i mikroemulzija sa lekovitim supstancama je ispitana u različitim vremenskim intervalima tokom godine dana čuvanja na sobnoj temperaturi (20 ± 3 °C). Sadržaj SN je određen primenom metode tečne hromatografije (HPLC) (kasnije opisana), dok je za analizu sadržaja ADA u uzorcima korišćena LC-MS/MS metoda, koja je takođe opisana u narednom delu ove disertacije.

3.2.5. *In vivo* procena bezbednosnog profila mikroemulzija

Zbog relativno visokog udela surfaktanata (i kosurfaktanata) u sastavu mikroemulzija, glavna zabrinutost u vezi sa njihovom topikalnom primenom je moguća iritacija kože. Kako bi se preliminarno procenio bezbednosni profil i moguća iritacija kože indukovana primenom mikroemulzija bez solubilizovanog leka, korišćene su biofizičke tehnike koje se uobičajeno koriste za ispitivanje karakteristika kože. Sprovedena je kratkotrajna *in vivo* studija pod okluzijom, u trajanju od 24 h. Bezbednosni profil uzoraka je procenjen pomoću sledećih parametara kože: eritema indeksa (EI), transepidermalnog gubitka vode (TEGV) i stepena hidratisanosti SC (SCH) izmerenih primenom uređaja Mexameter[®], Tewameter[®] TM210 i Cutometer[®] MPA 580 (svi proizvođača Courage+Khazaka, Keln, Nemačka). Studija je sprovedena u dve različite faze sa različitim ciljevima. U prvoj fazi je ispitan iritacioni potencijal odabranih formulacija koji sadrže prirodne surfaktante (APG) u odnosu na potencijal odabranih uzoraka zasnovanih na polietoksilovanim surfaktantima. U ovom delu studije je učestvovalo deset zdravih ispitanika ženskog pola (srednje starosti $29,1 \pm 5,7$), bez oboljenja ili lezija kože, kao i bez istorije alergijskih reakcija. Druga faza studije, u kojoj je takođe učestvovalo deset zdravih ispitanika ženskog pola (srednja starost $26,3 \pm 5,6$) imala je za cilj da se ispita uticaj vrste ulja u APG-mikroemulzijama na vrednost merenih parametara kao indikatora promenjene funkcije kože. Ispitanici su pre studije upoznati sa eksperimentalnom procedurom i potpisali su dobrovoljni pristanak za učešće. Nisu smeli da nanose nikakve preparate na kožu u predelu podlaktica najmanje 24 h pre studije, niti da konzumiraju napitke na bazi kofeina 3 h pre i tokom eksperimenta. Protokol navedene studije je odobren od strane Etičkog komiteta za biomedicinska istraživanja Farmaceutskog fakulteta u Beogradu (odluka br. 355/2).

Pre merenja, na dan eksperimenta, ispitanici su se boravkom u trajanju od 30 min prilagodili kontrolisanim atmosferskim uslovima (temperatura 21 ± 1 °C, relativna vlažnost $45 \pm 5\%$). Tačno označena mesta na volarnoj strani leve podlaktice ($2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ – prvi deo studije; $3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$ –

drugi deo studije) su tretirana sa dva uzorka mikroemulzija u količini od 15 i 25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ (prvi i drugi eksperiment, respektivno), i dva mesta sa desne strane sa druga 2 uzorka. Dodatno, po jedno mesto na svakoj ruci je ostavljeno kao kontrola – jedno kao netretirana kontrola pod okluzijom (NKO), a drugo kao netretirana kontrola bez okluzije (NK). Nakon nanošenja uzoraka, test mesta su pokrivena silikonskim filmom (Parafilm[®] M, Brand GmbH, Wertheim, Nemačka) koji je fiksiran hipoalergijskom adhezivnom trakom. Merenja biofizičkih parametara su obavljena inicijalno, pre nanošenja uzoraka (bazalne vrednosti), a potom 3 h ili 2 h nakon uklanjanja 24-h okluzije (prvi i drugi eksperiment, respektivno). Rezultati su prikazani kao apsolutna razlika (promena) između vrednosti merenih drugog dana naspram bazalnih vrednosti (izmerenih prvog dana). Merenja svih ispitivanih parametara su vršena u skladu sa relevantnim vodičima i dokumentima [181, 182]. Za statističku obradu podataka, korišćen je program GraphPad Prism 6 software. U cilju procene promene bazalnih vrednosti u odnosu na vrednosti merene drugog dana korišćen je t-student test ili Mann-Whitney U-test, zavisno od raspodele podataka procenjene Shapiro-Wilk testom. U zavisnosti od istog parametra, za procenu promena vrednosti testiranih biofizičkih parametara između uzoraka mikroemulzija, kao i između NKO i NK, korišćena je ANOVA praćena Tukey ili Games-Howell *post hoc* testom. Vrednost $p < 0,05$ je smatrana statistički značajnom.

3.3. Treća faza eksperimentalnog rada

U trećoj fazi eksperimentalnog rada je izvedeno *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance iz mikroemulzija primenom *Franz*-ovih difuzionih ćelija, a sa ciljem da se predvidi *in vivo* ponašanje i ispita mehanizam kinetike oslobađanja model lekovitih supstanci inkorporiranih u mikroemulzije nosače. Uzimajući u obzir nedostatak farmakopejskih metoda za *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja lekova iz submikronskih emulzija, formulacije sa SN su dodatno ispitane i primenom imerzionih ćelija kako bi se identifikovala metoda koja je adekvatna za ovu vrstu sistema, odnosno metoda kojom mogu da se detektuju potencijalne razlike u *in vitro* brzini oslobađanja leka iz različitih formulacija. Potom je izvršena procena dermalne i transdermalne raspoloživosti lekova iz onih uzoraka iz kojih je oslobođena najveća količina inkorporiranih lekovitih supstanci. Ovaj eksperiment je podrazumevao *in vitro* ispitivanje permeacije/penetracije na *Franz*-ovim difuzionim ćelijama kroz kožu uha svinje pune debljine. U svrhu utvrđivanja korelacije između različitih *in vitro* tehnika za evaluaciju perkutane penetracije ADA, pod *finite dose* uslovima je sprovedena *tape stripping* metoda (takođe na koži uha svinje pune debljine)). Dodatno, kako bi se dobio potpuniji uvid u distribuciju ADA u pojedinim kompartmentima kože, izvedena je i cijanoakrilatna biopsija kože uha svinje (koja sa *tape stripping*-om čini *diferencijalni stripping*), što može da bude od posebne vrednosti ukoliko se uzme u obzir značaj lokalizacije ADA u folikulima dlaka prilikom tretmana akni. Pored toga, na kraju ove faze je ispitana *in vitro* na soju *Candida spp* antifungalna efikasnost odabranih mikroemulzija sa SN.

3.3.1. Biofarmaceutske karakteristike mikroemulzija sa SN

3.3.1.1. Procena *in vitro* oslobađanja SN iz mikroemulzionih vehikuluma kroz veštačku membranu primenom *Franz*-ovih difuzionih ćelija

In vitro profili oslobađanja SN iz odabranih mikroemulzionih formulacija i referentnog preparata sa tržišta su ispitani pomoću vertikalnih difuzionih (*Franz*-ovih) ćelija (Gauer Glas, D-Püttlingen, Nemačka) na osnovu opšte monografije Američke farmakopeje koja se odnosi na polučvrste lekovite preparate [183]. Akceptorske komore (sa efektivnom površinom za difuziju leka od 2,01 cm^2) su napunjene sa 12 ml akceptorskog medijuma (smeša etanola i vode, 50:50 V/V) koji je prethodno oslobođen gasa i zagrejan (32 °C). Medijum je kontinuirano mešan pomoću magnetne mešalice brzinom od 500 obr/min. Prethodno aktivirane dijalizne celulozne membrane (sa veličinom pora od 2,4 nm, Sigma Aldrich, Nemačka) su pažljivo montirane između donorskih i akceptorskih komora. Ispitivani mikroemulzioni uzorci (1 g) su postavljeni na membrane i

rasprostranjeni tako da pokriju celu površinu membrane, nakon čega su donorske komore pokrivene okluzivom (ParafilmTM), kako bi se sprečilo isparavanje uzoraka. Temperatura difuzionih ćelija je tokom celog eksperimenta održavana na 32 °C pomoću cirkulišućeg vodenog kupatila. U tačno definisanim vremenskim intervalima (30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h i 8 h) uzimani su alikvoti (600 µl) iz akceptorske komore i zamenjeni odmah istom količinom svežeg, prethodno zagrejanog medijuma. Uzorci su potom profiltrirani i u njima je određena koncentracija SN primenom HPLC metode, koja će biti opisana na kraju ovog potpoglavlja. Rezultati su obrađeni i prikazani kao kumulativna količina leka oslobođena po površini membrane (µg/cm²) u zavisnosti od vremena (t), što je omogućilo određivanje transmembranskog fluksa za svaki ispitani uzorak. Kako bi se uporedili dobijeni profili oslobađanja leka, primenjeni su statistički i model-zavisni pristupi. Za opisivanje oslobađanja leka iz ispitivanih uzoraka korišćeni su kinetički modeli prikazani u Tabeli 3.3.

Tabela 3.3. Matematički modeli korišćeni za analizu profila oslobađanja lekovite supstance iz ispitivanih formulacija

Model	Jednačina
Model nultog reda	$Q_t = Q_0 + K_0 t$
Higuchi model	$Q_t = K_H t^{1/2}$
Model prvog reda	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 t$
Korsmeyer-Peppas	$Q_t/Q_\infty = K t^n$

Q_t – količina lekovite supstance oslobođene u vremenu t, t – vreme; Q_0 – početna količina lekovite supstance; Q_∞ – količina lekovite supstance oslobođena u beskonačnom vremenu; K_0 , K_1 , K_H – konstanta nultog, prvog reda i Higuchi-jeva konstanta, respektivno; K – Korsmeyer-Peppas konstanta brzine oslobađanja; n – eksponent oslobađanja.

3.3.1.2. Procena *in vitro* oslobađanja SN iz mikroemulzionih vehikuluma kroz veštačku membranu primenom imerzionih ćelija

Ca ciljem da se proceni sposobnost dveju različitih tehnika da detektuju potencijalne razlike/sličnosti među mikroemulzionim formulacijama, *in vitro* liberacioni profili SN su ispitani pomoću imerzionih (inhenser) ćelija (VanKel Enhancer Cell, VanKel Industries Inc., CA, SAD) sa površinom za difuziju 4 cm² u USP II aparaturi sa rotirajućom lopaticom (Erweka DT 600, Heusenstamm, Nemačka). Kako bi poređenje bilo što objektivnije, eksperimentalni uslovi su podešeni tako da budu što je moguće više slični uslovima koji su korišćeni primenom *Franz*-ovih ćelija. Dakle, posude za medijum su napunjene sa 300 ml prethodno zagrejane (32 °C) smeše etanola i vode, 50:50 (V/V) uz kontinuirano mešanje lopaticom brzinom od 50 obr/min. Ispitivani mikroemulzioni uzorci i komercijalni lekoviti preparat su preneseni u inhenser ćelije u količini od 2 g, preko kojih je postavljena dijalizna celulozna membrana (Sigma Aldrich, Nemačka), prethodno aktivirana potapanjem u akceptorski medijum tokom 12 h. Temperatura je tokom celog eksperimenta održavana na 32 °C. Alikvoti u zapremini od 4 ml su prikupljeni u istim vremenskim intervalima kao kod ispitivanja na *Franz*-ovim ćelijama i zamenjeni odmah istom količinom svežeg, prethodno zagrejanog medijuma kako bi se održali *sink* uslovi. Uzorci su potom profiltrirani i u njima je određena koncentracija SN primenom HPLC metode, opisane na kraju ovog potpoglavlja.

3.3.1.3. *In vitro* studija penetracije/permeacije SN

In vitro test penetracije i permeacije je sproveden na koži uha svinje pune debljine, dobavljenom iz lokalne klanice. Neposredno nakon žrtvovanja životinje, uši svinje su oprane pod mlazom hladne vode. Nakon toga su očišćene pamučnim tupferima natopljenim rastvorom natrijum-hlorida, posušene pamučnom tkaninom, zavijene u aluminijumsku foliju i čuvane na -20 °C, do korišćenja. Na dan eksperimenta, uši svinje su odmrznute na sobnoj temperaturi i pripremljene za dalju upotrebu. Dlake sa kože su uklonjene pomoću trimera, a potom je koža dorzalne strane uha odvojena od hrskavice pomoću skalpela. Dalje su pripremljeni isečci kože odgovarajuće veličine (dijametra 25 mm) i kvaliteta za ispitivanje penetracije/permeacije (potpuno

očuvan integritet kože, bez vidljivih lezija i oštećenja). Dobijene sekcije kože su potopljene u smešu etanola i vode (50:50 V/V) tokom 1 h kako bi se izvršila ekvibracija i rehidracija. Ovako pripremljena koža je pažljivo montirana između donorskih i akceptorskih komora *Franz*-ovih difuzionih ćelija (Gauer Glas, D-Püttlingen, Nemačka) sa površinom 2,01 cm² i volumenom komora od 12 ml. Koža je postavljena tako da je SC okrenut prema donorskoj komori. Precizno odmerena količina ispitivanih formulacija i odobrenog preparata sa tržišta (1 g) je pažljivo nanosena na površinu kože. Eksperimenti su sprovedeni u triplikatu, na temperaturi od 32 °C, koristeći kao akceptorski medijum smešu etanola i vode (50:50 V/V), uz konstantno mešanje na 500 obr/min. Uzorci (600 µl) su uzimani u tačno definisanim vremenskim intervalima (2 h, 4 h, 6 h, 8 h i 24 h) tokom 24 h i zamenjeni neposredno nakon uzorkovanja svežim medijumom iste temperature. Kako bi se odredila količina leka koja je permeirala, uzorci su profiltrirani i podvrgnuti HPLC analizi. Konačno, na kraju eksperimenta su isecci kože uklonjeni, obrisani tri puta pamučnim tupferima koji su natopljeni rastvorom fosfatnog pufera (PBS 7,4) kako bi se uklonio višak formulacije i iseckani na sitne delove. Potom su preneseni u epruvete sa zatvaračima, dodano je 5 ml metanola i izvršena ekstrakcija SN mućkanjem na laboratorijskom šejkeru (IKA®Werke GmbH & Company KG Staufen, Nemačka) tokom 24 h. Uzorci su potom podvrgnuti ultrazvuku (Sonorex RK 120H, Bandelin, Berlin, Nemačka) u trajanju od 30 min kako bi se osigurala maksimalna ekstrakcija leka, a nakon toga centrifugirani 20 min na 4000 obr/min (Centrifuge MPW-56; MPW Med. Instruments, Warszawa, Poljska). Dobijeni supernatanti su filtrirani kroz membranske filtre (0,45 µm) i sprovedena je HPLC analiza kako bi se odredila koncentracija SN u njima.

3.3.2. *In vitro* antifungalna aktivnost mikroemulzija sa SN

Antifungalna aktivnost odabranih mikroemulzionih formulacija i Mycosert® krema je procenjena na soju *Candida albicans*. Za ispitivanje antifungalne efikasnosti ispitivanih uzoraka je korišćena difuzionna "cup plate" metoda. *Candida albicans* je uzgajana na *Sabauroud* agru u sterilnim Petri šoljama u komorama sa laminarnim protokom vazduha. U medijumu su napravljene rupice pomoću sterilne eze, u koje je prenesena precizno odmerena količina ispitivanih uzoraka uz korišćenje sterilnih špricova. Petri šolje su potom zatvorene i inkubirane 24 h na 37 ± 0,1 °C kako bi se dozvolio rast i razmnožavanje gljivica. Antifungalna aktivnost je procenjena na osnovu merenja prečnika zone inhibicije (mm) rasta gljivica koje okružuju formulacije. Svi uzorci su ispitani u triplikatu.

3.3.3. Određivanje sadržaja SN primenom HPLC metode

Kvantitativna analiza SN u eluatima dobijenim tokom praćenja hemijske stabilnosti leka u ispitivanim mikroemulzionim formulacijama, *in vitro* ispitivanja brzine oslobađanja SN, kao i *in vitro* penetracije/permeacije je sprovedena koristeći validiranu HPLC metodu [153], koristeći Dionex Ultimate 3000 sistem (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany), opremljen Dionex Ultimate 3000 kvaternom pumpom, autosemplerom i DAD detektorom. Korišćena je kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm veličina čestica). Mobilna faza je bila smeša metanola i 0,2% mravlje kiseline (70:30, V/V). Temperatura kolone je bila podešena na 30 °C, a brzina protoka mobilne faze je bila 1 ml/min. Detekcija je vršena na 260 nm.

3.3.4. Biofarmaceutske karakteristike mikroemulzija sa ADA

3.3.4.1. Procena *in vitro* oslobađanja ADA iz mikroemulzionih vehikuluma kroz veštačku membranu primenom *Franz*-ovih difuzionih ćelija

In vitro profili oslobađanja ADA iz odabranih mikroemulzionih formulacija i referentnog preparata sa tržišta su ispitani pomoću vertikalnih difuzionih (*Franz*-ovih) ćelija (Gauer Glas, D-Püttlingen, Nemačka). Ekperiment je sproveden na istoj aparaturi i na isti način (isti

eksperimentalni uslovi) koji je opisan kod *in vitro* ispitivanja liberacije SN iz uzoraka (pogledati deo 3.3.1.1), sa jedinom razlikom u vrsti akceptorskog medijuma i kvanifikaciji uzoraka. U slučaju ADA, kao akceptorska faza je korišćena 1/4 (V/V) smeša fosfatnog pufera pH vrednosti 7,4 i metanol:dimetilformamid smeše (50/1, V/V). Koncentracija ADA je određena UHPLC-MS/MS metodom, opisanom na kraju ovog poglavlja.

3.3.4.2. *In vitro* studija penetracije/permeacije ADA

Za *in vitro* ispitivanje penetracije i permeacije ADA je korišćena eksperimentalna procedura objašnjena detaljno u delu 3.3.1.3, u kojem je opisana penetracija/permeacija SN na koži uha svinje pune debljine. U odnosu na opisani protokol, razlika u slučaju ispitivanja formulacija sa ADA je u akceptorskom medijumu – 1/4 (V/V) smeša fosfatnog pufera pH vrednosti 7,4 i metanol:dimetilformamid smeše (50/1, V/V), ekstrakciji lekovite supstance iz kože na kraju eksperimenta (ekstrakcija pomoću 5 ml smeše metanol:dimetilformamid (50:1, V/V) je trajala 12 h, ostali koraci su identični ranije opisanim), a lek u uzorcima je kvantifikovan pomoću UHPLC-MS/MS metode.

3.3.4.3. *Diferencijalni stripping*

Kako bi se odredila folikularna penetracija leka, korišćena je metoda *diferencijalnog stripping-a* koja predstavlja kombinaciju *tape stripping-a* i cijanoakrilatne biopsije površine kože [184, 185]. Uzorci kože su pripremljeni shodno proceduri opisanoj u delu 3.3.1.3. „*In vitro* procena penetracije/permeacije“ sa razlikom u tome što je koža za *diferencijalni stripping* fiksirana za ploču od stiropola tokom celog eksperimenta i nije odvajana od hrskavice uha svinje. Kada je TEGV dostigao vrednost oko $15 \text{ gm}^{-2}\text{h}^{-1}$ (mereno pomoću Tewameter[®] TM 210, Courage+Khazaka, Köln, Nemačka), ispitivane formulacije ($15 \mu\text{l}/\text{cm}^2$) su pažljivo nanosene i ravnomerno rasprostranjene utrljavanjem (uz upotrebu gumene rukavice) na tačno označenim mestima na koži. Sa ciljem da se devijacija rezultata smanji na najmanju moguću meru, ovaj korak je sproveden od strane dobro obučene osobe, a masaža tretiranog mesta, kojom se imitiraju pokreti dlaka pod *in vivo* uslovima, je vršena primenom laganih kružnih pokreta i pritiska oko 2N. Kako bi se omogućilo preračunavanje ukupne debljine SC, na svakom uhu je ostavljano jedno kontrolno netretirano mesto na kojem je meren TEGV. Nakon inkubacionog perioda (1 h), ostatak formulacija je nežno uklonjen pomoću suvih pamučnih tupfera. Usledilo je sukcesivno uklanjanje slojeva SC pomoću 15 adhezivnih traka površine $3,8 \text{ cm}^2$ (D-squame[®] discs, CuDerm Corporation, SAD). Svaka traka je zalepljena na tretirano mesto i pritisnuta rolerom (300 g) kako bi se umanjio uticaj bora i neravnina na koži. Nakon uklanjanja SC, na centralni deo tretiranog mesta nanosena je kap cijanoakrilatnog superlepka (UHU GmbH & Co. KG, Brühl, Nemačka) preko kojeg je rolerom aplikovana adhezivna traka. Nakon polimerizacije lepka (10 min), traka je brzo uklonjena i na taj način je dobijena biopsija površine kože koja uglavnom sadrži folikularne strukture i korneocite. Ovaj korak je ponovljen još jedanput. Svaka adhezivna traka je nakon toga posebno prenesena u kivete za centrifugiranje i ADA je ekstrahovan sa 4 ml smeše acetonitrila, tetrahidrofurana i vode (45/35/20, V/V) [184]. Sa druge strane, trake koje sadrže folikularni deo kože su ekstrahovane sa 5 ml istog medijuma. Sve kivete su najpre podvrgnute sonikaciji na ultrazvučnom kupatilu Sonorex RK102H (Bandelin, Berlin, Nemačka) tokom 30 min. Sledeći korak je bio centrifugiranje dobijenih eluata 20 min pri 4000 obrt/min (MPW-56, MPW Instruments, Poljska), i njihovo filtriranje kroz membranske filtre promera $0,45 \mu\text{m}$. Lek u uzorcima je kvantifikovan pomoću UHPLC-MS/MS metode.

Kako bi se profil koncentracije ADA (ng/cm^2) izrazio kao funkcija relativne dubine SC (x/L), najpre je debljina SC izračunata na osnovu razlike u masi svake trake pre i posle primene na koži, što je omogućilo određivanje količine tkiva uklonjenog pomoću svake trake. Poznavanjem površine kože koja je uklonjena trakom ($3,8 \text{ cm}^2$) i gustine SC ($1 \text{ g}/\text{cm}^3$) [186], razlika u težini traka pre i posle sprovedenog *stripping-a* je lako konvertovana u debljinu SC uklonjenu primenom svake pojedinačne trake.

3.3.5. Određivanje sadržaja ADA primenom UHPLC-MS/MS metode

Koncentracija ADA u svim uzorcima koji su prikupljeni u studiji rastvorljivosti, tokom procene *in vitro* brzine oslobađanja/permeacije, kao i u uzorcima dobijenim ekstrakcijom leka iz kože i traka korišćenih pri *diferencijalnom stripping-u*, je određena primenom UHPLC-MS/MS metode na UHPLC chromatograph ACELLA (Thermo Fisher Scientific Inc., SAD), udvojenom sa kvadropolnim masenim spektrometrom (TSQ Quantum Access MAX, Thermo Fisher Scientific Inc., SAD) sa zagrejanom elektrosprej jonizacijom (heated electrospray ionization – HESI). Korišćena je kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm × 4,6 mm, veličina čestica 5 µm) (Agilent Technologies, SAD). Mobilna faza se sastojala iz acetonitrila i 20 mM rastvora amonijum-acetata (70/30, V/V), sa brzinom protoka 0,8 ml/min i temperaturom kolone podešenom na 25 °C. Injekcioni volumen je bio 10 µl. Posmatrana je jonska tranzicija 411→367.

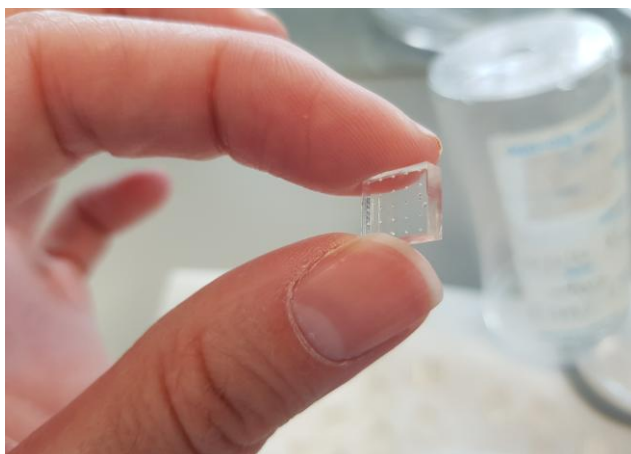
3.4. Četvrta faza eksperimentalnog rada

Četvrta faza eksperimentalnog rada je posvećena proceni i komparativnoj evaluaciji različitih fizičkih pojačivača penetracije leka u/kroz kožu – rastvorljivih mikroigala i čvrstih silikonskih mikroigala udruženih sa mikroemulzijama, kao opcijom hemijskog inhensera penetracije. Na početku ove faze eksperimentalnog rada je prvo razmotrena mogućnost da se mikroemulzije sa SN prevedu u rastvorljive mikroigle dodavanjem različitih biodegradabilnih polimera u prethodno formulisane mikroemulzije formulacije. Paralelno sa ovim je ispitana mogućnost fabrikovanja istog tipa mikroigala rastvaranjem različitih koncentracija lekovite supstance u rastvoru polivinilpirolidona kao biokompatibilnog polimera, pri čemu je bila varirana i koncentracija navedenog polimera. Potom je usledila karakterizacija dobijenih rastvorljivih mikroigala u pogledu morfoloških svojstava (svetlosna mikroskopija) i mehaničke otpornosti kao parametara koji utiču na mogućnost njihove insercije u kožu. Pored toga, izvršeno je određivanje sadržaja SN u rastvorljivim mikroiglama (HPLC metodom), a potom je procenjena *in vitro* brzina njihovog rastvaranja. Na kraju ove faze rada, analizirana je sposobnost mikroigala da pospeše isporuku SN u/kroz kožu komparacijom *in vitro* penetracionih/permeacionih profila SN dobijenih nakon primene odabrane mikroemulzije na kožu uha svinje pune debljine, sa ili bez predtretmana čvrstim silikonskim mikroiglama („*poke and patch*“ pristup), odnosno nakon aplikacije rastvorljivih mikroigala („*poke and release*“ pristup), što je izvedeno primenom *Franz*-ovih ćelija.

3.4.1. Izrada rastvorljivih mikroigala

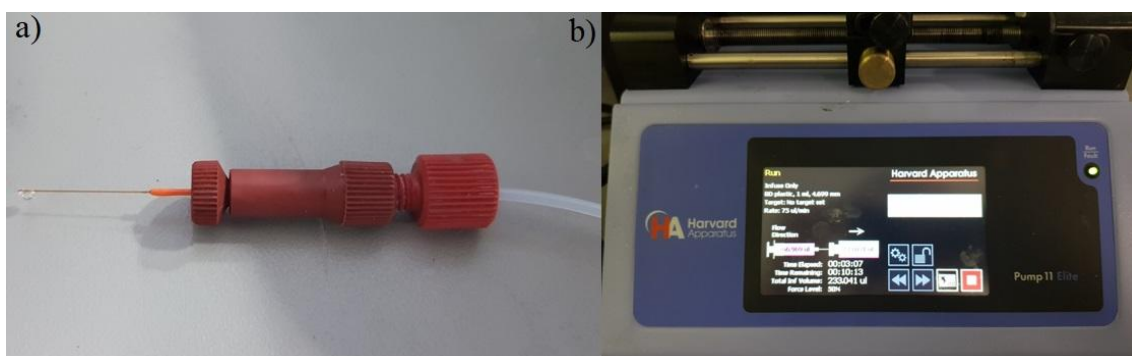
Fabrikacija rastvorljivih mikroigala je sprovedena primenom modifikovane metode punjenja silikonskih kalupa [104] (sa nizom od 25 šupljina po 1 cm² površine, visine 500 µm) (Slika 3.2) tečnom formulacijom nakon čega su kalupi tokom 2 h ostavljeni u vakuum. Za pripremu nizova rastvorljivih mikroigala korišćeni su kalupi od polidimetilsiloksana (PDMS) izrađeni tehnikom mokrog graviranja (engl. *wet-etching process*) u Nacionalnom Institutu Tyndall (Irska). Kao polazne formulacije su korišćene dve mikroemulzije sa SN u koje su dodani sledeći polimeri: karmeloza-natrijum (ultra niskog viskoziteta (15-50 mPas), Fluka, Finska) u koncentraciji od 3% m/V, te polivinil alkohol (PVA) (molarne mase 42500-65000, Sigma Aldrich, Nemačka), polivinilpirolidon (PVP) (Kollidon 17PF, BASF, Nemačka) i hidroksipropilmetilceluloza (HPMC) (Methocel[®] E5 Premium LV, Colorcon, Engleska), svi u koncentraciji od 5% m/V. Paralelno je razmotrena mogućnost izrade rastvorljivih mikroigala rastvaranjem različitih koncentracija SN (5, 25, 50 ili 66,7 mg/ml) u rastvoru PVP (u metanolu), pri čemu je varirana i koncentracija polimera (10, 20 i 30% m/V). Kalupi su preko noći potopljeni u metanol kako bi njihove šupljine ostale nakvašene prilikom punjenja. Višak rastvarača na kalupima je ukljanjan pomoću skalpela, a potom su šupljine precizno punjene formulacijom koristeći tanku kapilaru (100 µm ID) (Slika 3.3) povezanu sa pumpom za injekcije (Pump 11 Elite Infusion/Withdrawal Programmable Single

Syringe, Harvard Apparatus, Massachusetts, SAD) (Slika 3.3). Brzina protoka formulacija je bila između 2 i 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Ceo proces punjenja je praćen posmatranjem ispod svetlosnog mikroskopa (OLYMPUS SZ61, PA, SAD).



Slika 3.2. PDMS kalupi korišćeni za izradu rastvorljivih mikroigala

Nakon sušenja mikroigala, nizovi su odvojeni od kalupa pomoću medicinske adhezivne trake (1525L Poly Med tape, 3M Limited, Irska) i vršena je njihova evaluacija. Do daljih ispitivanja, mikroigle su čuvane na suvom mestu pod ambijentalnim uslovima.



Slika 3.3. Pribor i uređaji za izradu rastvorljivih mikroigala: a) kapilara i b) injekciona pumpa

3.4.2. Ispitivanje karakteristika rastvorljivih mikroigala

3.4.2.1. Određivanje geometrije i morfoloških karakteristika rastvorljivih mikroigala

Vizuelna karakterizacija svake pojedinačne mikroigle sprovedena je pomoću svetlosnog mikroskopa sa integrisanom digitalnom kamerom (OLYMPUS SZ61, PA, SAD). Dobijene mikroigle su analizirane u pogledu fizičkog integriteta, oblika i izgleda na osnovu čega je izvršena njihova evaluacija prema kriterijumima prikazanim u Tabeli 3.4.

Shodno farmakopejskim zahtevima za ujednačenost sadržaja lekovite supstance u transdermalnim flasterima su definisane donje granice prihvatljivosti za uzorke rastvorljivih mikroigala. Tako su za dalje eksperimente korišćeni korišćeni samo nizovi rastvorljivih mikroigala sa više od 90% mikroigala vrednovanih sa 4, tj. uzorci koji su, od maksimalnih 100 bodova (što se odnosilo na niz kod kojeg je svih 25 mikroigala bilo potpuno formirano i sve su imale oštre vrhove i pravilan piramidalan oblik), vrednovani sa više od 90 (donja granica prihvatljivosti) [85].

Tabela 3.4. Interni kriterijumi za procenu morfoloških osobina rastvorljivih mikroigala (Farmaceutski fakultet, UCC, Irska)

Ocena	Kriterijum
4	potpuno formirana mikroigla koja ima pravilan piramidalni oblik i oštar vrh
3	potpuno formirana mikroigla sa nepravilnim oblikom i/ili tupim vrhom
2	nepotpuno formirana mikroigla, bez vrha
1	prisutna samo baze mikroigle i/ili formiranje mikroigle izostaje

3.4.2.2. Određivanje mehaničkih osobina rastvorljivih mikroigala

Mehaničke osobine uzoraka rastvorljivih mikroigala, koje su indikator sposobnosti mikroigala da podnesu silu pritiska prilikom njihove primene, su procenjene pomoću digitalnog merača sile koja je dovela do loma mikroigala, odnosno smanjenja njihove visine (Texture Analyzer, TA.XTPlus, Texture Technologies, SAD) (Slika 3.4). Niz mikroigala je pričvršćen za sondu uređaja upotrebom dvostrano lepljive trake i primenjeno je aksijalno opterećenje u odnosu na ravnu površinu od 5g brzinom od 0,5 mm/sec. Rezultati su prikazani grafički i izraženi kao sila koja je bila potrebna da slomi/redukuje visinu mikroigala.



Slika 3.4. Uređaj za merenje mehaničke jačine mikroigala

3.4.2.3. Određivanje sadržaja SN u rastvorljivim mikroiglama

Kako bi se procenio sadržaj SN u rastvorljivim mikroiglama, te odredila ujednačenost sadržaja leka, analizirano je 10 pojedinačnih uzoraka rastvorljivih mikroigala. Niz mikroigala (koji je sadržavao 25 mikroigala) je rastvoren u 1 ml metanola uz mešanje na horizontalnoj laboratorijskoj mešalici (GLS Aqua 18 Plus, Grant Instruments, Engleska) tokom 30 min, nakon čega je usledila sonikacija u toku 10 min. Sadržaj SN je određen primenom HPLC metode koja je opisana u delu 3.3.3.

3.4.2.4. *In vitro* brzina rastvaranja SN iz rastvorljivih mikroigala

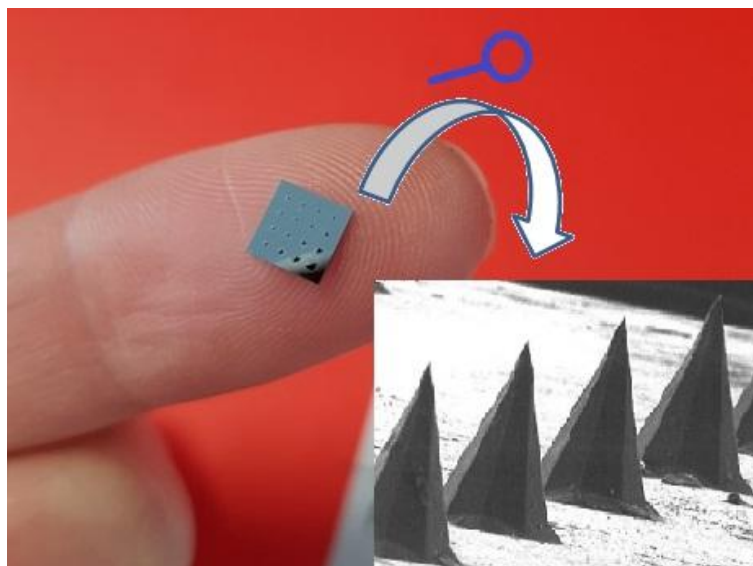
Kako bi se utvrdila brzina kojom se SN oslobađa iz rastvorljivih mikroigala, odnosno brzina kojom se rastvorljive mikroigle rastvaraju, niz mikroigala je prenesen u 1 ml smeše etanol:voda 50/50 (V/V) i vršeno je mešanje na horizontalnoj laboratorijskoj mešalici (GLS Aqua 18 Plus, Grant Instruments, Engleska) tokom 5, 15 i 30 min na temperaturi od 32 °C. Odmah nakon isteka definisanog vremenskog perioda, niz mikroigala je iz medijuma uklonjen pomoću pincete i posmatran ispod svetlosnog mikroskopa (OLYMPUS SZ61, PA, SAD). Sadržaj SN koji se rastvorio u medijumu nakon 5, 15 i 30 min je određen primenom HPLC metode koja je opisana u potpoglavlju 3.3.3. Za svaku vremensku tačku eksperiment je izveden u triplikatu, a dobijeni rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Na osnovu prosečnog sadržaja leka u mikroiglama je izračunat procenat rastvorenog leka nakon 5, 15, odnosno 30 min.

3.4.3. *In vitro* procena penetracije/permeacije SN primenom mikroigala

U poslednjoj fazi ove doktorske disertacije *in vitro*, na koži uha svinje pune debljine, je ispitana penetracija/permeacija SN primenom različitih vrsta mikroigala. Eksperiment je vršen korišćenjem *Franz*-ovih difuzionih ćelija sa površinom za difuziju leka od 2,01 cm² i volumenom akceptorske faze od 12 ml. Priprema uzoraka kože i njihovo postavljanje na aparaturu su obavljani shodno proceduri opisanoj u poglavlju 3.3.1.3. „*In vitro* studija penetracije/permeacije SN“. Isti eksperimentalni uslovi koji su primenjeni kod procene penetracije i permeacije SN iz mikroemulzija su korišćeni i u ovom ispitivanju.

U ovoj fazi su sprovedena dva odvojena testa u kojima su korišćeni različiti pristupi u nanošenju formulacija na kožu: *infinite* i *finite dose*.

U prvom delu eksperimenta je testirana efikasnost ImmuPatch čvrstih silikonskih mikroigala (Nacionalni Institut Tyndall, Kork, Irska) (Slika 3.5) da značajno poboljšaju dermalnu isporuku SN kao model leka primenjenog putem dveju odabranih mikroemulzionih formulacija. Na nizu je bilo ukupno 16 mikroigala na površini od 0,25 cm², visine 200 μ m. Pripremljeni isečci kože su tretirani sa tri niza ImmuPatch silikonskih mikroigala primenom sile od 10 N, a potom su na tretiranu kožu naneseni uzorci mikroemulzija u količini od 1 g (~ 500 mg po cm² kože).



Slika 3.5. Prikaz korišćenih ImmuPatch silikonskih mikroigala – fotografija niza mikroigala sa umetnutom SEM mikrografijom (mikrografija preuzeta i prilagođena prema referenci [85])

Efikasnost penetracije čvrstih mikroigala u kožu, tj. sposobnost mikroigala da naruše integritet kožne barijere obrazovanjem mikropora, procenjena je vizuelno, u studiji bojenja kože

uha svinje 1% rastvorom metilenskog plavog odmah nakon uklanjanja mikroigala (engl. *dye-binding study*). Uzorci kože tretirane mikroiglama su natopljeni rastvorom metilenskog plavog, pri čemu je kontakt boje sa kožom omogućen primenom metalnog prstena koji je sprečio isticanje boje sa mesta primene. Nakon 3 min stajanja, višak rastvora boje je uklonjen sa kože pomoću pamučnog tupfera natopljenog etanolom, omogućujući detekciju obrazovanih mikrokanala u koži. Lipofilni SC ne može da apsorbuje hidrofilnu boju, međutim jednom kada je SC prevaziđen primenom mikroigala, hidrosolubilna boja difunduje kroz kožu i vezuje se za proteine u vijabilnim slojevima kože [187].

Drugi eksperiment je podrazumevao primenu formulacija na kožu pod *finite dose* uslovima. Preciznije, mikroemulzije su primenjene na kožu sa ili bez prethodnog tretmana kože silikonskim mikroiglama (na način opisan u prethodnom pasusu) u količini od 10 μl ($\sim 5 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ kože). Sa druge strane, ista količina SN je obezbeđena aplikacijom po dva niza rastvorljivih mikroigala (25 igala/ cm^2 potporne membrane) pomoću 3M adhezivne trake (1516 Poly Med, 3M Limited, Irska) primenom sile od 2 N okomito na potpornu adhezivnu membranu niza mikroigala.

Svi eksperimenti su trajali 24 h i ponovljeni u triplikatu pod okluzivnim uslovima (pogledati deo 3.3.1.3. „*In vitro* studija penetracije/permeacije SN“). Alikvoti su prikupljeni u definisanim vremenskim intervalima tokom 24 h (2, 4, 6, 8 i 24 h).

Nakon završenog eksperimenta, lek koji je deponovan u koži je ekstrahovan prema proceduri navedenoj ranije (pogledati deo 3.3.1.3 „*In vitro* studija penetracije/permeacije SN“). Sadržaj SN u uzorcima dobijenim pri *infinite dose* uslovima je analiziran primenom HPLC metode (poglavlje 3.3.3), dok su uzorci dobijeni nakon testiranja pod *finite dose* uslovima određeni korišćenjem LC-MS/MS metode.

3.4.3.1. Određivanje sadržaja SN primenom UHPLC-MS/MS metode

Kvantitativna analiza SN u uzorcima dobijenim u *in vitro* studiji penetracije/permeacije pod *finite dose* uslovima je sprovedena koristeći UHPLC-MS/MS metodu na UHPLC chromatograph ACELLA (Thermo Fisher Scientific Inc., SAD). Uređaj je udvojen sa kvadropolnim masenim spektrometrom (TSQ Quantum Access MAX, Thermo Fisher Scientific Inc., SAD) sa zagrejanom elektrosprej jonizacijom (heated electrospray ionization – HESI). Za razdvajanje je korišćena Zorbax Eclipse Plus C8 kolona (150 mm \times 4,6 mm, veličina čestica 5 μm) (Agilent Technologies, SAD). Mobilnu fazu je činila smeša acetonitrila i 0,1% rastvora mravlje kiseline (80/20, V/V), sa brzinom protoka 0,5 ml/min i temperaturom kolone podešenom na 30 °C. Injekcioni volumen je bio 10 μl .

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. REZULTATI I DISKUSIJA PRVE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA

4.1.1. Konstruisanje pseudoternarnih faznih dijagrama

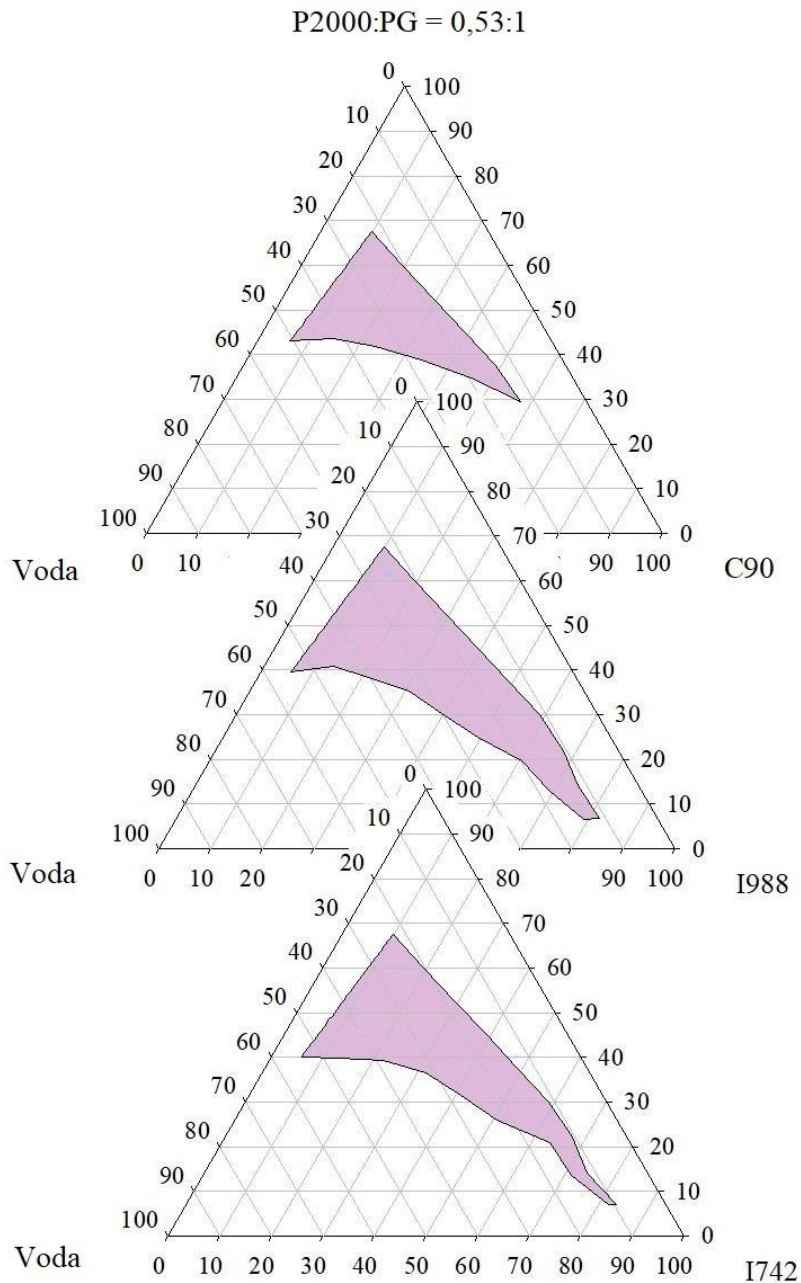
4.1.1.1. Uticaj vrste uljane faze na formiranje mikroemulzija u pseudoternarnom sistemu ulje/Plantacare[®] 2000 UP-propilenglikol/voda

Sa ciljem da se ispita fazno ponašanje APG surfaktanta – P2000, i njegova sposobnost da obrazuje mikroemulzije vehikulume, kao uljana faza su korišćeni različiti estri masnih kiselina (Tabela 3.2). Proučavano je kako diskretne razlike u dužini alkil lanca ulja (glicerol-monokaprilat vs. glicerol-monokaprilat/kaprat), tipa alkanola u strukturi (propilenglikol-monokaprilat vs. trigliceridi, srednje dužine lanca) i stepena esterifikacije lipida (glicerol-monokaprilat/kaprat vs. trigliceridi, srednje dužine lanca, odnosno propilenglikol-monokaprilat/kaprat vs. propilenglikol dikaprilat/kaprat) utiču na efikasnost P2000 na formiranje mikroemulzija.

Kao rezultat visoke hidrofilnosti APG i niske rastvorljivosti u mnogim uljima, priprema mikroemulzija sa ovim surfaktantima je teška i zahteva upotrebu odgovarajućeg kosurfaktanta i ulja, a mnoge eksperimentalne studije su usmerene upravo na povećanje rastvorljivosti APG u uljima dodatkom odgovarajućeg kosurfaktanta [44]. Kako bi se međupovršinski napon snizio, povećala fluidnost međupovršinskog filma i pripremili biokompatibilni nosači, propilenglikol je izabran kao kosurfaktant. Osim njegovih pogodnih osobina kao kosurfaktanta i penetracionog inhensera, pokazano je da ispoljava manju toksičnost u odnosu na druge alkanole [36, 45, 188].

Pseudoternarni fazni dijagrami za sistem ulje/P2000-propilenglikol/visokoprečišćena voda su prikazani na Slici 4.1. Kao što se može uočiti, generalno, P2000 obrazuje mikroemulzije u uskom području udela sastojaka, bez obzira na vrstu korišćenog ulja, što je u skladu sa prethodnim tvrdnjama da je obrazovanje mikroemulzija primenom APG veoma kompleksno. Osim toga, kao što je već pomenuto, P2000, osim decil-glukozida, sadrži i značajnu količinu vode (prema tome i inicijalne smeše ulje/S-CoS) zbog čega su mikroemulzije oblasti udaljene od regiona sa višim frakcijama ulja, na osnovu čega može da se pretpostavi otežana formulacija mikroemulzija tipa V/U.

Među korišćenim uljima, najveću mikroemulzionu oblast su formirali monoestri masnih kiselina. Preciznije, monofazni region (u kojem se obrazuju izotropne, jednofazne tečne formulacije) koji je dobijen u sistemima sa estrima glicerola je veći u odnosu na mikroemulzionu oblast formiranu u sistemu sa monoestrom propilenglikola (C90). Zapravo, u slučaju primene glicerol-monokaprilata (I988) je u inicijalne smeše ulje/P2000-propilenglikol dodano najviše vode (42,53%). Bez obzira na to što su C90 i I988 monoestri kaprilne kiseline, veoma mala razlika u njihovoj strukturi (I988 ima jednu –OH grupu više) se odrazila na fazno ponašanje P2000. Kada je reč o lipidima koji sadrže u svojoj strukturi hidrofilne grupe, zbog razlika u njihovoj hemijskoj strukturi takođe postoje razlike i u njihovoj hidrofilnosti. Tako npr. HLB vrednost parcijalnih estara alkanola i masnih kiselina zavisi od broja slobodnih i esterifikovanih –OH grupa [189]. Takođe je pokazano i da stepen esterifikacije lipida ima bitan uticaj na veličinu mikroemulzije oblasti [74, 190, 191]. Stoga, kako bi se prevazišla inherentno slaba rastvorljivost šećerne glave APG u ulju, neophodna je upotreba hidrofilnijeg ulja, čije molekule mogu lako da se umetnu između ugljovodoničnih lanaca surfaktanta. Iz tih razloga je mikroemulziona oblast formirana primenom hidrofilnijeg ulja (I988) bila veća u odnosu na C90. Ovakav rezultat navodi na zaključak da estri propilenglikola obrazuju mikroemulzije sisteme u užem području nego odgovarajući estri glicerola. Uzimajući u razmatranje da je sadržaj monoglicerida u I988 45-58%, dok su u C90 uglavnom prisutni monoestri ($\geq 90\%$), pretpostavlja se da bi ova razlika bila još više izražena ukoliko bi se poredile samo monoestarske frakcije ulja. Ovaj podatak je veoma interesantan, uzimajući u obzir da, prema našim saznanjima, fazno ponašanje surfaktanata zasnovanih na šećerima u zavisnosti od tipa alkanola u strukturi ulja do sada nije proučavano.



Slika 4.1. Pseudoternarni fazni dijagrami za sistem ulje/decil-glukozid (P2000)-propilenglikol (PG)/visokoprečišćena voda, koristeći kao ulje: Capryol™90 (C90), Imwitor 988® (I988), Imwitor® 742 (I742), pri molarnom odnosu S-CoS 1:1 (stvarni odnos 0,53:1)

Nadalje, kada je I988 zamenjen glicerol-monokaprilat/kapratom (I742), uočeno je diskretno sužavanje mikroemulzione oblasti. S obzirom da obe vrste ulja sadrže prema specifikaciji sličan udeo mono-, di- i triglicerida, može se izvesti zaključak da upotreba monoglicerida sa kraćim ugljovodoničnim lancem obezbeđuje veći stepen inkorporiranja vode. Dobijeni rezultati su u skladu sa ranijim zapažanjima da je solubilizacioni kapacitet surfaktanata za vodu veći kada se u formulaciji mikroemulzija koriste ulja niže molekulske mase (sa kraćim ugljovodoničnim lancima ili sa nižim stepenom esterifikacije) [48, 192]. U skladu sa ovim trendom, povećavajući stepen esterifikacije alkanola, sposobnost P2000 da obrazuje mikroemulzije je dramatično opala tako da je jednofazni, izotropni region potpuno izostao u slučaju primene srednjelančanih triglicerida i propilenglikol-dikaprilat/kaprata, čak i pri veoma visokom sadržaju surfaktanta i kosurfaktanta.

Ovaj fenomen može da se pripíše previše velikim molekulima pomenutih ulja, koja ne mogu da se umetnu i interpenetriraju u međufazni film koji obrazuju surfaktant i kosurfaktant.

Analizirajući dobijene rezultate u ovoj fazi, može se zaključiti da samo estri masnih kiselina koji sadrže slobodne hidroksilne grupe u kombinaciji sa P2000 i propilenglikol mogu da potpomognu formiranje mikroemulzija, dok manje polarna ulja, velikih molekulskih masa, nisu pogodna za te svrhe. Glavni kriterijum za selekciju ulja bi, prema tome, bio prisustvo slobodnih – OH grupa u strukturi, što povećava njegovu hidrofilitnost, i što je prepoznato kao jedan od odlučujućih faktora za razvoj mikroemulzija zasnovanih na APG surfaktantima.

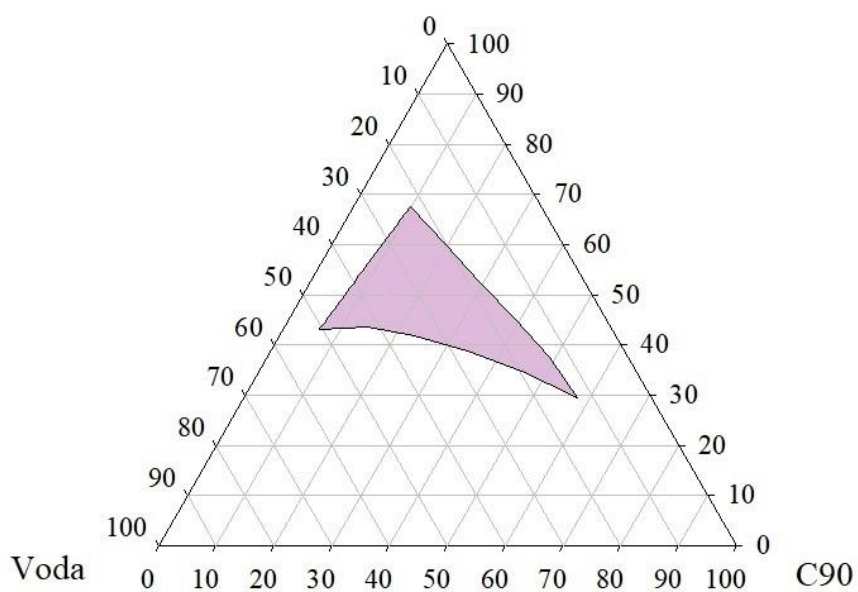
4.1.1.2. Uticaj vrste APG na formiranje mikroemulzija u pseudoternarnom sistemu Capryol™ 90/APG-propilenglikol/voda

U ovom delu istraživanja, proučen je uticaj vrste APG na potencijal za formiranje mikroemulzija u sistemu C90/APG-propilenglikol/voda, pri čemu su kao APG korišćeni decilglukozid (P2000) i kaprilil/kapril-glukozid (P810). Kao što je poznato, komercijalno dostupni APG predstavljaju kompleksne smeše jedinjenja sa različitom dužinom ugljovodoničnog lanca, stepenom polimerizacije (glikozidacije) i stereohemije, zbog čega je njihovo fazno ponašanje takođe veoma složeno i zavisi od osobina kako polarnog, tako i nepolarnog dela molekule [193]. Ove činjenice su ujedno i razlog otežanog poređenja faznog ponašanja različitih proizvoda iz kategorije APG.

Pseudoternarni fazni dijagrami dobijeni upotrebom P2000 i P810 u smeši sa C90, propilenglikolom i visokoprečišćenom vodom su prikazani na Slici 4.2. Može se zapaziti da je fazno ponašanje P2000 i P810 različito, što je u skladu sa rezultatima dobijenim za druge APG [44, 52]. Mikroemulziona oblast se smanjivala sa povećanjem dužine alkil lanca u molekuli APG, te je korišćenje P810 obezbedilo formiranje mikroemulzija u širem opsegu udela sastojaka. Ovime su potvrđena ranija zapažanja da sa porastom dužine ugljovodoničnog lanca surfaktanata na bazi šećera dolazi do redukcije njihovog kapaciteta za emulgovanje vode [30, 194]. Verovatno sa povećanjem dužine alkil lanca dolazi do promena u načinu pakovanja surfaktanta i kosurfaktanta na međufazi ulja i vode, fleksibilnost međufaznog filma stoga postaje rigidnija i manje fleksibilna, što dovodi do vidljivih razlika na pseudoternarnim dijagramima. Iako je slično ponašanje uočeno kod saharoznih estara [30, 194], treba da se naglasi da su pomenuti surfaktanti imali iste vrednosti HLB. Stoga, u slučaju surfaktanata koji su proučavani u ovom delu rada, dobijene razlike mogu da se pripišu ne samo razlikama u dužini alkil lanaca, nego i njihovim različitim HLB vrednostima (P2000 ima HLB oko 13, dok je HLB vrednost za P810 15-16), koje su određene dužinom ugljovodoničnog lanca, stepenom polimerizacije i stereohemijskom čistoćom ispitivanih APG [44, 51, 52]. Primera radi, povećanjem broja šećernih jedinica u molekuli (stepena polimerizacije), APG postaju značajno hidrofilinije i manje rastvorljive u uljanoj fazi. Međutim, oba ispitivana surfaktanta su imala isti prosečni stepen polimerizacije (1,5) i može se zaključiti da ovaj parametar nije imao uticaja na njihovo različito ponašanje u pseudoternarnim smešama. Međutim, ono što ne sme da se zanemari je činjenica da P2000 i P810 kao komercijalni proizvodi sadrže različit udeo aktivnog sastojka (surfaktanta) (53% i 63,5% za P2000 i P810, respektivno), što je verovatno, zajedno sa uticajem dužine alkil lanca u molekuli, bilo presudno za povećanu ukupnu jednofaznu površinu na pseudoternarnom faznom dijagramu dobijenom korišćenjem P810.

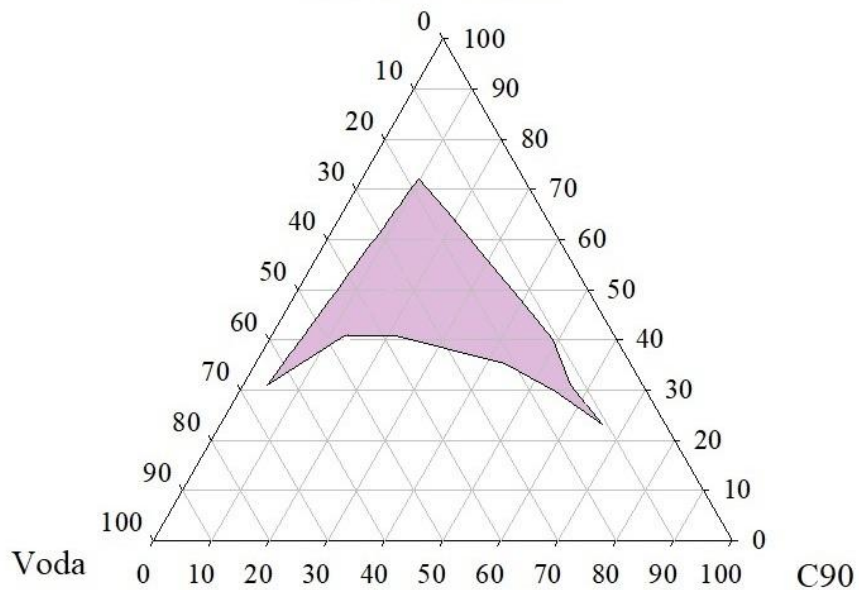
a)

P2000:PG = 0,53:1



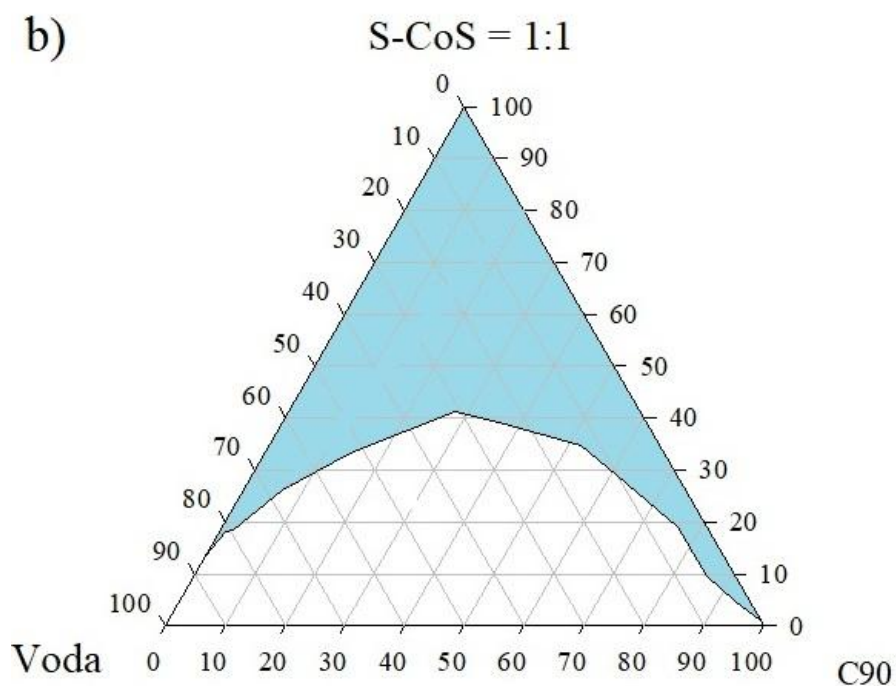
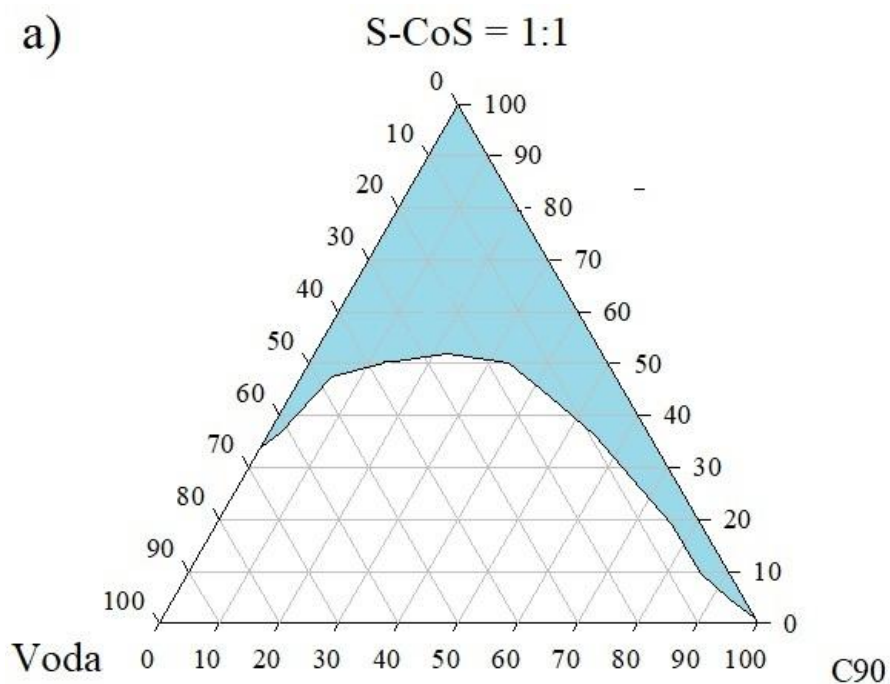
b)

P810:PG = 0,635:1



Slika 4.2. Pseudoternarni fazni dijagrami za sistem CapryolTM 90/APG-propilenglikol (PG)/visokoprečišćena voda, koristeći kao APG: a) Plantacare[®] 2000 UP (P2000) i b) Plantacare[®] 810 UP (P810), pri molarnom odnosu S-CoS 1:1 (stvarni odnos 0,53:1 i 0,635:1, respektivno)

4.1.1.3. Procena efikasnosti gliceret-7-kaprilat/kaprata (Emanon® EV-E) u formiranju mikroemulzija u pseudoternarnom sistemu Capryol™ 90/polietoksilovani surfaktant-Transcutol® P/voda



Slika 4.3. Pseudoternarni fazni dijagrami za sistem Capryol™ 90/polietoksilovani surfaktant-Transcutol® P/visokoprečišćena voda, koristeći kao surfaktant: a) Emanon® EV-E i b) polisorbit 80, pri molarnom odnosu S-CoS 1:1

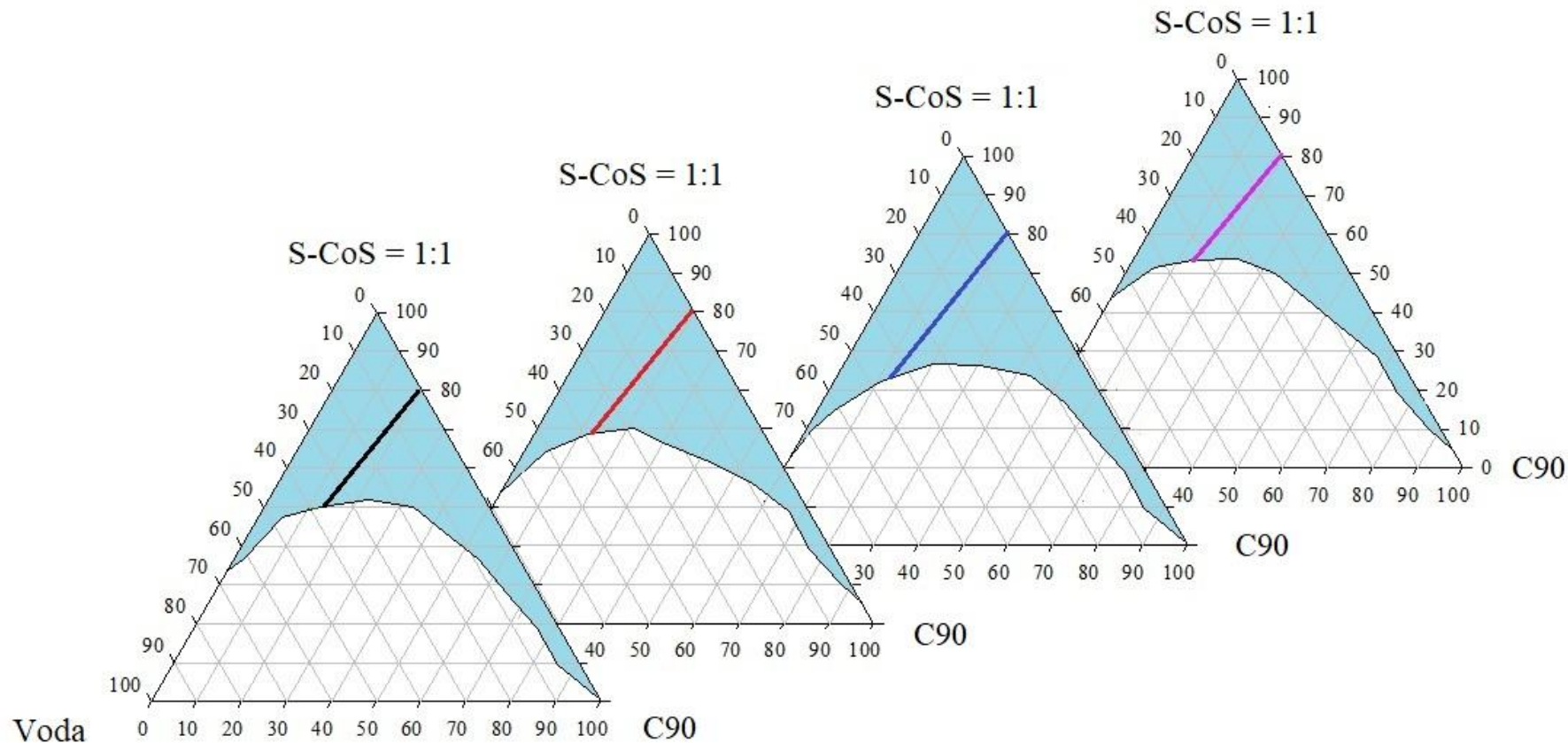
Preliminarna procena retko korišćenog etoksilovanog surfaktanta u smislu njegove sposobnosti za formiranje mikroemulzija je izvršena u sistemu C90/polietoksilovani surfaktant-Transcutol® P/voda. Kao referentni surfaktant je korišćen polisorbit 80 (P80), koji se veoma često upotrebljava za stabilizaciju farmaceutskih mikroemulzija za dermalnu primenu i koji je pokazao dobru funkcionalnost u njihovoj formulaciji [31]. Iako se u velikom broju istraživanja polioksetilen(glicerol) estri masnih kiselina koriste kao stabilizatori u formulaciji mikroemulzija [16], prema dosadašnjim saznanjima, još uvek nema nijednog primera korišćenja Emanon®-a EV-E (EV) u te svrhe. EV je surfaktant koji se dobija iz sirovina biljnog porekla, koji je okarakterisan kao biodegradabilan surfaktant, niske toksičnosti i kao „prijatelj-prirode“. Sadrži visok udeo monoestara u smeši, bez prisustva rastvarača (100% aktivan). Rastvorljiv je u vodi i ima visoku HLB vrednost (~ 17). Koristi se u kozmetičkim proizvodima za kosu i kožu. Međutim, kako bi se razvile farmaceutski prihvatljive mikroemulzije, studije njegovog faznog ponašanja su jedan od osnovnih preduslova.

Slika 4.3. prikazuje pseudoternarne fazne dijagrame sistema C90/polietoksilovani surfaktant-Transcutol® P/voda. Odnos S-CoS je tokom čitavog eksperimenta imao vrednost 1:1. Na slici se jasno vidi da je između ispitivanih surfaktanata prisutna razlika. Pokazalo se da P80 ima veći kapacitet za vezivanje vode u kombinaciji sa C90 i korišćenim kosurfaktantom u poređenju sa EV. Veća ukupna jednofazna oblast na dijagramu postignuta upotrebom P80 se može objasniti na bazi veličine hidrofilnih i lipofilnih grupa u strukturi ispitivanih surfaktanata, kao i njihovom vrednošću HLB (17 i 15 za EV i P80, respektivno). Naime, ranije je demonstrirano da, ukoliko su hidrofilne glave i/ili lipofilni alkil lanci veći, u slučaju alkil polioksietilena se može očekivati širi mikroemulzioni region [195]. Interesantno, ovaj trend se razlikuje kod APG surfaktanata, gdje je uočeno smanjenje širine mikroemulzione oblasti sa povećanjem ugljovodoničnog lanca u strukturi surfaktanta. Međutim, u slučaju ispitivanih APG nije postojala razlika u veličini i strukturi hidrofilnih glava, dok u slučaju EV i P80 ta razlika postoji, paralelno sa različitom strukturom lipofilnih delova, što je razlog za različite vrednosti HLB. Kako bi se omogućio nastanak mikroemulzija u što širem opsegu udela sastojaka, nije dovoljno samo odabrati optimalnu smešu S-CoS, nego i koristiti odgovarajuće ulje kojim bi se obezbedio odgovarajući način pakovanja molekula amfifila na međupovršinu ulja i vode [30].

4.1.1.4. Procena efikasnosti gliceret-7-kaprilat/kaprata (Emanon® EV-E) u formiranju mikroemulzija u pseudoternarnom sistemu Capryol™ 90/Emanon® EV-E:kosurfaktant/voda

Kako bi se dobio dublji uvid u efikasnost EV da obrazuje mikroemulzije, i kako bi se ispitalo kako vrsta kosurfaktanta utiče na fleksibilnost/rigidnost međupovršinskog filma, samim tim i na fazno ponašanje i veličinu jednofaznog regiona, osim Transcutol®-a P, varirana su još četiri kosurfaktanta koja se često koriste za stabilizaciju biokompatibilnih mikroemulzija: etanol, izopropanol, propilenglikol i glicerol.

Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 4.4. Treba da se naglasi da je dodatno ispitana i mogućnost obrazovanja mikroemulzija bez upotrebe kosurfaktanta i da je pokazano da je se pod takvim uslovima mikroemulzioni sistemi mogu obrazovati pri visokim odnosima S-CoS:ulje (9:1 i 8:2) (podaci nisu prikazani). Maksimalna količina vode koja se mogla inkorporirati u sistem duž dilucione linije 8:2 je bila 16,67%, dok je inicijalna smeša S-CoS:ulje = 9:1 mogla beskonačno da se razblažuje. Međutim, uvođenjem kosurfaktanata u sistem došlo je do povećanja ukupne jednofazne oblasti na pseudoternarnim dijagramima. Upotrebljeni kosurfaktanti su imali različit uticaj na kapacitet EV/kosurfaktant smeše za simultanu solubilizaciju uljane i vodene faze. Kao što je očekivano, maksimalno inkorporiranje vode je dostignuto pri veoma niskom udelu ulja i naglo se smanjivalo sa povećanjem sadržaja ulja. Izvan jednofaznih oblasti su se obrazovale grube emulzije.



Slika 4.4. Pseudoternarni fazni dijagrami za sistem CapryolTM 90/ Emanon[®] EV-E:kosurfaktant /visokoprečišćena voda, koristeći kao kosurfaktant: Transcutol[®] P, etanol, izopropanol i propilenglikol (posmatrajući s leva na desno), pri molarnom odnosu S-CoS 1:1 (obojena linija na dijagramu predstavlja liniju razblaženja duž koje je vršena strukturalna karakterizacija uzoraka)

Poredeći efekte ispitivanih kosurfaktanata, najuža oblast u kojoj se formiraju mikroemulzije je dobijena korišćenjem propilenglikola. Interesantno je da glicerol nije bio pogodan kosurfaktant za obrazovanje jednofaznih izotropnih sistema u kombinaciji sa EV i C90. Upotreba izopropanola se pokazala superiornom u odnosu na ostale kosurfaktante jer je on verovatno bio najbolje raspoređen između alkil lanaca ulja i surfaktanta, povećavajući međupovršinsku fleksibilnost i čineći međupovršinu manje osetljivom na razblaživanje vodom. Dakle, može se zaključiti da je sa povećanjem dužine lanca alkohola (od etanola do izopropanola) došlo do povećanja mikroemulzione oblasti, dok je sa povećanjem broja hidroksilnih grupa od izopropanola do propilenglikola uočen suprotan efekat. Dalji porast broja -OH grupa (glicerol) je rezultovao u potpunom izostanku mikroemulzionog regiona, što je u saglasnosti sa ranijim rezultatima dobijenim sa P80 i lecitinom kao surfaktantima [29, 61, 196]. Fazno ponašanje EV u prisustvu različitih kratkolančanih kosurfaktanata zavisi od njihove polarnosti/amfifilnosti koje određuju način na koji se oni raspoređuju u pseudoternarnom sistemu između uljane i vodene faze, utičući na ravnotežu između hidrofilnih i lipofilnih delova međupovršine [197]. Zbog toga se dobijeni rezultati mogu dovesti u korelaciju sa particionim koeficijentima korišćenih kosurfaktanata koji predstavljaju meru njihove polarnosti, što zauzvrat određuje mesto njihove solubilizacije u složenom sistemu. Zaista, najpolarniji kosurfaktant (glicerol, $\log P = -1,76$) nije bio efikasan u formiranju mikroemulzija, dok je izopropanol kao najmanje polaran kosurfaktant ($\log P = 0,05$) formirao mikroemulzije u najširem opsegu koncentracija korišćenih sastojaka. Prema tome, manje polarni kosurfaktanti, poput izopropanola, se orjentišu između molekula surfaktanta tako da su njihove hidroksilne grupe okrenute prema vodenoj fazi, što dovodi do povećanja međusobne rastvorljivosti ulja i vode. Nasuprot tome, polarniji kosurfaktanti sa većim brojem hidroksilnih grupa u strukturi (propilenglikol i glicerol) verovatno migriraju sa međupovršine u vodenu fazu. Kao rezultat, koncentracija amfifila na međupovršinskom filmu se smanjuje dodatkom vode u sistem, što vodi ka njegovoj destabilizaciji. Nadalje, iako je u strukturi etanola i izopropanola podjednak broj slobodnih hidroksilnih grupa, nešto manja ukupna jednofazna površina je obrazovana upotrebom etanola, što se takođe može objasniti na temelju veće polarnosti etanola ($\log P = -0,31$). Konačno, smanjenje mikroemulzione oblasti koje je zabeleženo kada je ulogu kosurfaktanta preuzeo Transcutol[®] P umesto kratkolančanih alkohola je takođe posledica njegove veće polarnosti. Osim toga, u odnosu na Transcutol[®] P, viša polarnost propilenglikola ($\log P = -0,92$) je uzrok njegove veće rastvorljivosti u vodenoj fazi i smanjene efikasnosti u formulaciji mikroemulzija.

Dobijeni rezultati u ovoj i prethodnoj fazi eksperimentalnog rada su nedvosmisleno dokazali da retko i nedovoljno korišćeni nejonski biokompatibilni surfaktant Emanon[®] EV-E (gliceret-7-kaprilat/kaprat), visoke HLB vrednosti, može da se uključi na listu polietoksilovanih surfaktanata sposobnih da obrazuju mikroemulzije u kombinaciji sa različitim sastojcima, i u širokim opsezima njihovih koncentracija. Takođe se čini da je formulacija mikroemulzija primenom polietoksilovanog surfaktanta manje zahtevna u odnosu na formulaciju emulzionih sistema submikronskih dimenzija sa ispitivanim APG u prve dve faze ovog poglavlja. Ovo se uglavnom može pripisati činjenici da su APG na tržištu uglavnom prisutni u obliku smeša sa značajnim udelom vode, te je u inicijalnim smešama ulja, surfaktanta i kosurfaktanta već prisutna voda, a mikroemulzija je obrazovana i bez daljeg dodatka vode. Ovo značajno doprinosi i otežavanju ispitivanja njihovog faznog ponašanja i poređenja njihove efikasnosti u odnosu na druge surfaktante.

4.1.2. Ispitivanje rastvorljivosti model lekovitih supstanci u sastojcima mikroemulzija

Rezultati ispitivanja rastvorljivosti ADA i SN u vodi, propilenglikol-monokaprilatu, surfaktantima, kosurfaktantima i njihovim smešama je prikazana u Tabeli 4.1.

Rastvorljivost oba ispitivana leka u vodi je bila niska što je u skladu sa njihovom visokom lipofilnošću. Generalno, rastvorljivost SN je bila viša u svim sastojcima mikroemulzija (osim vode)

u odnosu na rastvorljivost ADA, što je prema fizičko-hemijskim osobinama ovih lekovitih supstanci i očekivano (Tabela 1.6. i Tabela 1.7). Kada je reč o rastvorljivosti SN u površinski aktivnim supstancama, kao najbolji solubilizator se pokazao EV, a najniža rastvorljivost je dobijena u APG. Verovatni razlog za ovo bi mogao biti to što je zbog visokog viskoziteta dostupnog proizvoda pri ispitivanju korišćena smeša P2000 i P810 sa vodom (u molarnom odnosu 1:1). Međutim, uprkos visokoj rastvorljivosti SN u propilenglikolu, smeša APG sa ovim kosurfaktantom je pokazala nizak kapacitet za rastvaranje SN, što zajedno sa rastvorljivošću u smeši vode i APG, može da ukaže na nisku inherentnu rastvorljivost SN u ovoj grupi tenzida. Nasuprot tome, SN je u uljanoj fazi (C90) mikroemulzija pokazao sličnu rastvorljivost kao u EV, što se može objasniti površinskom aktivnošću koju C90 ispoljava [198]. Rastvorljivost SN u kosurfaktantima je značajno varirala i kretala se od $3,23 \pm 0,06$ u izopropanolu do $44,68 \pm 1,82$ u Transcutol[®]-u P. Takođe, i rastvorljivost ADA je bila najveća u Transcutol[®]-u P među ispitivanim kosurfaktantima. Međutim, za razliku od SN, APG su se pokazali kao pogodniji surfaktanti za rastvaranje ADA u poređenju sa polietoksilovanima, naročito P80. Na osnovu dobijenih rezultata za rastvorljivost SN i ADA u sastojcima potencijalnih nosača za njihovu primenu na koži se može pretpostaviti moguća raspodela lekova u mikroemulzijama. Tako bi bilo očekivano da se SN raspodeljuje između međupovršinskog filma amfifila i uljane faze, dok ADA ima veću rastvorljivost u PAM, te će verovatno biti u najvećoj meri solubilizovan na međupovršini između uljane i vodene faze.

Tabela 4.1. Rastvorljivost SN i ADA u sastojcima mikroemulzija*

	Sastojak mikroemulzije	Rastvorljivost SN (mg/ml \pm SD)	Rastvorljivost ADA (mg/ml \pm SD)
Surfaktant/ smeša S-CoS	P2000 ^{1,2} :voda = 0,36:1	2,9 \pm 0,04	1,92 \pm 0,07
	P810 ^{1,2} :voda = 0,46:1	3,77 \pm 0,07	2,79 \pm 0,05
	P2000 ¹ :PG = 0,53:1	10,91 \pm 0,15	9,7 \pm 0,43
	P810 ¹ :PG = 0,635:1	11,68 \pm 0,28	16,81 \pm 0,82
	EV	54,68 \pm 3,36	8,79 \pm 0,12
	P80	25,47 \pm 0,74	2,00 \pm 0,04
Ulje	C90	46,26 \pm 1,18	0,75 \pm 0,02
Kosurfaktant	Transcutol [®] P	44,68 \pm 1,82	2,1 \pm 0,03
	Propilenglikol	40,21 \pm 0,92	0,4 \pm 0,02
	Etanol	13,81 \pm 0,18	0,18 \pm 0,06
	Izopropanol	3,23 \pm 0,06	0,18 \pm 0,02
Vodena faza	Visokoprečišćena voda	0,02 \pm 0,004	0,09 \pm 0,01

* Ispitivanje rastvorljivosti lekova nije vršeno u Imwitor[®]-u 988 i Imwitor[®]-u 742 zbog njihove pastozne konzistencije na sobnoj temperaturi

¹ Samo aktivna supstanca; ² 50%-tni rastvor u vodi

Imajući u vidu prethodno navedene podatke, za ispitivanje kapaciteta mikroemulzija za solubilizaciju ADA su odabrani sistemi zasnovani na APG, te dva sistema koja sadrže polietoksilovane surfaktante u kombinaciji sa Transcutol[®]-om P kao kosurfaktantom. Sa druge strane, kako bi se ispitao uticaj vrste kosurfaktanta na kapacitet mikroemulzija koje su stabilizovane EV surfaktantom za solubilizaciju lekovite supstance, SN je poslužio kao model lek. Dodatno, sa ciljem utvrđivanja korelacije rastvorljivosti leka u sastojcima mikroemulzija i kapaciteta nosača za solubilizaciju, testirane su i mikroemulzije sa APG kao potencijalni nosači za SN. Na ovaj način je ispitana validnost tvrdnje da kapacitet nosača za solubilizaciju lekovite supstance često nije direktno povezan sa njenom rastvorljivošću u sastojcima nosača.

4.1.3. Određivanje kapaciteta mikroemulzija za solubilizaciju model lekovitih supstanci – selekcija nosača za dermalnu primenu SN i ADA

Za ispitivanje solubilizacionog kapaciteta mikroemulzija za model lekovite supstance izabrana je diluciona linija S-CoS:ulje = 8:2, bez obzira na kvalitativni sastav formulacija. Razlog za to je što je u većini sistema na ovoj dilucionoju liniji solubilizacija vode bila neznatno manja u odnosu na liniju 9:1, a primarni cilj je bio da se količina surfaktanta u finalnim formulacijama snizi kako bi se povećala njihova biokompatibilnost [156, 195, 199]. Osim toga, pokazano je da maksimalna penetracija leka u kožu i fluks leka često nisu postignuti primenom formulacija koje su imale najveći sadržaj surfaktanta [16, 18, 69, 199].

Ispitivanjem mogućnosti rastvaranja SN (2% m/m) u sistemima C90/EV-kosurfaktant/voda duž dilucione linije 8:2 je pokazan sličan solubilizacioni kapacitet svih sistema, bez obzira na vrstu korišćenog kosurfaktanta. Mogućnost rastvaranja SN se smanjivala kako je u sistemima rasla koncentracija vode iznad 30% (m/m), što je praćeno pojavom precipitata. Kako se progresivno povećavala količina vode, došlo je do simultnog pada koncentracije amfifila i ulja, zbog čega je očekivano pao kapacitet za rastvaranje relativno visoke količine leka. Prilikom razblaživanja smeša ulje/S-CoS dolazi do progresivne hidratacije molekula surfaktanta/kosurfaktanta što dovodi do istiskivanja leka sa međupovršine. Kako se paralelno sa ovim snižava i koncentracija ulja u koje bi se SN raspodelio, dolazi do njegove precipitacije. Ono što nije bilo očekivano je pojava turbiditeta do koje je došlo u sistemu sa propilenglikolom kao kosurfaktantom, uprkos potpunom rastvaranju leka u vehikulumu sa 30% vode. Moguće je da je prisustvo SN na međupovršini u ovom sistemu dovelo do potiskivanja surfaktanta u vodenu fazu, što je uzrokovalo destabilizaciju sistema i sužavanje mikroemulzione oblasti. Ne treba da se zanemari ni činjenica da je SN elektrolit i da prisustvo nitratih anjona u vodenoj fazi utiče na njenu jonsku jačinu, što takođe može da ograniči oblast formiranja mikroemulzija [177].

Pokušaji rastvaranja ADA u koncentraciji od 0,1% (m/m) u mikroemulzijama izrađenim sa C90, EV, Transcutol[®] P i voda pokazali da nosači sa više od 30% (m/m) vode takođe nisu odgovarajući za ovaj lek. Ovo je veoma interesantan podatak, imajući u vidu različitu strukturu, fizičko-hemijske osobine, i rastvorljivost model lekova u sastojcima ovog sistema (Tabela 4.1), kao i to da je terapijska koncentracija ADA 20 puta niža nego koncentracija SN. Čini se da je ovakav rezultat posledica manje rastvorljivosti ADA u pojedinačnim komponentama mikroemulzije koja je kompenzovana nižom terapijskom koncentracijom. Sa druge strane, iako SN ima daleko veću rastvorljivost u C90, EV i Transcutol[®]-u P, njegova viša terapijska koncentracija je ograničila kapacitet nosača za rastvaranje.

Prilikom ispitivanja kapaciteta mikroemulzija stabilizovanih APG za rastvaranje ADA i SN dobijeni su takođe interesantni i različiti podaci. Naime, u sistemima ulje/APG-propilenglikol/voda, rastvaranje ADA je bilo moguće i u inicijalnim smešama ulje/S-CoS, a kako je razblaživanje vodom napredovalo, solubilizacioni kapacitet sistema se nije menjao. Bilo bi logično da se pretpostavi da su ovi rezultati posledica ne samo bolje rastvorljivosti ADA u APG nego u EV, nego visokih vrednosti pH koje su prevashodno prouzrokovane prisustvom samih APG surfaktanata. Naime, rastvorljivost ADA kao slabe kiseline je pH-zavisna i biće veća kada se on nađe u baznoj sredini, koja je karakteristična za korišćene APG surfaktanta (Tabela 3.1). Sa druge strane, pokušaji da se 2% (m/m) SN rastvori u bilo kojem sistemu zasnovanom na ovim prirodnim surfaktantima su bili bezuspešni, što se može pripisati njegovoj niskoj rastvorljivosti u ovoj vrsti tenzida (Tabela 4.1), visokoj terapijskoj koncentraciji leka u baznoj sredini, koja nije odgovarajuća za sertakonazol kao slabu bazu.

Na osnovu rezultata ove faze istraživanja izvršena je selekcija finalnih vehikuluma kao nosača za lokalnu primenu SN i ADA (Tabela 4.2 i Tabela 4.3), čija je sveobuhvatna karakterizacija izvršena u nastavku eksperimenata u okviru ove doktorske disertacije.

Tabela 4.2. Sastav mikroemulzionih nosača za SN (% , m/m)

Formulacija	ME-EVT	ME-EVE	ME-EVI	ME-EVPG	ME-P80T
Capryol TM 90	14,0	14,0	14,0	15,0	14,0
Emanon EV-E	28,0	28,0	28,0	30,0	-
Polisorbat 80	-	-	-	-	28,0
Transcutol [®] P	28,0	-	-	-	28,0
Etanol	-	28,0	-	-	-
Izopropanol	-	-	28,0	28,0	-
Propilenglikol	-	-	-	30,0	-
Visokoprečišćena voda	30,0	30,0	30,0	25,0	30,0
Rastvorljivost SN (mg/ml ± SD)	60,70 ± 6,98	28,05 ± 2,00	29,88 ± 2,36	47,80 ± 3,63	42,20 ± 0,03

S obzirom da je maksimalna količina vode koja se mogla dodati u smešu C90, P2000 i propilenglikola bila oko 33% (m/m), kao nosač za ADA je izabrana mikroemulzija sa 25% (m/m) dodane vode (što ukupno čini 39,2% (m/m) vode u sistemu). Kako bi se procenio uticaj vrste ulja na karakteristike mikroemulzija, selektovane su dve formulacije istog kvantitativnog sastava u kojima je C90 zamenjen sa I988 i I742. U cilju ispitivanja uticaja vrste surfaktanta na dermalnu isporuku ADA, odabrana je mikroemulzija zasnovana na P810 i C90 koja sadrži gotovo identičan udeo sastojaka kao ostale formulacije (Tabela 4.3). Dodatno, vehikulum koji sadrži C90, EV, Transcutol[®] P i 30% (m/m) vode je odabran kao nosač za obe model lekovite supstance (Tabela 4.2 i Tabela 4.3). Pomenuta mikroemulzija je ispitivana kao nosač za lokalnu primenu SN pored još dve formulacije istog kvantitativnog sastava koje kao kosurfaktant sadrže etanol, odnosno izopropanol. Iako je rastvaranje SN bilo moguće u vehikulumu sa propilenglikolom sa istim udelom sastojaka, zbog pojave turbiditeta i destabilizacije sistema, odabrana je formulacija sa nešto manjom količinom vode. Konačno, kao referentna mikroemulzija, koja je služila za poređenje efekta vrste polietoksilovanog surfaktanta na isporuku SN u/kroz kožu, je korišćena formulacija zasnovana na P80 (Tabela 4.2).

Tabela 4.3. Sastav mikroemulzionih nosača za ADA (% , m/m)

Formulation	APG-1	APG-2	APG-3	APG-4	ME-EVT
Capryol TM 90	15,0	-	-	14,0	14,0
Imwitor [®] 988	-	15,0	-	-	-
Imwitor [®] 742	-	-	15,0	-	-
Plantacare [®] 2000 UP	15,9	15,9	15,9	-	-
Plantacare [®] 810 UP	-	-	-	17,8	-
Emanon EV-E	-	-	-	-	28,0
Propilenglikol	30,0	30,0	30,0	28,0	-
Transcutol [®] P	-	-	-	-	28,0
Visokoprečišćena voda	39,1	39,1	39,1	40,2	30,0

4.1.4. Strukturna karakterizacija odabranih mikroemulzionih formulacija kao nosača za model lekovite supstance

Kvalitativni i kvantitativni sastav mikroemulziona formulacije određuje njenu unutrašnju strukturu, fizičko-hemijske karakteristike, oblik i veličinu kapi, što se sve skupa odražava na lokalizaciju leka u nosaču i njegovu „sudbinu“ nakon primene na/u određeno mesto ljudskog tela [55, 69, 77]. Kada je reč o dermalnoj isporuci leka, lekovita supstanca mora da se oslobodi iz nosača kako bi penetrirala u određene slojeve kože. Sa druge strane, proces liberacije je zavisn od

karakteristika mikrosredine u koju je lek inkorporiran (fizičko-hemijske osobine, dinamika fluktuacija, interakcija leka sa nosačem) [200]. Međutim, iako se na osnovu pseudoternarnih faznih dijagrama za određeni sistem mogu dobiti pretpostavke o mogućnosti obrazovanja vehikuluma sa različitom unutrašnjom strukturom (Slika 1.5), pouzdani zaključci ne mogu da se izvedu bez sveobuhvatne strukturne karakterizacije koja je sprovedena u ovoj fazi istraživanja. S obzirom da su električna provodljivost, reološke karakteristike i termalno ponašanje karakteristike koje su uslovljene unutrašnjom strukturom sistema koja se menja sa promenama koncentracije sastojaka, upravo ove metode se mogu koristiti za određivanje koloidne strukture sistema na indirektnan način.

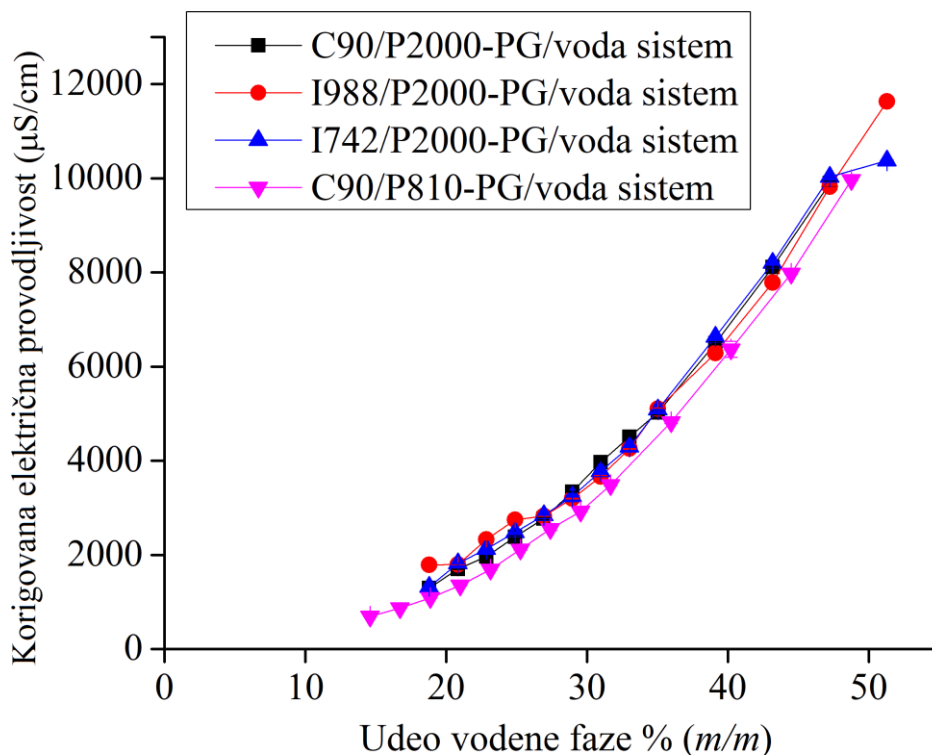
4.1.4.1. Merenje električne provodljivosti

Merenje električne provodljivosti u pseudoternarnim sistemima ulje/APG-propilenglikol/voda

Električna provodljivost (κ) je merena u funkciji udela vode (Φ_w) u sistemima ulje/APG-propilenglikol/voda duž dilucione linije S-CoS:ulje = 8:2. Kao što je na više mesta već pomenuto, APG koji su korišćeni u okviru ove doktorske disertacije su komercijalno dostupni kao smeše surfaktanata i vode. Stoga varijacije u sastavu formulacije duž dilucione linije prouzrokuju promene u broju molekula surfaktanta, a time i broj nosilaca naelektrisanja, što se takođe odražava na promene vrednosti κ . Iz tog razloga je uobičajeno da se u slučajevima korišćenja surfaktanata koji se ne sastoje iz čistog surfaktanta, nego pored PAM sadrže i rastvarače, κ vrednost koriguje deljenjem sa udelom čistog surfaktanta u sistemu, što rezultuje u korigovanoj κ (κ_a) [45, 188]. κ_a vrednost u funkciji frakcije vode (suma dodane vode i količine vode koja je već prisutna u APG) je prikazana na Slici 4.5. Očigledno je da je κ_a kontinuirano rasla sa povećanjem udela vode, bez obzira na vrstu korišćenog surfaktanta (P2000 ili P810) i vrstu ulja (C90, I988 ili I742). Objašnjenje za ovo je progresivna hidratacija hidrofилnih glava surfaktanta i hidroksilnih grupa kosurfaktanta. Pri nižim frakcijama vodene faze, porast κ_a u funkciji sadržaja vode je kod svih sistema bio postepen. Sa daljim dodatkom vode, porast električne provodljivosti je bio brži, ukazujući na porast interakcija između vodenih kapi. Ovakav trend se nastavio do postizanja maksimalne vrednosti κ_a , nakon čega je došlo do destabilizacije i zamućenja sistema zbog zasićenja hidrofилnih delova molekula surfaktanta i kosurfaktanta vodom. Jedini sistem kod kojeg se konduktometrijski profil u završnom delu krive razlikovao je I742/P2000-propilenglikol/voda, gde je nakon dostizanja maksimuma provodljivosti došlo do ponovnog postepenog porasta κ_a . Za analizu i interpretaciju konduktometrijskih krivih, u svrhu objašnjenja fenomena faznih prelaza, uobičajeno se koristi perkolaciona teorija [201]. Prema ovom pristupu, provodljivost ima niske vrednosti (ispod električne provodljivosti upotrebene vodene faze) pri niskim koncentracijama vode jer su kapi vode dispergovane u uljanoj fazi V/U mikroemulzija i ne doprinose značajno porastu vrednosti κ zbog nemogućnosti provođenja jona. Početni porast provodljivosti je uzrokovan hidratacijom hidrofилnih grupa amfifila. Međutim, nakon dostizanja kritične vrednosti Φ_w neke od dispergovanih vodenih kapi počinju međusobno da interaguju i spajaju se u klastere koji indukuju obrazovanje konduktivnih kanala odgovornih za naglo povećanje κ sa daljim povećanjem koncentracije vode u sistemu. Upravo koncentracija vodene faze pri kojoj se povećanje provodljivosti naglo menja, tj. porast provodljivosti postaje nagao zbog prelaza vodene faze iz unutrašnje prema spoljašnjoj fazi, se označava kao perkolacioni prag (Φ_p) [73, 77, 202].

Posmatrajući dobijene profile električne provodljivosti (Slika 4.5), udeo vode pri kojoj dolazi do nagle promene vrednosti κ_a ne može jasno da se uoči zbog čega tačna promena strukture sistema, ukoliko je do nje došlo, ne može lako da se identifikuje. Slična zapažanja su zabeležena pri ranijim ispitivanjima faznih prelaza u mikroemulzijama zasnovanim na APG [36, 48]. Kako bi se dalje procenila validnost perkolacione teorije i rasvetlio položaj perkolacionog praga, koristi se prvi izvod $d\log(\kappa_a)/d\Phi_w$ u funkciji Φ_w . Prisustvo oštrog pika na grafiku zavisnosti $d\log(\kappa_a)/d\Phi_w$ od Φ_w ukazuje na perkolaciono ponašanje sistema, a prema položaju pika se određuje Φ_w koja odgovara perkolacionom pragu Φ_p [77, 194, 201, 202]. Međutim, ni analiza ovih krivih nije otkrila perkolaciono ponašanje mikroemulzionih sistema sa APG surfaktantima i prelaz iz V/U do

bikontinuiranih mikroemulzija duž dilucione linije S-CoS:ulje = 8:2 (podaci nisu prikazani). Ovaj fenomen je na neki način bio i očekivan, uzimajući u obzir da mikroemulzije sa manje od 18,8% (m/m), odnosno 14,6% (m/m) vode u sistemima sa P2000 i P810, respektivno, nisu mogle da budu pripremljene. Kao rezultat toga, početni deo profila provodljivosti nedostaje. Stoga je vrlo izvesno da je perkolacija već dostignuta u uzorcima bez dodane vode, jer oni sadrže vodu prisutnu u ispitivanim surfaktantima. Dakle, mikroemulzije bez eksterno dodane vode su *per se* već mogle da sadrže dovoljnu koncentraciju vode za obrazovanje bikontinuirane unutrašnje strukture. Ovakvo ponašanje je bilo karakteristično i za druge surfaktante koji su dostupni u obliku smeša sa vodom [36, 188].



Slika 4.5. Korigovana vrednost električne provodljivosti (κ_a) u funkciji rastućeg udela visokoprečišćene vode (Φ_w) za sistem ulje/APG-propilenglikol (PG)/visokoprečišćena voda, pri odnosu S-CoS/uljana faza 8:2

Ipak, bez obzira što se primenom perkolacione teorije nisu mogli detektovati perkolacioni pragovi u sistemima, promene u porastu provodljivosti nisu rasle linearno sa porastom Φ_w , na dobijenim graficima se mogu uočiti delovi krivih sa različitim nagibima. Međutim, uprkos sličnom trendu porasta provodljivosti kod svih ispitivanih sistema zasnovanih na APG, koji sugeriše istovetnu promenu strukture sistema bez obzira na kvalitativni sastav sistema, nešto drugačiji profil provodljivosti je dobijen za sistem zasnovan na P810 što može da se dovede u vezu sa nešto kraćim alkil lancem i većim procentom PAM kod ovog surfaktanta. Naime, u sistemima ulje/P2000-propilenglikol/voda, porast vrednosti κ_a je postepen pri udelima vode nižim od 30% (m/m) bez obzira na vrstu uljane faze. Nakon daljeg dodavanja vode, dolazi do bržeg porasta κ_a , a potom do gubitka stabilnosti sistema, što se u sistemu C90/P2000-propilenglikol/voda desilo pri nižim vrednostima Φ_w u odnosu na sisteme sa monogliceridima. Slična destabilizacija sistema sa porastom lipofilnosti sastojaka u sistemu je uočena i ranije [48]. Jedini sistem u kojem je κ_a dostigla relativno konstantnu vrednost pri koncentraciji vode višoj od 45% (m/m) je pseudoternarni sistem I742/P2000-propilenglikol/voda, sugerišući potpuno razvijenu U/V strukturu. Sa druge strane, u

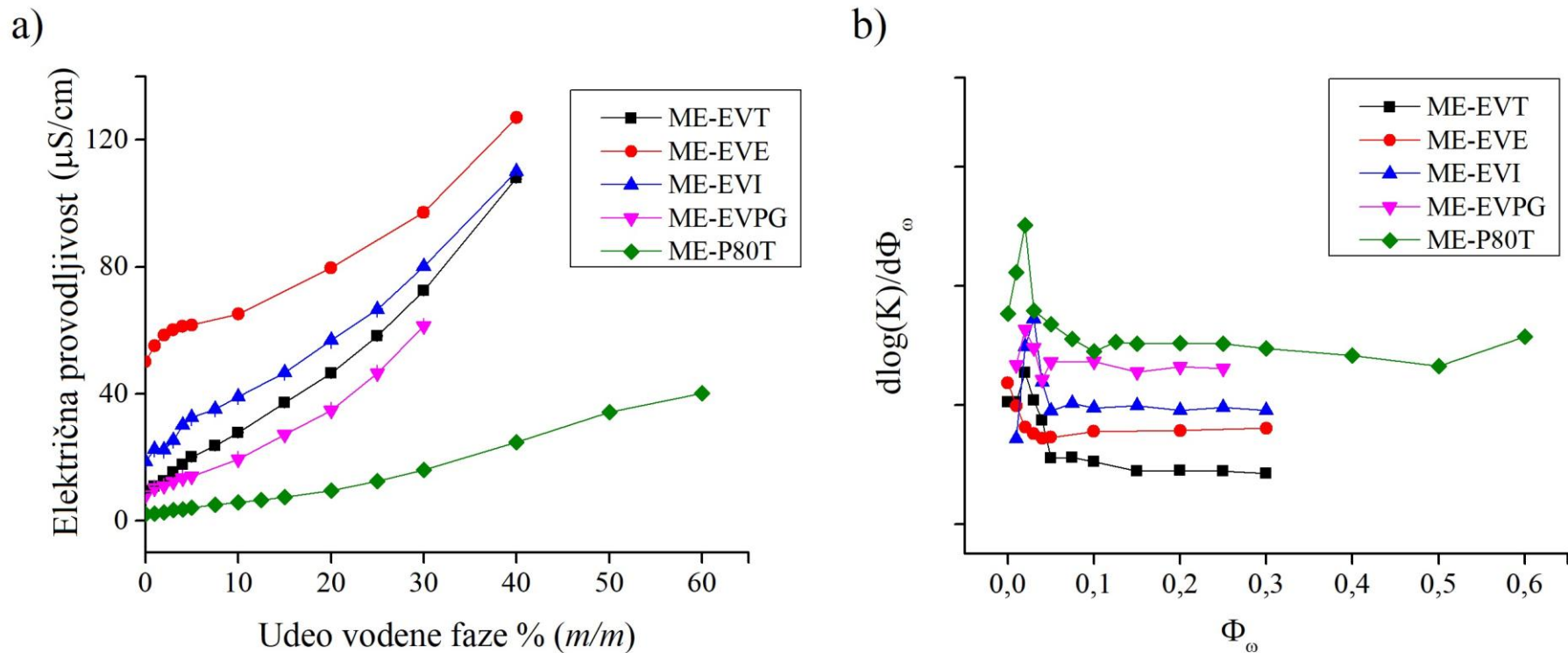
sistemu C90/P810- propilenglikol/voda konduktometrijska kriva može da se podeli na tri dela sa različitim nagibima, koji mogu da se povežu sa postojanjem tri vrste sistema različite koloidne strukture. Prvi region koji može da se uoči pri koncentraciji vode nižoj od 20% (m/m) je veoma uzak i karakterišu ga niže vrednosti κ_a , koje mogu da se odnose na mikroemulzije V/U. Pri udelu vode od 20% do ~ 32% (m/m) porast provodljivosti je bio nešto brži i može da bude povezan sa kompletno razvijenom bikontinuiranom strukturom, dok je skokoviti porast κ_a iznad 32% (m/m) vode mogao da implicira izmenu strukture ka U/V mikroemulzijama. Ipak, naglašene promene u nagibima profila provodljivosti ne mogu da se uoče, te se u trećem regionu (kada je $\Phi_w > 32\%$, m/m) može pretpostaviti samo početak prelaza iz bikontinuiranih ka U/V mikroemulzijama [48]. Dakle, u trećem regionu još uvek nisu u potpunosti razvijene U/V mikroemulzije, nego pre sistemi sa invertnom bikontinuiranom strukturom.

Dobijeni rezultati ukazuju da APG nisu pogodni surfaktanti za formulaciju V/U mikroemulzija, što se može pripisati prisustvu značajne količine vode u surfaktantima dostupnim na tržištu. Zbog toga što su promene nagiba konduktometrijskih krivih teže uočljive, ali dobijene vrednosti provodljivosti visoke, V/U mikrostruktura može da se isključi u sistemima zasnovanim na P2000, što ne može u potpunosti da se tvrdi za sistem sa P810. Takođe, uzorci sa višim frakcijama vodene faze (iznad ~30%, m/m) u svim sistemima, koji se nalaze na uzlaznim delovima konduktometrijskih krivih (gde se nalaze i izabrani nosači za ADA (Tabela 4.3)) mogu da se okarakterišu kao hidrofилne mikroemulzije sa invertnom bikontinuiranom do U/V strukturom [36, 48, 188].

Merenje električne provodljivosti u pseudoternarnim sistemima Capryol™ 90/polietoksilovani surfaktant-kosurfaktant/voda

Zavisnost električne provodljivosti (κ) od udela vode (Φ_w) za sisteme Capryol™ 90/polietoksilovani surfaktant-kosurfaktant/voda duž dilucione linije S-CoS:ulje = 8:2 je prikazan na Slici 4.6. Kao što se može primetiti, za ispitivane sisteme koji sadrže manje od 10% (m/m) vode su izmerene niske vrednosti κ . Sa daljim dodatkom vode do maksimalne količine koja se mogla solubilizovati, provodljivost je rasla i dostigla takođe maksimalne vrednosti. Međutim, analiza konduktometrijskih krivih dobijenih korišćenjem polietoksilovanih surfaktanata nije pokazala tipično perkolativno ponašanje, bar ne u sistemima u kojima su kao kosurfaktanti korišćeni kratkolančani alkoholi i propilenglikol. Dakle, slično ponašanju sistema sa APG, tačne tačke u kojima se odigravaju mikrostrukturni prelazi iz V/U u U/V mikroemulzije preko bikontinuiranih sistema nisu lako uočljive. Međutim, za razliku od APG, primenom metode prvog izvoda $d\log(\kappa)/d\Phi_w$ u funkciji Φ_w , potvrđeno je perkolaciono ponašanje sistema sa EV i P80 (Slika 4.6. b). Fazni prelaz se u svim sistemima odigrao pri relativno niskim vrednostima Φ_w . Zapravo, posmatrajući pseudoternarni sistem koji je stabilizovan etanolom kao kosurfaktantom, čini se da je bikontinuirana struktura obrazovana samim mešanjem ulja sa smešom S-CoS, što se može objasniti prisustvom rezidualne vode u etanolu (96%, V/V). Kako je maksimum krive $d\log(\kappa)/d\Phi_w$ u zavisnosti od Φ_w zabeležen pri udelu dodane vode od 0%, fazni prelaz se već desio ili se završavao u ovoj tački.

Nasuprot tome, u ostalim ispitivanim mikroemulzionim sistemima perkolacija je potvrđena izraženim oštrim pikovima maksimalnih vrednosti dobijenih krivih (Slika 4.6.b). Pikovi su uočeni pri koncentraciji vode od 2%, 2,5% i 3%, u sistemima sa EV kostabilizovanim propilenglikolom, Transcutol®-om P i izopropanolom. U saglasnosti sa studijama faznog ponašanja, polarniji kosurfaktanti su manje solubilizovani na međupovršini, redukujući jačinu sila koje stabilizuju međupovršinski film i međukapljične interakcije. Kao rezultat toga, perkolacioni prag se lakše dostiže.



Slika 4.6. a) Vrednost električne provodljivosti (κ) u funkciji rastućeg udela visokoprečišćene vode (Φ_w) za sisteme C90/polietoksilovani surfaktant-kosurfaktant/visokoprečišćena voda, pri odnosu S-CoS/uljana faza 8:2; b) prvi izvod vrednosti κ u funkciji rastućeg udela vodene faze (Φ_w)

Posmatrajući paralelno sisteme koji se razikuju samo po vrsti surfaktanta (EV i P80), dobijeni su slični rezultati (Slika 4.6). Mikrostrukturni prelaz u sistemu zasnovanom na P80 je takođe realizovan pri niskom udelu vode (2%, m/m), ukazujući na sličnu prirodu promena koje se odigravaju u sistemu bez obzira na njegov sastav.

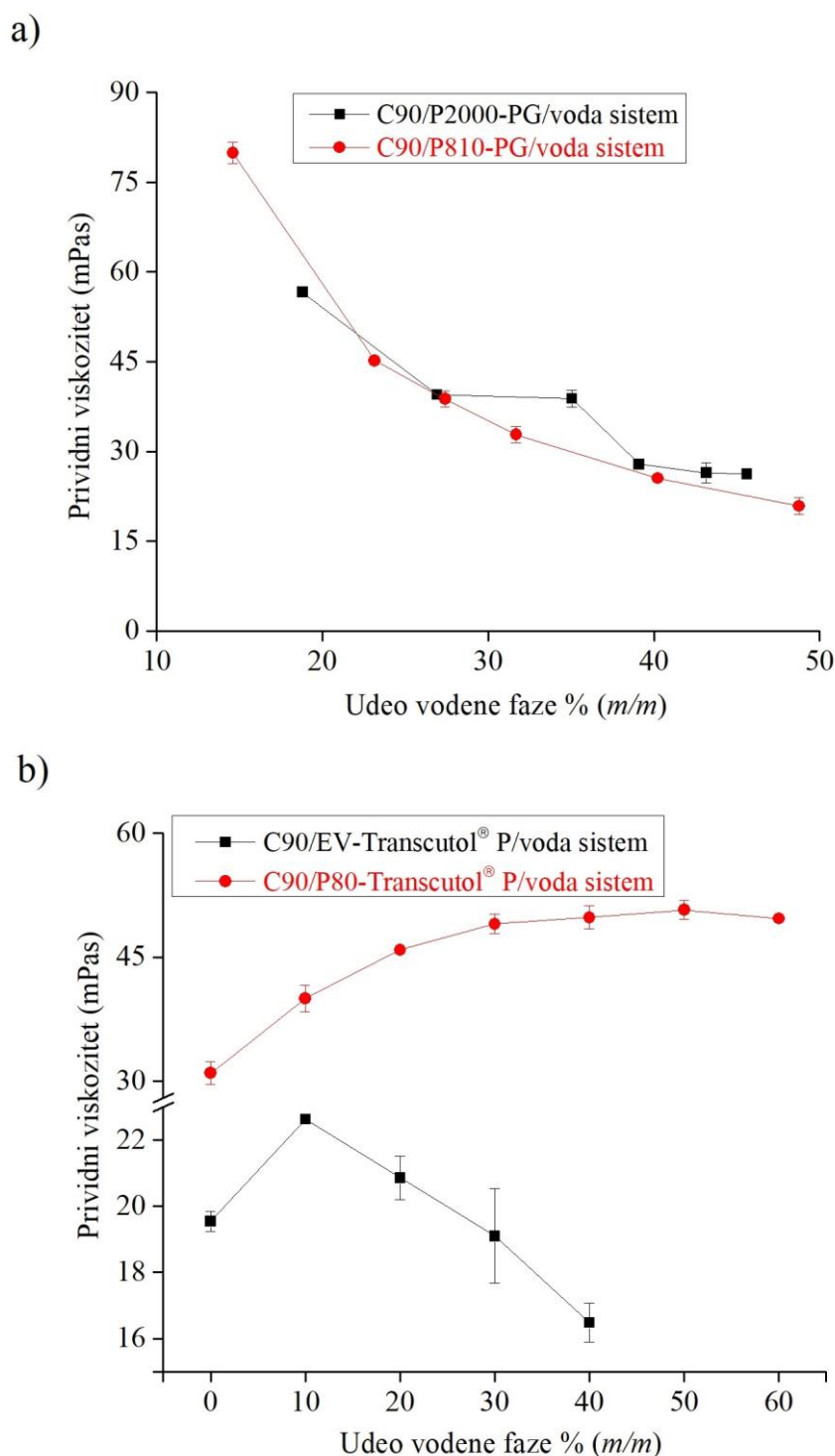
Na osnovu dobijenih rezultata ove faze se može izvesti zaključak da je korišćenjem EV moguće formulisati mikroemulzije sa V/U mikrostrukturom, kao i vehikulume bikontinuirane strukture, koji se obrazuju u širem opsegu koncentracija sastojaka. Postojanje potpuno razvijenih kapljičnih U/V nije očekivano, bar ne prema rezultatima merenja električne provodljivosti, jer na dobijenim konduktometrijskim profilima ne može da se uoči region u kome se dostižu relativno konstantne vrednosti κ ili njihov pad, koji su karakteristični za ovaj tip koloidne strukture mikroemulzija.

Dakle, za odabrane nosače za SN (Tabela 4.2) se može na osnovu ovoga pretpostaviti bikontinuirana unutrašnja struktura, što je generalno prepoznato kao povoljna karakteristika nosača za lipofilni lek kojom se penetracija/permeacija leka može poboljšati u većoj meri u odnosu na kapljične mikroemulzije zbog većeg stepena amfifilnosti, nižeg međupovršinskog napona, velike međupovršine i visokog solubilizacionog kapaciteta [203].

4.1.4.2. Reološka merenja

Imajući u vidu da vrsta i oblik agregata, koncentracija i interakcije između dispergovanih kapi u mikroemulzijama snažno utiču na reološke karakteristike ovih sistema, reološka merenja su vršena kako bi se potvrdili rezultati dobijeni merenjem električne provodljivosti i kako bi se prikupili dodatni podaci o strukturnim transformacijama u odabranim sistemima. Zbog sličnosti profila električne provodljivosti za sve sisteme zasnovane na APG, odnosno na EV, u ovoj fazi eksperimentalnog rada je mogućnost detekcije faznih prelaza pomoću reološke karakterizacije ispitana na sistemima C90/APG-propilenglikol/voda i C90/polietoksilovani surfaktant-Transcutol[®] P/voda. Zavisnost prividnog viskoziteta (η) od koncentracije vodene faze (Φ_w) u uzorcima duž dilucione linije S-CoS:ulje = 8:2 je prikazana na Slici 4.7. Treba da se napomene da je prilikom prikazivanja rezultata reoloških merenja za sisteme koji sadrže APG prikazan stvarni udeo vode u uzorcima, a ne frakcija dodane vode, zbog čega i početni deo krivih nedostaje.

Očigledno je da je reološko ponašanje mikroemulzija zasnovanih na APG drugačije u odnosu na polietoksilovane surfaktante. Zapravo dobijeni profili reoloških merenja se razlikuju od profila u obliku grbe kamile (engl. *camel-hump*) sa dva maksimuma ili zvonastog oblika (engl. *bell-shaped*) sa jednim maksimumom, koji se uobičajeno susreću u literaturi pri ovakvim ispitivanjima [204-207]. Ipak, ne sme da se zanemari činjenica da je izmenjen profil viskoziteta posledica nemogućnosti formulisanja mikroemulzija sa nižim udelom vode zbog korišćenja APG u obliku vodenih rastvora. Međutim, dobijeni rezultati su slični ponašanju mikroemulzionih sistema zasnovanih na saharoznim estrima [30] i takođe drugim APG [36]. Kao što je prikazano na Slici 4.7.a, viskozitet APG-stabilizovanih mikroemulzija je opadao sa povećanjem udela vode u uzorcima duž ispitivane dilucione linije, verovatno zbog smanjenja agregacije micela usled razblaženja vodenom fazom. Simultano sa padom viskoziteta je opadala koncentracija propilenglikola i C90, što može biti još jedan razlog za ovakvo reološko ponašanje sistema, s obzirom da oba sastojka imaju veću vrednost η od vode (1 mPas) [36]. Međutim, kada je kao surfaktant korišćen P810, oštra promena vrednosti viskoziteta se može uočiti pri frakciji vode od 23,15% (m/m), dok je daljim dodatkom vode u sistem viskozitet opadao postepeno, verovatno zbog postepenog pomeranja molekula surfaktanta iz kontinuirane faze na međupovršinu kako bi interagovali sa vodom i uljem u bikontinuiranim mikroemulzijama [208]. Nagla promena nagiba krive viskoziteta koja je uočena u sistemu C90/P810-propilenglikol/voda može biti indikativna za fazne promene u posmatranom mikroemulzionom sistemu [199, 208, 209].



Slika 4.7. Vrednost prividnog viskoziteta u funkciji rastućeg udela visokoprečišćene vode (Φ_w) za sisteme: a) C90/APG-propilenglikol/visokoprečišćena voda i b) C90/polietoksilovani surfaktant-Transcutol® P/visokoprečišćena voda, pri odnosu S-CoS/uljana faza 8:2

Prema tome, dramatična promena u vrednosti η pri koncentraciji vode od 23,15% (m/m) ukazuje na promenu strukture iz V/U u bikontinuirane mikroemulzije, što je u korelaciji sa rezultatima električne provodljivosti. Sa druge strane, na grafiku koji se odnosi na sisteme koji sadrže P2000 mogu se uočiti tri regiona. Prvi deo dijagrama (gde je Φ_w između 18,8% i 26,9%, m/m) može označavati sisteme u kojima se dešava kraj faznog prelaza iz V/U u bikontinuirani tip mikremulzija, dok je u području koncentracije vode od 26,9% i 39,1% (m/m) bikontinuirana

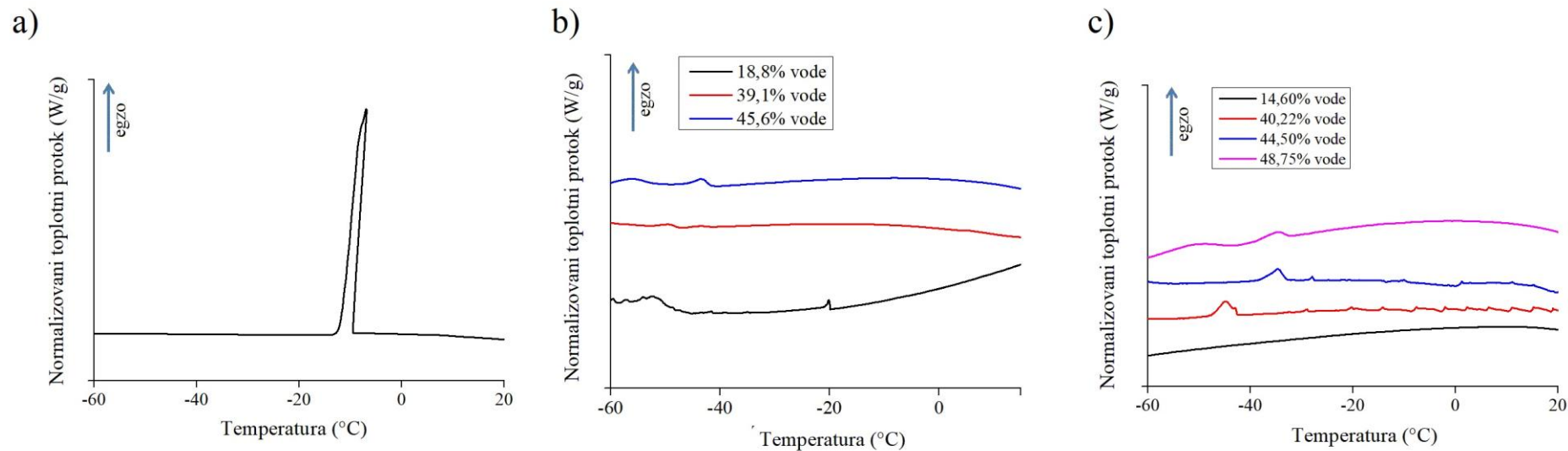
nanostuktura u potpunosti obrazovana. Pri vrednostima Φ_w višim od 39,1% (m/m), dolazi do postepene promene strukture bikontinuiranih mikroemulzija ka U/V sistemima, pri čemu U/V struktura još uvek nije u potpunosti razvijena. Slično reološko ponašanje je zabeleženo ranije u sistemu voda-propilenglikol/saharoza-laurat/ulje pepermint-a-etanol [210].

Interesantno je da je reološko ponašanje vehikuluma pripremljenih upotrebom polietoksilovanih surfaktanata bilo različito u odnosu na ponašanje APG (Slika 4.7.b). Dok je kod APG sa povećanjem udela vode viskozitet opadao, u slučaju EV i polisorbata je uočena suprotna tendencija – porast viskoziteta sa porastom Φ_w . Osim toga, razlike su zabeležene i među sistemima stabilizovanim različitim polietoksilovanim surfaktantima. Pri koncentraciji vode ispod 10% (m/m) viskozitet je rastao paralelno sa povećanjem Φ_w . Ovo inicijalno povećanje η može da se objasni privlačnim silama između kapi vode i njihovom agregacijom, što dovodi do reorganizacije molekula na međupovršinskom filmu [211]. Zapravo, prelaz iz V/U nanostrukture sa sferičnim kapima ka bikontinuiranoj praćen je dostizanjem maksimalne vrednosti prividnog viskoziteta u sistemu, paralelno sa drastičnom promenom električne provodljivosti [209, 211]. Stoga, dobijeni rezultati su sugerisali da se promena u bikontinuirane mikroemulzije iz V/U strukture desila pri udelu vode manjem od 10% (m/m) u oba sistema sa polietoksilovanim surfaktantima, što je u saglasnosti sa rezultatima merenja električne provodljivosti. Kako se Φ_w povećavao, viskozitet u vehikuluma pripremljenim sa EV se lagano smanjivao od 22,63 mPas do 16,48 mPas zbog postepenog povlačenja molekula surfaktanta iz kontinuirane faze na međupovršinu. Iznenadujuće, uzorci sa P80 su se odlikovali kontinuiranim sporim rastom viskoziteta sa daljom solubilizacijom vode. Vrednosti η vehikuluma sa koncentracijom vode od 20% do 50% (m/m) su bile relativno konstantne i nezavisne od Φ_w . Nakon toga je usledilo blago smanjenje viskoziteta do granice oblasti mikroemulzija. Iako nije uobičajen, sličan fenomen je dokumentovan ranije [201, 208], pri čemu je porast viskoziteta pri razblaživanju mikroemulzija vodom pripisan povećanju vodenih kanala u bikontinuiranim mikroemulzijama, prouzrokovanom povećanjem privlačnih sila između većih kapi dispergovane faze. Kako je udeo vode rastao, zbog progresivne hidratacije hidroksilnih grupa P80, kao i zbog interakcija između međusobno povezanih vodenih i uljanih kanala, maksimalna vrednost viskoziteta je dostignuta pri 50% (m/m) vode u sistemu. Analizirajući ove rezultate paralelno sa merenjem električne provodljivosti, nameće se zaključak da se početak faznog prelaza iz bikontinuiranih u U/V mikroemulzije u ovom sistemu desio kada je udeo vode bio 50% (m/m), dok V/U nanostruktura može da bude pretpostavljena za vehikulume sa manje od 10% (m/m) vode.

4.1.4.3. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

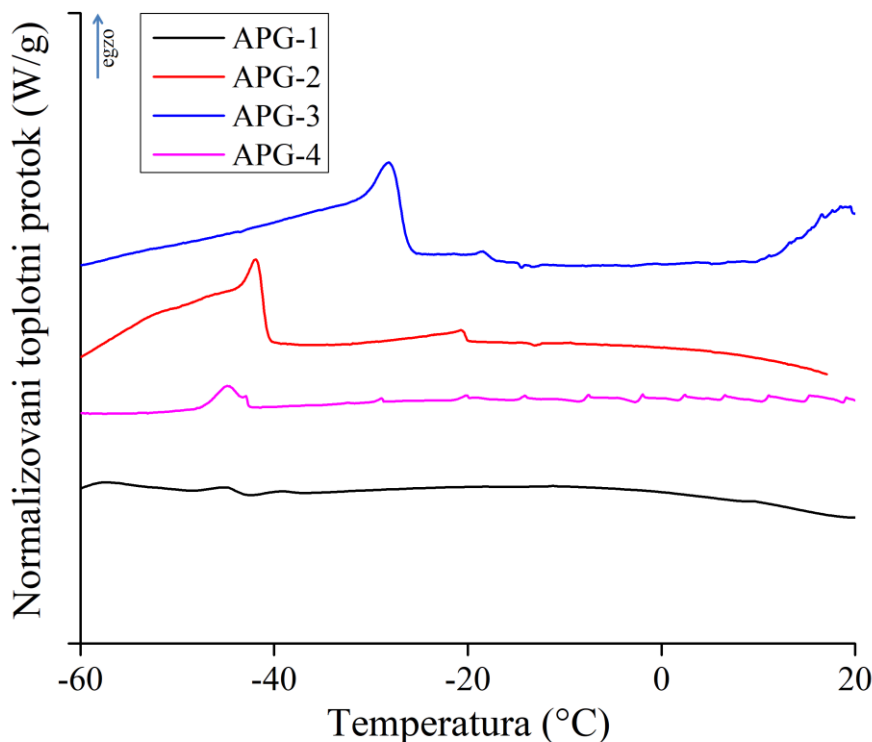
Dalja potvrda faznih prelaza u odabranim sistemima i mikrostruktura odabranih mikroemulzionih nosača je procenjena primenom DSC uz hlađenje uzoraka. Naime, ova metoda omogućuje identifikaciju fizičkog stanja vode u kojem ona može da bude prisutna unutar disperznog sistema. Ukoliko je voda vezana u sistemu (interaguje sa hidrofилnim delovima molekula surfaktanta i kosurfaktanta na međupovršini ili je imobilisana unutar kapi V/U mikroemulzija), njena temperatura zamrzavanja će biti pomešana prema nižim temperaturama. Sa druge strane, slobodnu (bulk) vodu čine molekuli koji su slabo vezani za međupovršinski film i zbog toga imaju slične osobine i visoku mobilnost kao čista voda čija je temperatura zamrzavanja oko 0 °C [36, 79]. Dakle, na osnovu izgleda, veličine i površine pika zamrzavanja vode, može da se proceni unutrašnja struktura mikroemulzija. Što je interakcija molekula vode sa sastojcima sistema jača, tačka smrzavanja vode se pomera ka nižim temperaturama [16, 45, 52].

U ovom delu ekperimentalnog rada je najpre ispitano ponašanje prilikom hlađenja mikroemulzija sa rastućim udelom visokoprečišćene vode u sistemima C90/APG-propilenglikol/voda i C90/polietoksilovani surfaktant-Transcutol® P/voda. Visokoprečišćena voda koja je korišćena za pripremu mikroemulzija je ispoljila oštar egzotermni pik na -6,92 °C (Slika 4.8a). DSC krive hlađenja u sistemima C90/APG-propilenglikol/voda su prikazane na Slici 4.8b i 4.8c.



Slika 4.8. DSC krive hlađenja: a) visokoprečiščene vode; b) sistema C90/P2000-propilenglikol/visokoprečiščena voda; i c) sistema C90/P810-propilenglikol/visokoprečiščena voda, pri odnosu S-CoS:uljana faza = 8:2

DSC analiza uzoraka stabilizovanih surfaktantom P810 je u korelaciji sa rezultatima merenja električne provodljivosti i reoloških merenja. Na DSC krivoj hlađenja uzorka u koji nije dodana voda eksterno (Slika 4.8c), ali koji zbog prirode surfaktanta sadrži 14,6% (m/m) vode, ne mogu da se detektuju pikovi, ukazujući na imobilisanu dispergovanu vodu ili veoma snažne interakcije između hidroksilnih grupa u sastavu APG i/ili propilenglikola, što pomera tačku smrzavanja vode ispod limita detekcije postavljenog u studiji. Širok egzotermni pik koji može da se uoči u uzorcima sa rastućim sadržajem vode u mikroemulzijama sa P810 može da bude indicacija za promenu strukture sistema iz V/U ka bikontinuiranim mikroemulzijama. Sličan pik može takođe da se zapazi u uzorku zasnovanom na P2000 koji sadrži maksimalnu količinu vode (45,6% m/m) (Slika 4.8b), što sugerise prisustvo vezane ili međupovršinske vode. Mikroemulzije sa nižim udelom vode u sistemu se odlikuju odsustvom pika na DSC termogramima. Zbog polarosti i prisustva hidroksilnih grupa u strukturi amfifila, voda verovatno snažno interaguje sa njima, pomerajući tačku zamrzavanja prema nižim temperaturama ili izvan opsega temperature postavljenog u eksperimentu [30, 209]. U sistemima zasnovanim na P810, sa povećanjem udela vode, pik zamrzavanja vode se pomerao ka višim temperaturama, ukazujući na progresivno slabljenje interakcija zbog zasićenja hidroksilnih grupa S-CoS. Ovakva vrsta pika može da se interpretira kao voda u bikontinuiranim mikroemulzijama [188, 209]. Međutim, ne sme da se zanemari činjenica da na rezultate DSC analize može da utiče i sam propilenglikol, s obzirom da je pokazano da se polioli koji su rastvorljivi u vodi ponašaju kao krioprotektivi [36, 45]. U literaturi su zabeleženi slučajevi odsustva DSC pikova zamrzavanja vode čak i uzorcima sa visokim sadržajem vode i propilenglikola, koji su okarakterisani kao U/V mikroemulzije [29]. Osim toga, C90 u svojoj strukturi sadrži slobodnu hidroksilnu grupu, te se u sistemima može pretpostaviti interakcija vode i uljane faze, kao i uljane faze i amfifila, što sve skupa može da utiče na termodinamičke osobine vode.



Slika 4.9. DSC krive hlađenja placebo uzoraka mikroemulzija zasnovanih na APG

Posmatrajući DSC termograme izabranih mikroemulzionih APG-nosača za ADA (Slika 4.9), svi uzorci su ispoljili širok egzotermni pik na temperaturi ispod $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kao što je već pomenuto, ovakav pik ukazuje na vezanu ili vodu prisutnu na međupovršini u ispitivanim sistemima. Sa druge strane, odsustvo oštrih pikova zamrzavanja vode sugeriše da unutrašnja struktura vehikuluma nije U/V. Manje izražen pik u slučaju APG-1 mikroemulzije navodi na zaključak da su u ovom pseudoternarnom sistemu interakcije vode sa ostalim konstituentima jače izražene. Kao rezultat takvih interakcija, termodinamička aktivnost vode i njena mobilnost se menjaju, što može da zamaskira pravu mikrostrukturu sistema, naročito u prisustvu propilenglikola, koji je poznat po svom kriptoprotektivnom efektu [212, 213].

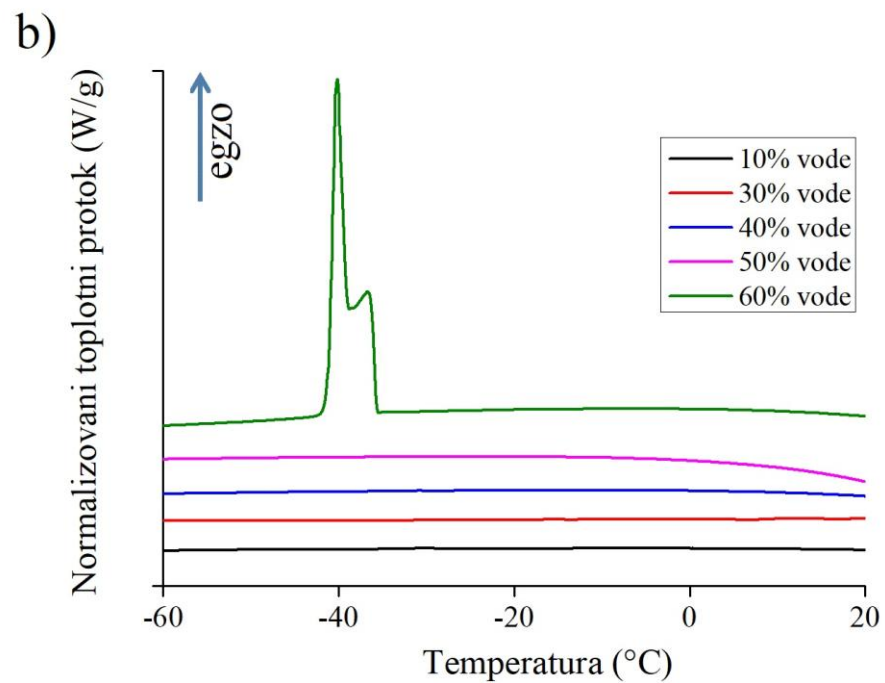
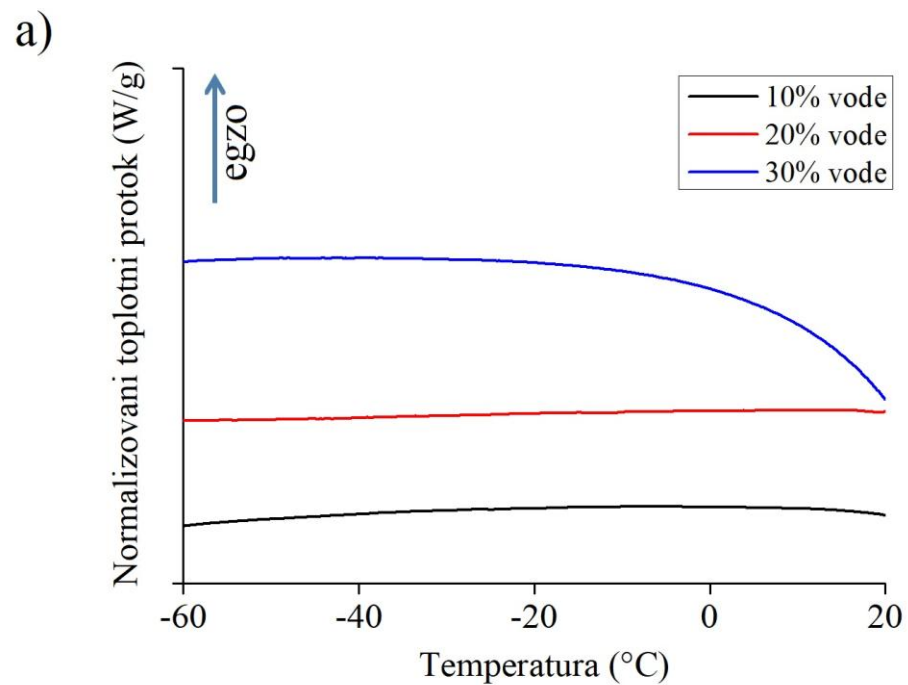
Zbog prethodno navedenih razloga, rezultati DSC analize treba da se tumače sa oprezom. Dakle, na osnovu DSC rezultata, V/U unutrašnja struktura može da se isključi za sve odabrane mikroemulzije, što potvrđuje ranije zaključke izvedene iz merenja električne provodljivosti i reoloških merenja. Zbog veoma naglašenih interakcija između vode i hidrofилnih grupa ostalih konstituenata sistema, za sve ispitivane uzorke se može pretpostaviti (invertna) bikontinuirana ka U/V mikrostruktura.

Poredeći termograme dobijene sa različitim uljima u mikroemulzijama, mogu da se uoče male razlike. Zaista, kada je propilenglikol-monokaprilat (C90 u APG-1 i APG-4) zamenjen monogliceridima (I988 i I742 u APG-2 i APG-3, respektivno), površina pika i entalpija u sistemu su porasle (Tabela 4.4), ukazujući na progresivno slabljenje interakcija i pomeranje vode ka spoljašnjoj fazi. Ovakvo ponašanje pri smrzavanju bi moglo da se objasni većim brojem hidrofилnih $-\text{OH}$ grupa u strukturi monoglicerida, što može da doprinese boljoj interpenetraciji ulja na hidrofилni deo međupovršinskog filma, potiskujući kompetitivno vodu prema spoljašnjoj fazi gdje je njena mobilnost veća. Takođe, niži viskozitet APG-1 i APG-4 uzoraka (pogledati Tabelu 4.7 u okviru rezultata druge faze eksperimentalnog rada) je možda pospešio pristup molekula vode međupovršini dovodeći do povećanog vezivanja vode za amfifilni film. Takođe, uprkos diskretnim razlikama u strukturi I742 i I988, pik smrzavanja vode se ranije pojavio u slučaju mikroemulzije sa uljem dužeg ugljovodoničnog lanca (APG-3). Ovakav rezultat se isto tako može objasniti većom hidrofилnošću I988 i njegovim povećanim kapacitetom za vezivanje vode.

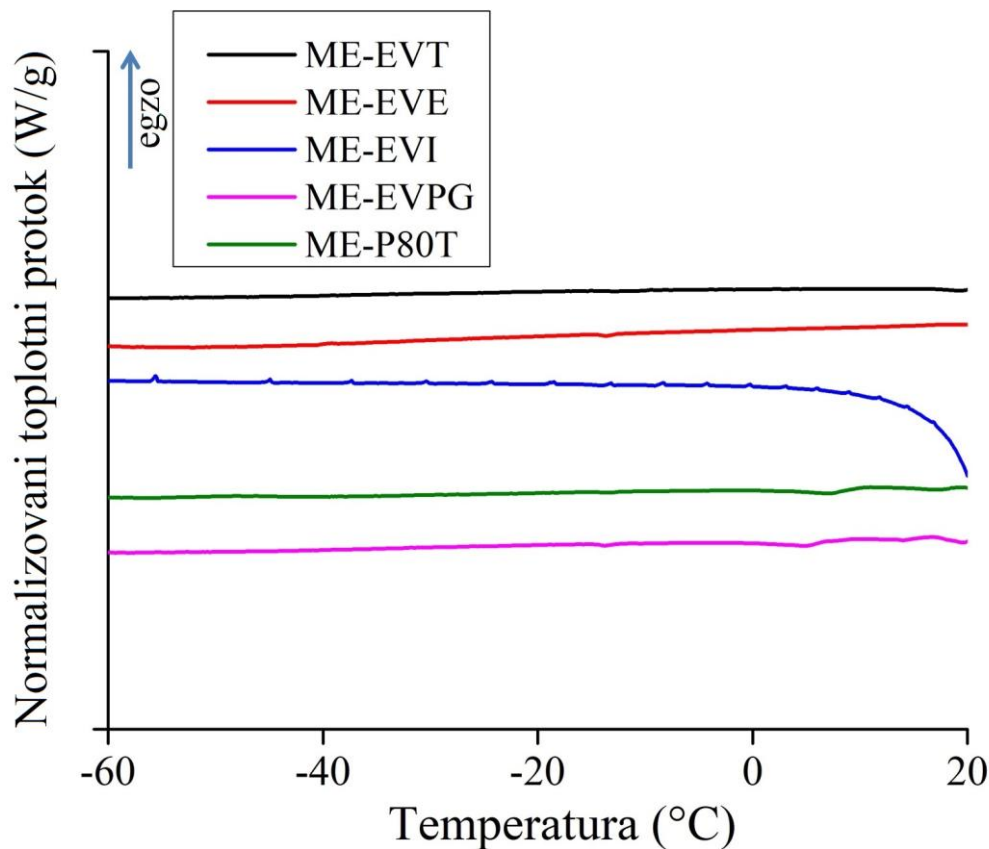
Tabela 4.4. Termodinamički parametri pika vodene faze za ispitivane mikroemulzije zasnovane na APG

	APG-1	APG-2	APG-3	APG-4
Entalpija (mJ/mg)	0,05	5,77	8,47	0,53
Onset ($^{\circ}\text{C}$)	-37,27	-40,63	-26,15	-42,55
Pik ($^{\circ}\text{C}$)	-39,39	-41,95	-28,20	-44,88

Nasuprot mikroemulzionih sistema zasnovanih na APG, krive hlađenja uzoraka zasnovanih na polietoksilovanim surfaktantima (Slika 4.10) nisu pokazale fenomene zamrzavanja ni u jednom uzorku koji sadrži EV, niti u uzorcima sa P80 koji sadrže vodu u količini 10-50% (*m/m*). Na osnovu toga bi bilo sasvim razumljivo da se svim pomenutim vehikuluma pripiše V/U mikrostruktura kod koje voda nije dostupna za zamrzavanje [55, 209]. Međutim, prisustvo slobodne, neinteragujuće vode u sistemu nije očekivano, uzimajući u obzir da ispitivane mikroemulzija sadrže veliku količinu amfifila i interakcije ne mogu da budu zanemarene. Najverovatnije je da se ove interakcije odvijaju preko vodoničnih veza između molekula vode i hidroksilnih grupa u sastavu EV i P80. Jedini uzorak koji je pokazao oštar pik na $-40,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ je mikroemulzija stabilizovana P80 koja u svom sastavu ima visoku koncentraciju vodene faze (60%, *m/m*) (Slika 4.10b). Kako je koncentracija S-CoS smanjena, vezivanje vode je postalo slabije zbog zasićenja amfifila vodom, te su molekuli vode mogli da migriraju ka spoljašnjoj fazi. Ovakva povećana mobilnost vode se manifestovala kao oštar pik koji odstupa od pika zabeleženog za čistu vodenu fazu (Slika 4.8a), što može da bude pokazatelj prelaza strukture sistema od bikontinuiranog ka U/V, kako je pretpostavljeno i na osnovu rezultata reoloških i merenja električne provodljivosti.



Slika 4.10. DSC krive hlađenja sistema: a) C90/EV-Transcutol[®] P/visokoprečiščena voda; i b) C90/P80-Transcutol[®] P/visokoprečiščena voda, pri odnosu S-CoS:uljana faza 8:2



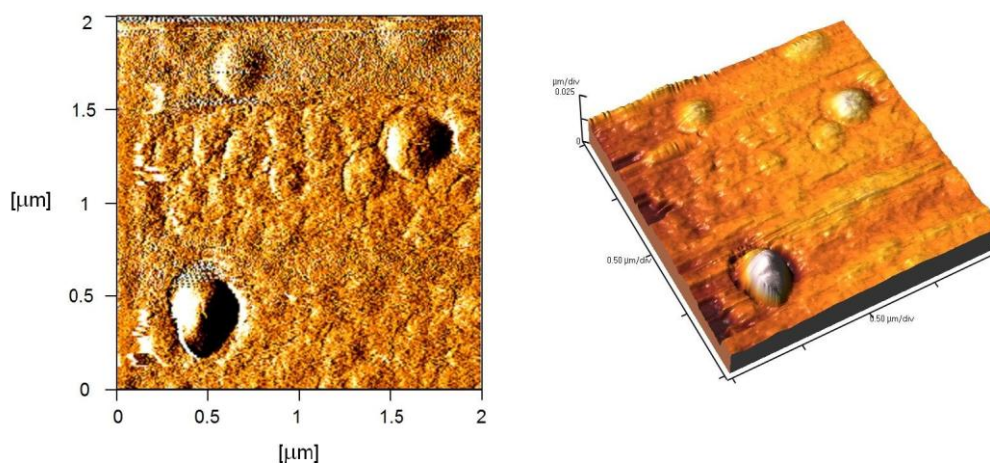
Slika 4.11. DSC krive hlađenja placebo uzoraka mikroemulzija zasnovanih na polietoksilovanim surfaktantima

Konačno, posmatrajući krive hlađenja uzoraka sa polietoksilovanim surfaktantima koji su odabrani kao nosači za SN i/ili ADA (Slika 4.11), može se zaključiti da je njihova unutrašnja struktura V/U. Međutim, uzrok za neslaganje ovih rezultata sa rezultatima indirektno karakterizacije strukture pomoću reoloških i konduktometrijskih merenja, treba tražiti ponovo u snažnim interakcijama u sistemu koje su pomerile tačku zamrzavanja vode izvan opsega definisanog eksperimentom. S obzirom na relativno visok udeo S-CoS, kao i ulja koje je površinski aktivno *per se*, sve molekule vode koje su eksterno dodane u inicijalne smeše amfifila i ulja su verovatno vodoničnim vezama u potpunosti vezane u sistemima.

4.1.4.4. Mikroskopija atomskih sila (AFM)

Mikroskopija atomskih sila je, iako dragocena, retko korišćena direktna tehnika za sticanje uvida u unutrašnju strukturu submikronskih koloidnih sistema. Primenom ove metode mogu se dobiti informacije o veličini kapi, distribuciji veličine kapi, morfologiji i mogućoj agregaciji u sistemu [214, 215].

Međutim, iako su za AFM analizu pripremljeni svi mikroemulzioni nosači za model lekovite supstance (Tabele 4.2 i 4.3), za većinu ovih uzoraka je ispitivanje bilo otežano, a kvalitet dobijenih mikrografija lošeg kvaliteta za pouzdanu interpretaciju. Na (ne)uspešnost eksperimenta nije uticao ni način pripreme uzoraka, koji je prepoznat kao važan korak u AFM ispitivanjima [30]. Bez obzira da li su uzorci sušeni u eksikatoru ili pod vakuumom, otklanjanje tečnosti iz uzoraka je bilo nepotpuno, što se može objasniti visokim tačkama isparavanja konstituenta sistema (poput ulja), prisutnih u relativno visokim koncentracijama.



Slika 4.12. AFM 2D signal greške i 3D topografija strukture uzorka ME-EVI

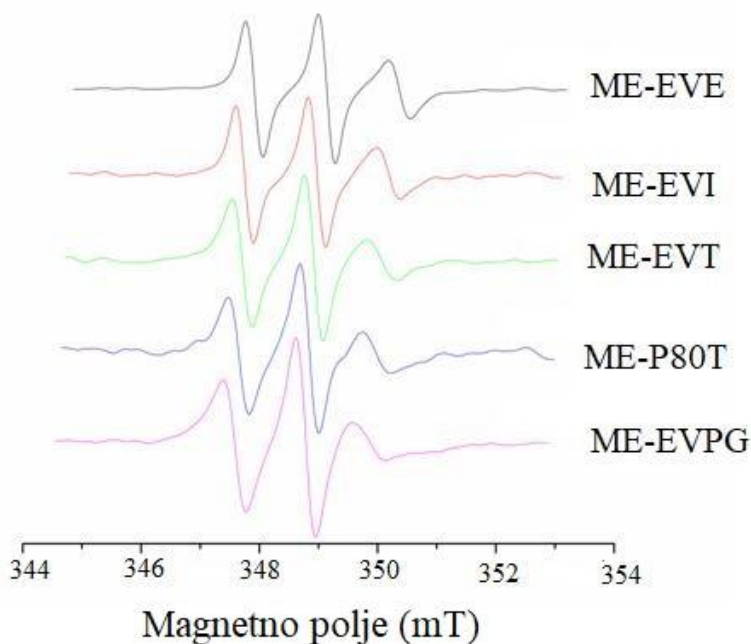
Jedini uzorak kod kojeg je predtretman bio odgovarajući za AFM analizu jeste uzorak ME-EVI, čije su AFM mikrografija – signal greške i 3D topografija, prikazane na Slici 4.12. Kao što može da se uoči, u uzorku je detektovana struktura koja se odlikuje odsustvom uređenosti dugog opsega i prisustvom međufaznog filma koji razdvaja međusobno prepletene domene uljane i vodene faze, što je osobina bikontinuiranih mikroemulzija. Međutim, takođe mogu da se primete i retke kapi ulja, ukazujući na početak transformacije sistema od bikontinuiranih ka mikroemulzijama sa vodom kao spoljašnjom fazom. U prilog ovoj tvrdnji ide visoka vrednost električne provodljivosti u ispitivanom uzorku. Takođe, treba da se napomene još jednom da se u mikroemulzijama, kao visoko dinamičnim sistemima, kontinuirano odvijaju fluktuacije u smislu faznih prelaza i promena veličina kapi [16]. Pored toga, za dobijanje kvalitetnih rezultata AFM analize veoma je važno da uzorak ostane u bliskom kontaktu sa površinom kako bi se sprečilo njegovo pomeranje, oštećenje i modifikacije, što bi potencijalno moglo da dovede i do promena u fenomenima na površini uzorka. Ipak, dobijeni AFM rezultati su omogućili diferenciranje mikroemulzija i geometrijski uređene strukture lamelarnih tečnih kristala, koji su viskoziji i ispoljavaju pseudoplastično reološko ponašanje [30, 202].

4.1.4.5. Elektron paramagnetna rezonantna spektroskopija (EPR)

Dobro je poznato da prisustvo različitih kosurfaktanata na međupovršini mikroemulzija može da utiče ne samo na fazno ponašanje određenog sistema, nego posljedično i na njegov potencijal za povećavanje transporta inkorporiranog leka u/kroz kožu. Imajući to u vidu, karakteristike međufaznog filma u prisustvu različitih kosurfaktanata su ispitane za nosače odabrane iz sistema C90/EV/kosurfaktant/voda (Tabela 4.2) primenom EPR metode. Osim toga, ispitana je i formulacija ME-P80T kako bi se procenio uticaj tipa surfaktanta na iste osobine mikroemulzija. U ovom eksperimentu je kao *spin* proba korišćena 5-DSA koja se locira u međupovršinskom filmu S-CoS, reflektujući rigidnost/fleksibilnost mikrookruženja u kojem se nalazi, u zavisnosti od dubine na kojoj se *spin* proba lokalizuje na međupovršini. Kao rezultat toga, moguće je detektovati promene u međupovršinskom filmu uzrokovane prisustvom različitih vrsta surfaktanata/kosurfaktanata. Kada se kao *spin* proba koristi 5-DSA, doksil grupa je locirana u blizini polarne glave amfilne masne kiseline, odnosno bliže polarnim grupama S-CoS. Međutim, ne sme da se zanemari činjenica da je EPR spektar 5-DSA ($pK_a = 7,45$) pH-zavisan i kako bi se spektar protumačio na odgovarajući način, neophodno je poznavanje pH vrednosti uzorka [178].

Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 4.13 i u Tabeli 4.5. Ispitivani vehikulumi sačinjeni iz C90, EV, kosurfaktanta i vode su pokazali različito ponašanje kao što je i očekivano iz rezultata ispitivanja njihovog faznog ponašanja. Kod uzorka ME-EVPG je zapažena značajno veća τ vrednost, što se može objasniti prirodom 1,2-propandiola koja ograničava rotacione pokrete *spin* probe [180]. Uočeno smanjenje mobilnosti *spin* probe takođe može da bude potpomognuto

smanjenjem sadržaja vode u uzorku u odnosu na druge ispitivane uzorke, što drastično menja mikrookruženje u kojem se proba nalazi. Dodatno, vehikulum ME-EVPG sadrži veći udeo smeše S-CoS (Tabela 4.2) i ima veći viskozitet (pogledati Tabelu 4.7 u rezultatima drugog dela eksperimentalnog rada), što prouzrokuje dalje ograničavanje pokretljivosti 5-DSA. Prisustvo propilenglikola na međupovršini i smanjena koncentracija vode su se takođe odrazili na parametar uređenosti (S), sugerišući prelaz iz fleksibilnog pakovanja amfifila na međupovršini ka više uređenom stanju. Dodatno, smanjenje udela vode od 5% (m/m) je dovelo do smanjenja vrednosti izotropne hiperfine konstante cepanja (α'_o), ukazujući na manje polarno okruženje.



Slika 4.13. EPR spektri 5-DSA u mikroemulzijama zasnovanim na polietoksilovanim surfaktantima

Nasuprot tome, veoma niske vrednosti τ_R su zabeležene u uzorcima sa EV koji sadrže 30% (m/m) vode. U ovom slučaju, ne samo da je došlo do smanjenja τ_R , nego je i uređenost sistema opala sa $0,17 \pm 0,02$ do vrednosti $0,11 \pm 0,01$ (Tabela 4.5). Kada su kratkolančani alkoholi korišćeni kao kosurfaktanti, jasno je da je mobilnost *spin* probe promenjena, što se može uočiti iz karakterističnih promena u dobijenim EPR spektrima, koji su uži nego spektri uzoraka ME-EVPG i ME-EVT (Slika 4.13). Ovakvi rezultati su posledica veće pokretljivosti *spin* probe u prisustvu alkohola koji obrazuju polarniju i manje rigidnu mikrosredinu na međupovršini mikroemulzija. Isti zaključak može da se izvede iz vrednosti parametra S , koje su takođe sugerisale manju krutost međupovršinskog filma u ME-EVE i ME-EVI mikroemulzijama. Dakle, rezultati EPR analize su bili u saglasnosti sa ispitivanjima faznog ponašanja sistema C90/EV-kosurfaktant/voda, koja su pokazala da je amfifilni film sistema zasnovanih na alkoholima fleksibilniji, obezbeđujući solubilizaciju veće količine vode.

Poredeći karakteristike EPR spektara dobijenih za mikroemulzije stabilizovane različitim tipom surfaktanta (Slika 4.13), više vrednosti τ_R su dobijene u ME-P80T uzorku (Tabela 4.5), što je verovatno posledica većeg viskoziteta P80 u odnosu na EV, i što uzrokuje otežanu rotaciju paramagnetnog nitroksidnog prstena u membrani. Shodno tome, zamena EV drugim etoksilovnim surfaktantom je dovela do jasnih promena u organizaciji strukture dela međupovršine u kojem je 5-DSA lokalizovana (parametar S). Preciznije, uočeno je povećanje vrednosti S sa $0,15 \pm 0,01$ na $0,16 \pm 0,03$. Međutim, značajna razlika u pH vrednosti uzoraka ME-EVT i ME-P80T ne može da se zanemari, s obzirom da je ona mogla da izmeni eksperimentalno dobijene EPR spektre. Naime, pri

višem pH (7,47) deo molekula 5-DSA ($pK_a = 7,45$) su u jonizovanom obliku i stoga locirane u blizini hidrofilnih grupa na međupovršini. Sa druge strane, u uzorku ME-EVT ($pH = 4,42$) se očekuje prisustvo DSA samo u molekulskom, nejionizovanom obliku. U tom slučaju doksil grupa je pozicionirana između hidrofobnih delova S-CoS, obezbeđujući informacije samo o ovom specifičnom delu mikrosredine.

Tabela 4.5. Rotaciono korelaciono vreme (τ_R), parametar uređenosti (S) i izotropna hiperfina konstanta cepanja (α'_0) za 5-DSA u mikroemulzijama zasnovanim na polietoksilovanim surfaktantima sa i bez SN

Formulacija		5-DSA		
		(ns)	S	
ME-EVT	placebo	$2,99 \pm 0,06$	$0,15 \pm 0,01$	$14,06 \pm 0,03$
	sa SN	$2,81 \pm 0,05$	$0,15 \pm < 0,01$	$14,24 \pm 0,12$
ME-EVE	placebo	$1,55 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,01$	$14,75 \pm 0,01$
	sa SN	$1,55 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,01$	$14,77 \pm 0,01$
ME-EVI	placebo	$1,60 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$	$14,69 \pm 0,04$
	sa SN	$1,56 \pm 0,06$	$0,11 \pm 0,01$	$14,70 \pm 0,16$
ME-EVPG	placebo	$3,83 \pm 0,08$	$0,17 \pm 0,02$	$13,64 \pm 0,13$
	sa SN	$4,26 \pm 0,19$	$0,21 \pm 0,03$	$13,65 \pm 0,17$
ME-P80T	placebo	$3,14 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,03$	13,85
	sa SN	4,22	$0,20 \pm 0,01$	*

*nije određeno

4.2. REZULTATI DRUGE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA

4.2.1. Fizičkohemijska karakterizacija mikroemulzija bez i sa solubilizovanim model lekovitim supstancama

Imajući u vidu da čak i neznatne razlike u sastavu mikroemulzija mogu da se odraze na njihove fizičkohemijske karakteristike, a posledično i na biofarmaceutske osobine nosača, sveobuhvatana fizičkohemijska karakterizacija je sprovedena s ciljem da se dobije uvid u lek-nosač interakcije i faktore koji utiču na oslobađanje i penetraciju leka.

Sve ispitivane placebo i formulacije sa model lekovitim supstancama su na sobnoj temperaturi bile homogene i transparentne tečnosti. Kada su ispitivane mikroemulzije podvrgnute polarizacionoj mikroskopiji, posmatrana polja su bila potpuno tamna, što je sugerisalo njihovu homogenost, optičku izotropiju i odsustvo tečno-kristalnih faza. Ovi rezultati su u slučaju uzorka ME-EVI u saglasnosti sa rezultatima AFM analize (Slika 4.12). U uzorcima sa lekovima nisu uočeni tragovi nerastvorenih kristala SN i ADA.

Fizičkohemijske osobine ispitivanih mikroemulzionih formulacija kao nosača za SN i ADA su prikazane u Tabelama 4.6 i 4.7.

Za razliku od pH vrednosti APG-nosača za ADA (Tabela 4.7), mikroemulzije zasnovane na EV, kao i P80 su imale dermatološki prihvatljive pH vrednosti (Tabela 4.6), pri čemu je pH izmerena u slučaju ME-P80T bila značajno niža u odnosu na ME-EVT od kojeg se razlikuje samo po tipu surfaktanta. Nasuprot tome, statistički značajne razlike između uzoraka sa EV nisu uočene. Solubilizacija SN je dovela do značajnog snižavanja pH vrednosti svih nosača, ali su i ove formulacije ostale prihvatljive za primenu na koži. Dramatičan pad pH se može pripisati prisustvu veoma kiselih nitratnih anjona u vodenoj fazi mikroemulzija.

Tabela 4.6. Fizičkohemijske karakteristike ispitivanih mikroemulzija sa i bez inkorporiranog SN 48 h nakon izrade i godinu dana čuvanja na sobnoj temperaturi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD (n = 3)

Formulacija		48 h			1 godina	
		pH	Električna provodljivost (μ S/cm)	Dinamički viskozitet* (mPas)	pH	Električna provodljivost (μ S/cm)
ME-EVT	placebo	7,47 \pm 0,12	62,50 \pm 1,01	18,84 \pm 1,43	6,70 \pm 0,01	76,63 \pm 0,49
	sa SN	4,39 \pm 0,04	268,00 \pm 2,00	21,91 \pm 1,71	4,27 \pm 0,03	292,33 \pm 0,58
ME-EVE	placebo	7,37 \pm 0,09	94,63 \pm 1,15	11,18 \pm 1,02	6,87 \pm 0,02	116,47 \pm 0,30
	sa SN	4,65 \pm 0,10	445,67 \pm 4,04	14,90 \pm 0,74	4,52 \pm 0,02	471,00 \pm 1,73
ME-EVI	placebo	7,44 \pm 0,03	71,50 \pm 0,62	8,96 \pm 0,18	6,67 \pm 0,06	81,047 \pm 0,26
	sa SN	4,62 \pm 0,06	319,67 \pm 2,31	11,90 \pm 0,56	4,38 \pm 0,03	338,00 \pm 1,00
ME-EVPG	placebo	7,38 \pm 0,06	41,10 \pm 0,62	32,63 \pm 0,94	6,88 \pm 0,04	50,77 \pm 0,06
	sa SN	4,60 \pm 0,08	182,00 \pm 2,46	34,07 \pm 0,52	4,42 \pm 0,03	204,33 \pm 0,58
ME-P80T	placebo	4,42 \pm 0,03	21,50 \pm 1,10	48,79 \pm 1,17	4,28 \pm 0,01	22,40 \pm 0,10
	sa SN	3,67 \pm 0,11	242,33 \pm 1,15	51,01 \pm 0,97	3,58 \pm <0,01	278,33 \pm 0,58

* Vrednosti prividnog viskoziteta pri brzini smicanja 375 s⁻¹

Dobijeni poredak vrednosti električne provodljivosti mikroemulzija dobijenih korišćenjem surfaktanta EV i različitih kosurfaktanata (etanol > izopropanol > Transcutol® P > propilenglikol) su takođe mogle da koreliraju sa polarnošću i lokalizacijom kosurfaktanata u ispitivanim sistemima. Ilustracije radi, propilenglikol je najviše hidrofilan i najverovatnije migrira sa međupovršine prema vodenoj fazi u većoj meri u odnosu na ostale kosurfaktante. Posledično, dolazi do povećane hidratacije njegovih hidroksilnih grupa što ograničava mobilnost molekula vode i, prema tome, snižava električnu provodljivost. Kako etanol i izopropanol imaju po jednu hidroksilnu grupu u svojoj strukturi, manje su hidratirani od propilenglikola. Osim toga, kratkolančani alkoholi su

verovatno više lokalizovani na međupovršinskom amfifilnom filmu, interagujući snažnije sa surfaktantom. Ovo ih je učinilo manje dostupnim za obrazovanje vodoničnih veza sa vodom, koja je iz tog razloga mobilnija, što se odrazilo i na električnu provodljivost formulacija.

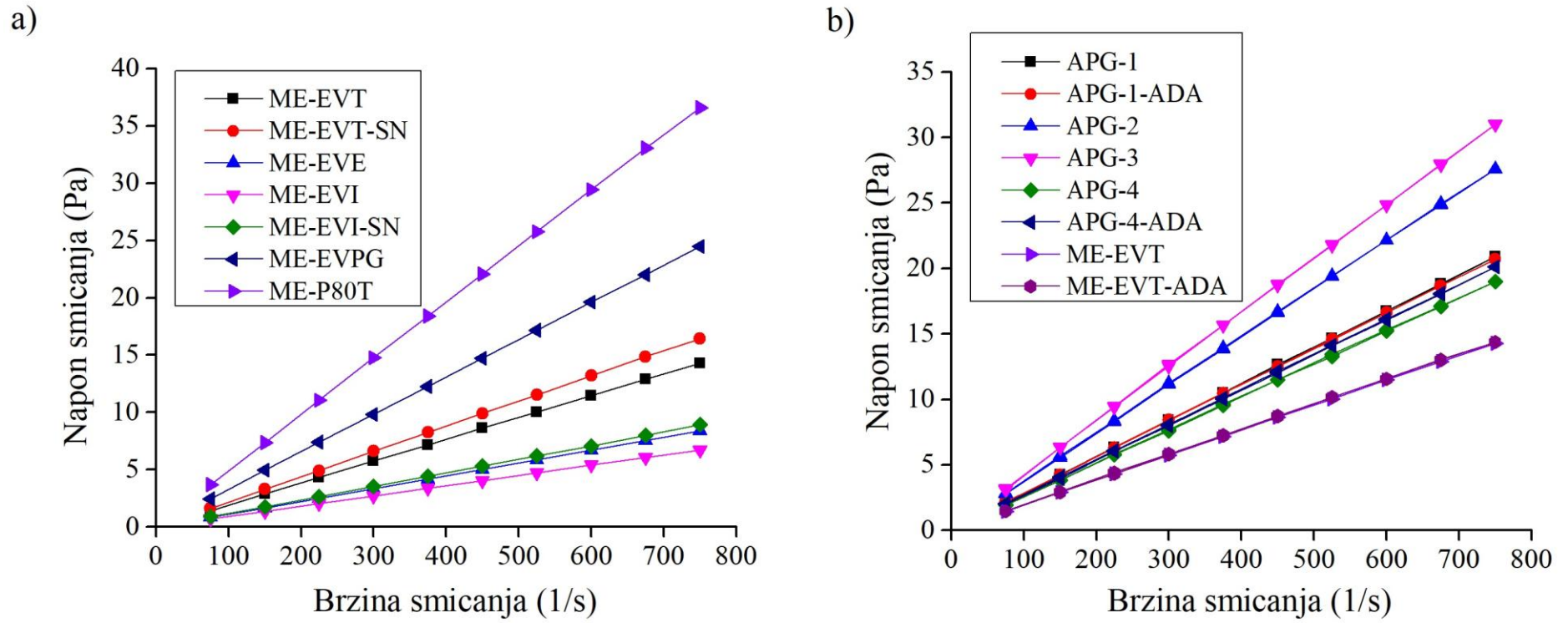
Očekivano, nakon rastvaranja SN u ispitivanim mikroemulzijama je došlo do značajnih promena u provodljivosti sistema, što je ponovo posledica prisustva nitratnih anjona u vodenim domenima.

Reološkim merenjima je ustanovljena linearna zavisnost napona smicanja od brzine smicanja, odnosno da su sve odabrane ispitivane mikroemulzije sa lekovima, kao i bez lekova, njutnovske tečnosti (Slika 4.14). Ovaj tip tečenja je ujedno i uobičajen za mikroemulzione sisteme [30, 36, 51].

Sve ispitivane formulacije se karakterišu niskim viskozitetom (8,96-48,79 mPas) (Tabela 4.6), pri čemu je referentni uzorak sa P80 pokazao najveći prividni viskozitet. Uzimajući u obzir da je ME-P80T kvantitativno isti kao ME-EVT, nameće se zaključak da je vrsta i struktura polietoksilovanog surfaktanta odredila reološke osobine proučavanih mikroemulzija. Naime, ispostavilo se da je viskozitet vehikuluma sa surfaktantom niže molekulske mase (EV ima prosečnu M_r 301,34) niži nego viskozitet mikroemulzije sa P80, čija je M_r u proseku 524,6. Osim toga, struktura P80 se karakteriše većim brojem hidrofilnih grupa zbog čega više stupa u interakcije sa molekulima vode. Ovo zapažanje koincidira sa izmerenom nižom vrednošću električne provodljivosti uzorka ME-P80T. Paralelno sa ovakvim trendom, viskozitet formulacija koje sadrže različite kosurfaktante je rastao sa porastom molekulske mase korišćenih kosurfaktanata (etanol < izopropanol < Transcutol® P) (Tabela 4.6). Međutim, ME-EVPG se nije uklapao u ovu relaciju. Ipak, treba da se istakne da je u pomenutoj mikroemulziji sadržaj vode bio niži (a ostalih sastojaka viši) nego u ostalim uzorcima. Takođe, kao što je već pomenuto, veći broj hidroksilnih grupa u molekuli propilenglikola je povećao stepen hidratacije i povećao na taj način viskozitet formulacije ME-EVPG.

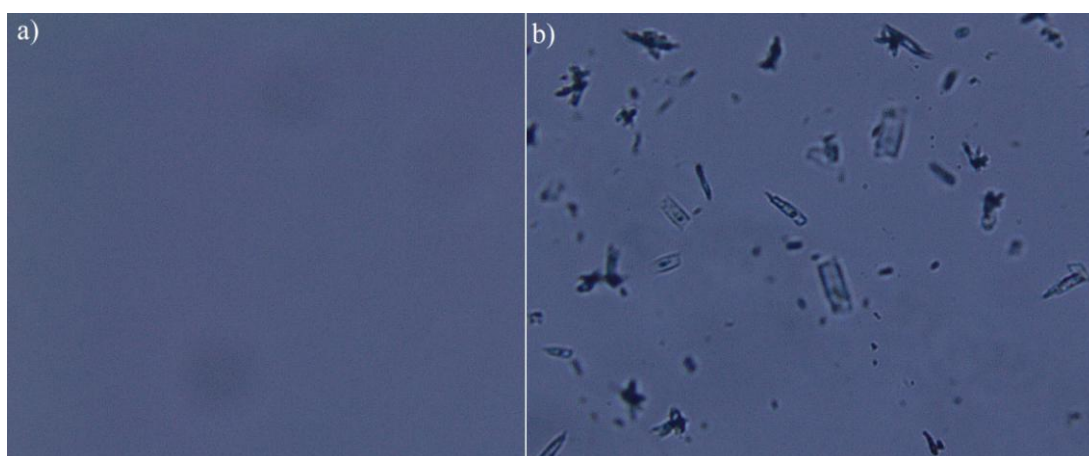
Rastvaranjem terapijske koncentracije SN u uzorcima je došlo do povećanja njihovog viskoziteta, ali bez promene tipa tečenja (Slika 4.14a). Povećanje viskoziteta može da bude indikator promenjene unutrašnje strukture sistema u smislu promene veličine kapi ili povećanja hidratacije S-CoS. Međutim, s obzirom da promena nije bila statistički značajna, može se smatrati da SN nije promenio mikrostrukturu nosača u kojima je rastvoren.

Suprotno pH vrednostima mikroemulzija zasnovanih na polietoksilovanim surfaktantima (Tabela 4.6), pH vrednosti APG serije uzoraka su bile visoke i kretale su se u rasponu 8,2-8,8 (rezultati nisu prikazani). U poređenju sa drugim formulacijama zasnovanim na ovoj vrsti surfaktanata, dobijeni rezultati se uklapaju u sličan opseg [46, 51]. Solubilizacija ADA u ovim vehikuluma je dovela do neznatnog smanjenja vrednosti pH, uprkos kiselim osobinama ove model lekovite supstance ($pK_a = 4,23$). S obzirom da je pH zdrave kože u području 4-6, formulacije koje imaju sličnu pH vrednost se generalno smatraju dobro podnošljivim [46]. Iz tog razloga je pH vrednost snižena dodavanjem rastvora fosforne kiseline što je više moguće kako bi se približila ovom opsegu, vodeći pritom računa da ne dođe do precipitacije leka. Ovaj cilj je postignut dodatkom 0,35% (m/m) kiseline (Tabela 4.7). Snižavanjem pH vrednosti dolazi do povećanja odnosa nejonizovane i jonizovane frakcije leka, što se smatra prednošću u penetraciji lekova. Koncentracije fosforne kiseline više od 0,35% (m/m) su dovele do pojave turbiditeta zbog precipitacije ADA, što je potvrđeno polarizacionom mikroskopijom (Slika 4.15b). Iako su rezultati ispitivanja rastvorljivosti ADA u konstituentima razvijenih mikroemulzija (Tabela 4.1) sugerisali da je najverovatnije mesto njegove solubilizacije međupovršinski film, na osnovu izmerenih nižih pH vrednosti uzoraka sa lekom verovatno je da su neki molekuli leka prisutni u vodenoj fazi mikroemulzija. Kako se pH vrednost snižava, broj nejonizovanih molekula leka raste, dolazi do zasićenja međupovršine i precipitacije leka. Takođe, dodatak fosforne kiseline kao elektrolita je mogao indukovati promene u organizaciji amfifilnog filma [63, 194, 211] i pospešiti penetraciju ulja na međupovršinu umesto lekovite supstance, što je takođe moglo doprineti precipitaciji ADA.



Slika 4.14. Krive proticanja za: a) placebo nosače i mikroemulzije sa SN; b) placebo nosače i mikroemulzije sa ADA

Vrednost električne provodljivosti placebo uzoraka zasnovanih na APG je takođe bila visoka, što se objašnjava prisustvom elektrolita koji potiču iz procesa njihove proizvodnje. S obzirom da APG-4 uzorak sadrži nešto veću koncentraciju surfaktanta, prisutno je više provodljivih entiteta te je izmerena i viša provodljivost. Ostala tri APG-uzorka koja se razlikuju samo po vrsti ulja su ispoljila sličnu elektrokonduktivnost. Nasuprot mikroemulzija sa APG, za placebo i ME-EVT sa ADA je izmerena značajno niža električna provodljivost. Slično uticaju ADA na pH, rastvaranjem terapijske koncentracije leka u mikroemulzijama je došlo do blagog smanjenja električne provodljivosti. Ovakav rezultat može da ukaže da je lek verovatno solubilizovan na međupovršini, a deo molekula leka je rastvoren u vodenoj fazi nosača. U prilog ovoj pretpostavci govori činjenica da je pH vrednost uzoraka sa ADA niža u poređenju sa placebo mikroemulzijama. Kao posledica ovakve raspodele leka, mobilnost vode je ograničena, što za posledicu ima snižavanje vrednosti električne provodljivosti.



Slika 4.15. Izgled uzorka APG-4 posmatranog polarizacionim mikroskopom sa dodatkom $> 0,35\%$ (m/m) fosforne kiseline: a) placebo formulacija; b) formulacija sa ADA (0,1% m/m)

Tabela 4.7. Fizičko-hemijske karakteristike ispitivanih mikroemulzija sa i bez inkorporiranog ADA 48 h nakon izrade i godinu dana čuvanja na sobnoj temperaturi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD (n = 3)

Formulacija		48 h			1 godina	
		pH	Električna provodljivost (μ S/cm)	Dinamički viskozitet (mPas)	pH	Električna provodljivost (μ S/cm)
APG-1	placebo	$7,88 \pm 0,04$	$902,0 \pm 12,0$	$27,86 \pm 0,30$	$6,64 \pm 0,03$	$1040,7 \pm 3,5$
	sa ADA	$7,67 \pm 0,03$	$836,0 \pm 7,0$	$27,90 \pm 0,32$	$6,76 \pm 0,19$	$1058,7 \pm 0,6$
APG-2	placebo	$7,75 \pm 0,05$	$868,7 \pm 2,3$	$36,75 \pm 0,43$	$6,28 \pm 0,02$	$1035,3 \pm 1,5$
	sa ADA	$7,73 \pm 0,06$	$812,0 \pm 7,0$	$36,95 \pm 0,65$	$6,61 \pm 0,09$	$1005,7 \pm 3,5$
APG-3	placebo	$7,54 \pm 0,06$	$909,3 \pm 11,3$	$41,33 \pm 1,18$	$6,49 \pm 0,01$	$1045,7 \pm 1,5$
	sa ADA	$7,35 \pm 0,02$	$836,0 \pm 6,0$	$42,18 \pm 0,82$	$6,60 \pm 0,04$	$1090,0 \pm 4,0$
APG-4	placebo	$6,85 \pm 0,03$	$987,0 \pm 7,0$	$25,31 \pm 1,10$	$6,73 \pm 0,02$	$1159,0 \pm 2,6$
	sa ADA	$6,72 \pm 0,02$	$934,0 \pm 8,0$	$26,81 \pm 1,20$	$6,63 \pm 0,02$	$1113,0 \pm 2,0$
ME-EVT	placebo	$7,47 \pm 0,12$	$62,5 \pm 1,0$	$18,84 \pm 1,43$	$6,70 \pm 0,01$	$76,63 \pm 0,49$
	sa ADA	$7,38 \pm 0,01$	$61,6 \pm 0,6$	$19,16 \pm 0,27$	$7,12 \pm 0,01$	$81,57 \pm 0,58$

Nizak viskozitet svih ispitivanih nosača za ADA (Tabela 4.7), zajedno sa odsustvom dvostrukog prelamanja svetlosti pod polarizacionim mikroskopom, potvrđuje odsustvo tečnih kristala u uzorcima. Posmatrajući razvijene vehikulume korišćene kao nosače za ADA, APG-4 je imao nešto niži viskozitet nego APG-1, što je sugerisalo da promena vrste APG surfaktanta nije znatno uticala na vrednost viskoziteta. Sa druge strane, kada je C90 zamenjen monogliceridima,

došlo je do značajnog povećanja viskoziteta. Zaista, viskozitet uzoraka koji sadrže P2000 kao surfaktant je rasla zajedno sa porastom viskoziteta ulja ($C90 < I988 < I742$). Ponovo treba da se naglasi da monogliceridi imaju dodatnu slobodnu hidroksilnu grupu u poređenju sa monoestrom propilenglikola, zbog čega se mogao očekivati i viši stepen njihove hidratacije, samim tim i viskoziteta.

Inkorporiranje ADA u mikroemulzije nije promenilo tip tečenja (Slika 4.14b), ali je zabeleženo povećanje njihovog viskoziteta, što se može pripisati prisustvu leka na međupovršinskom filmu bikontinuiranih mikroemulzija. Ipak, uočeni efekat nije bio statistički značajan.

Konačno, poredeći uzorak sa polietoksilovanim surfaktantom sa APG-formulacijama, svi parametri njegove fizičko-hemijske karakterizacije (pH, električna provodljivost i viskozitet) su bili niži, ali je uticaj dodatka ADA pratio isti trend kao kod uzoraka koji su stabilizovani APG surfaktantima.

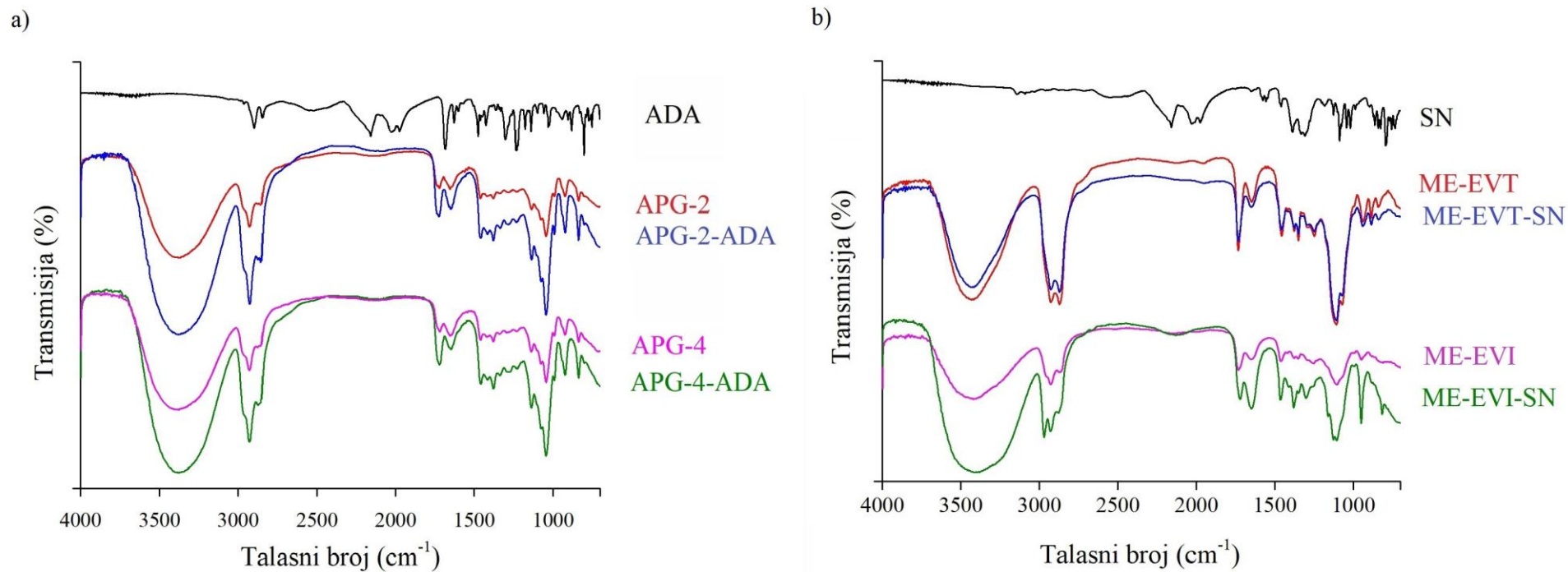
Uzimajući u obzir da solubilizacija ADA u mikroemulzionim vehikulumima nije prouzrokovala značajne promene fizičko-hemijskih karakteristika placebo formulacija, može se zaključiti da uvođenjem ove lekovite supstance u sisteme ne dolazi do značajnih promena u njihovoj mikrostrukturi.

4.2.1.1. Procena interakcija leka i nosača – infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR spektroskopija)

Kako bi se upotpunile pretpostavke navedene u prethodnoj fazi ispitivanja da solubilizacija lekovitih supstanci nije značajno promenila mikrostrukturu nosača i kako bi se stekao dodatni uvid u moguće intermolekulske interakcije između leka sa ostalim sastojcima mikroemulzija, sprovedeno je ispitivanje odabranih uzoraka primenom FTIR spektroskopije. Analizirane su odabrane mikroemulzije sa ADA, odnosno SN, paralelno sa njihovim odgovarajućim placebo parovima.

FTIR spektar ADA (Slika 4.16a) pokazuje karakteristične apsorpcione trake između 3000 i 2800 cm^{-1} (vibracije O–H rastezanja karboksilne grupe), na 1686 cm^{-1} (vibracija rastezanja C=O karboksilne grupe), dok se aromatične grupe mogu uočiti u regionu između 900 - 650 cm^{-1} . Dobijeni FTIR spektar sa karakterističnim apsorpcionim trakama je u saglasnosti sa literaturnim podacima [176]. Takođe, karakteristične apsorpcione trake mogu da se uoče i na spektrima placebo uzoraka – široki pik u opsegu 3710 cm^{-1} do 3000 cm^{-1} usled O–H rastezanja, trake na $2927,99\text{ cm}^{-1}$ i $2857,76\text{ cm}^{-1}$, odnosno $2926,54\text{ cm}^{-1}$ i $2873,89\text{ cm}^{-1}$, koje odgovaraju asimetričnom odnosno simetričnom CH_2 rastezanju u uzorcima APG-2 i APG-4, kao i trake na $1720,82\text{ cm}^{-1}$ i $1720,38\text{ cm}^{-1}$ usled C=O rastezanja APG-2 i APG-4 uzoraka, redom. Najvažnije je da se trake koje se pojavljuju na FTIR spektrima placebo uzoraka, pojavljuju i na spektrima formulacija sa ADA, bez prisutnih novih ili pomeranih postojećih pikova, što potvrđuje izostanak bilo kakvih hemijskih interakcija između leka i sastojaka mikroemulzija uzrokovanih solubilizacijom ove lekovite supstance ili nagoveštaja eventualne pojave rekristalizacije rastvorenog ADA.

Slika 4.16b prikazuje FTIR spektre SN, odabranih placebo i uzoraka sa inkorporiranim SN. Apsorpcione trake koje odgovaraju vibracijama rastezanja S–H i C–N veza u molekuli SN se mogu detektovati na 2543 i 1380 cm^{-1} , respektivno. Prsten benzena je uočljiv na 1530 - 1660 cm^{-1} , dok su vibracije rastezanja C=C prisutne na 1459 cm^{-1} , C–H na 3144 cm^{-1} i C–O na 1300 - 1000 cm^{-1} . Dobijeni spektar je takođe u saglasnosti sa podacima dostupnim u relevantnoj literaturi [151]. Apsorpcione trake karakteristične za placebo uzorke (široki pik u opsegu 3750 cm^{-1} do 3000 cm^{-1} koje odgovaraju O–H rastezanju, trake na $2926,82\text{ cm}^{-1}$ i $2871,50\text{ cm}^{-1}$, odnosno $2927,94\text{ cm}^{-1}$ i $2872,29\text{ cm}^{-1}$, usled asimetričnog odnosno simetričnog CH_2 rastezanja, te pikovi na $1733,80\text{ cm}^{-1}$ i $1733,81\text{ cm}^{-1}$ usled C=O rastezanja u ME-EVT i ME-EVI uzorcima, redom) odgovaraju karakterističnim funkcionalnim grupama sastojaka mikroemulzija. Na FTIR spektrima uzoraka sa SN takođe nema pojave novih ili pomeranja postojećih apsorpcionih traka, što ponovo ukazuje da nije došlo do hemijskih interakcija lekovite supstance sa ostalim komponentama sistema, kao i da je solubilizacija SN u mikroemulzijama bila potpuna i nije praćena rekristalizacijom.



Slika 4.16. FTIR spektri: a) ADA, mikroemulzija sa i bez ADA za odabrane sisteme; b) SN, mikroemulzija sa i bez SN za odabrane sisteme

4.2.2. Procena lokalizacije lekovitih supstanci u mikroemulzijama

Tačna lokalizacija solubilizovanog leka u mikroemulzionom sistemu zavisi od njegove hidrofobnosti i strukture. Visok solubilizacioni kapacitet mikroemulzija potiče od prisustva dodatnog domena u sistemu – međupovršinskog amfifilnog filma. Sa druge strane, prisustvo leka na međupovršini može zauzvrat da utiče na oblik i veličinu kapi dispergovane faze. Ilustracije radi, hidrofilna aminokiselina (glicin) je primarno bila rastvorena u vodenoj fazi mikroemulzija, dok je rastvaranje hidrofobnih aminokiselina (L-histidin, L-fenilalanin, aspartam) u mikroemulzijama dovelo do njihove asocijacije na međupovršini gde one mogu da se ponašaju kao kosurfaktanti, smanjujući međupovršinski napon [216, 217].

Ipak, primenom standardnih metoda karakterizacije još uvek praktično ne postoji mogućnost kvantifikovanja raspodele solubilizovanog leka između uljane i vodene faze mikroemulzija u prisustvu surfaktanta/kosurfaktanta na međupovršini ovih dveju faza [204]. Iz tog razloga, procena distribucije leka u mikroemulzijama se zasniva na indirektnim metodama poput određivanja rastvorljivosti leka u konstituentima sistema, razmatranja fizičko-hemijske strukture leka (npr. da li je lek amfifilan) i ispitivanja uticaja solubilizacije leka na fazno ponašanje sistema i fizičko-hemijske karakteristike nosača. Smatra se da lek ima tendenciju da se locira u mikrosredini u kojoj ima najveću rastvorljivost, a njegova tačna pozicija zavisi od količine sastojaka u tom delu sistema [218]. Dakle tendencija leka da se rastvori na međupovršinskom filmu i rastvorljivost leka u pojedinim sastojcima submikronskih emulzija određuju raspodelu određenog leka između uljane, vodene faze i njihove međupovršine [219], pri čemu se ne može potpuno isključiti da će mala količina leka biti uvek prisutna u svim domenima sistema. Naime, teško rastvorljive lekovite supstance se raspodeljuju između različitih domena mikroemulzija shodno njihovoj prirodi, dok se dominantno rastvaranje u uljanoj fazi mikroemulzija može očekivati samo u slučaju visoko lipofilnih lekova [204, 220].

Kako bi se ispitao uticaj model lekovitih supstanci na međupovršinu mikroemulzionih nosača, koja se ističe kao najverovatnije mesto solubilizacije slabo rastvorljivih lekova, korišćene su dve različite tehnike. Efekat prisustva ADA je ispitan merenjem međupovršinskog napona u odabranom sistemu ulje/voda, dok je uticaj SN na karakteristike amfifilnog filma ispitan pomoću elektron-paramagnetne rezonantne spektroskopije (EPR).

4.2.2.1. Merenje dinamičkog međupovršinskog napona

Uzimajući u obzir prethodno navedena razmatranja i rastvorljivost ADA u sastojcima izabranih mikroemulzionih nosača (Tabela 4.1), najverovatnije mesto solubilizacije ADA u (invertnim) bikontinuiranim mikroemulzijama bi bio međupovršinski amfifilni film. Posmatrajući strukturu leka (Tabela 1.7), može se uočiti veliki nepolarni deo molekule koji je odgovoran za visoku lipofilnost leka, kao i karboksilna grupa koja čini mali polarni deo molekule. U nedostatku literaturnih podataka, kako bi se ispitala potencijalna amfifilna priroda ovog leka i njegova dodatna uloga kao kosurfaktanta, izvršena su merenja međupovršinskog napona između vode i C90 u prisustvu i odsustvu ADA. Međutim, ponašanje tipično za mezogene supstance nije potvrđeno u slučaju ovog leka pod uslovima korišćenim u eksperimentalnoj postavci. Vrednosti dinamičkog međupovršinskog napona između vode i korišćenog ulja u prisustvu i odsustvu ADA su bile $5,49 \pm 0,06$ i $4,63 \pm 0,33 \text{ mNm}^{-1}$, respektivno. Iako razlika između dobijenih vrednosti nije visoka i ukazuje na blag uticaj ADA, dobijeni trend ukazuje da lek nema mezogeni karakter, što je donekle i očekivano, uzimajući u obzir visoku lipofilnost leka ($\log P = 8,04$). Ipak, treba da se napomene da na površinsku aktivnost lekova mogu da utiču promene uslova mikrosredine (npr. promena pH, prisustvo PAM i lipida).

Dakle, iako nije potvrđena amfifilnost ADA, rezultati studije rastvorljivosti (Tabela 4.1) ukazuju da je veća verovatnoća da dominantni lokus solubilizacije leka ostaje međupovršinski film sačinjen od smeše surfaktanta i kosurfaktanta, u odnosu na inkorporiranje leka u uljanu ili vodenu fazu sistema (u molekulskom, odnosno jonizovanom obliku) [15, 30, 63]. Takođe, u prilog ovome govori i korelacija između rastvaranja leka i mikrostrukture sistema. U tom kontekstu,

bikontinuirane mikroemulzije koje imaju veću međupovršinsku oblast mogu da solubilizuju veći broj molekula leka. Međutim, imajući na umu visoku dinamičnost bikontinuiranih mikroemulzija, neizbežno je da je jedan deo leka rastvoren u molekulskom obliku u uljanoj fazi mikroemulzija, odnosno u vodenoj fazi kao jonizovana frakcija leka. Ova pretpostavka može da se potkrepi činjenicom da je pH vrednost uzoraka sa lekom niža od pH placebo mikroemulzija (Tabela 4.7).

4.2.2.2. Elektron-paramagnetna rezonantna spektroskopija (EPR)

EPR analiza mikroemulzionih uzoraka sa solublizovanim SN je sprovedena sa ciljem dobijanja informacija o mogućim efektima leka na međupovršini izabranih formulacija. Rezultati ovih eksperimenata su prikazani u Tabeli 4.5. Kao što se može uočiti, u tri od 5 ispitivanih sistema (ME-EVT, ME-EVI i ME-EVE) parametar uređenosti S i rotaciono korelaciono vreme τ_R nisu bili značajno promenjeni u prisustvu SN, što znači da je rigidnost međupovršine ostala nepromenjena nakon solubilizacije leka. Ovo je takođe potkrepljeno činjenicom da SN nije umanjio mikropolarnost formulacija, što se moglo očekivati s obzirom na njegov izraženi lipofilni karakter. Treba da se naglasi da je deo međupovršinskog filma koji je ispitan korišćenjem 5-DSA deo blizu polarne glave paramagnetnog prstena korišćene *spin* probe. Stoga, iz ovih nalaza može da se zaključi da je SN solubilizovan u uljanoj fazi sistema. Međutim, s obzirom na rastvorljivost leka (Tabela 4.1), ne može da se isključi da je SN bar delimično raspodeljen između hidrofobnih repova S-CoS.

Za razliku od prethodno pomenute tri formulacije, rastvaranje SN u ME-P80T i ME-EVPG vehikulumima je uzrokovalo značajnu restrikciju mobilnosti *spin* probe. U oba slučaja, vrednosti S i τ su značajno više u uzorcima sa solubilizovanim lekom, što ukazuje na prisustvo SN u manje polarnom delu međupovršine. Kako je sadržaj S-CoS i ulja u ME-EVPG veći u odnosu na ostale formulacije (Tabela 4.2), rastvaranje SN je olakšano. Čini se da je prisustvo SN modifikovalo strukturu međufaznog filma u pravcu više uređene organizacije oko nitroksidne grupe, omogućujući da se 5-DSA proba umetne duboko između hidrofobnih lanaca surfaktanta, gde su njihovi pokreti manje ograničeni. Sa druge strane, izotropna hiperfina konstanta cepanja (α_o) nije bila značajno promenjena ni u jednom sistemu nakon inkorporiranja leka, što znači da je polarlost paramagnetne grupe 5-DSA ista u prisustvu i odsustvu leka.

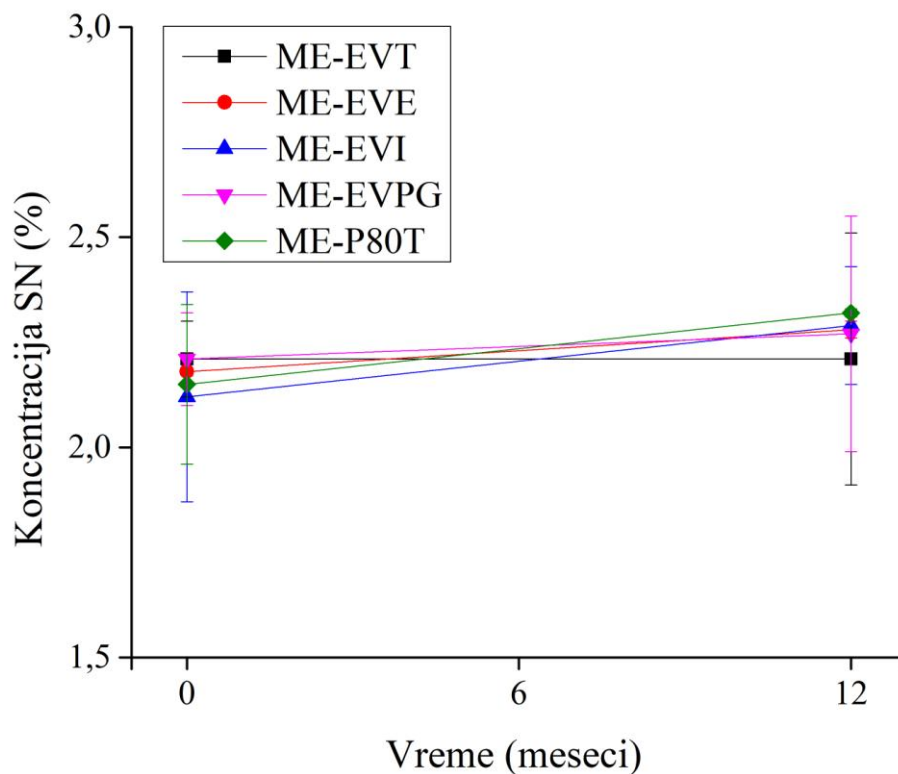
Sumarno, EPR tehnikom nisu detektovane značajne promene u polarnom delu međupovršine nakon dodatka SN u ispitivane formulacije. Na osnovu toga, lek je dominantno rastvoren u uljanoj fazi sistema. Takođe, neizbežno je da su neki molekuli SN locirani između hidrofobnih delova međupovršinskog filma koji su orjentisani prema uljanoj fazi. Iako bez statističke značajnosti, solublizacija SN u formulacijama ME-EVPG i ME-P80T je uticala na polarni deo međupovršinskog filma na drugačiji način nego u ostalim mikroemulzionim nosačima (ME-EVT, ME-EVI i ME-EVE), ukazujući na značajnije prisustvo leka u ovom delu međupovršine. Ovakva različita mikrostruktura u kojoj je lek rastvoren, odnosno različita lokalizacija leka u formulacijama, može da bude uzrok različitog biofarmaceutskog ponašanja [200].

Konačno, značajne razlike pH vrednosti placebo i uzoraka sa SN treba da se uzmu u obzir prilikom tumačenja rezultata EPR analize, s obzirom da u kiseloj sredini (formulacije sa lekom) paramagnetni prsten *spin* probe detektuje promene u oblasti hidrofobnih repova surfaktanta. Pod ovim uslovima 5-DSA je dominantno prisutna u nejonizovanom obliku i može da migrira ka nepolarnom delu međupovršinskog filma, utičući na izgled EPR spektara. Stoga, donošenje zaključaka o efektu SN na međupovršini je kompleksno i treba da se sprovodi oprezno, naročito u sistemima koji sadrže EV kao surfaktant, u kojima je rastvaranjem SN pH vrednost značajno promenjena.

4.2.3. Ispitivanje stabilnosti mikroemulzija

Iako su mikroemulzije inherentno termodinamički stabilni sistemi, procena stabilnosti predstavlja veoma važan parametar tokom razvoja formulacije jer su farmaceutski preparati podložni različitim vrstama promena tokom stajanja – fizičkim, hemijskim i mikrobiološkim.

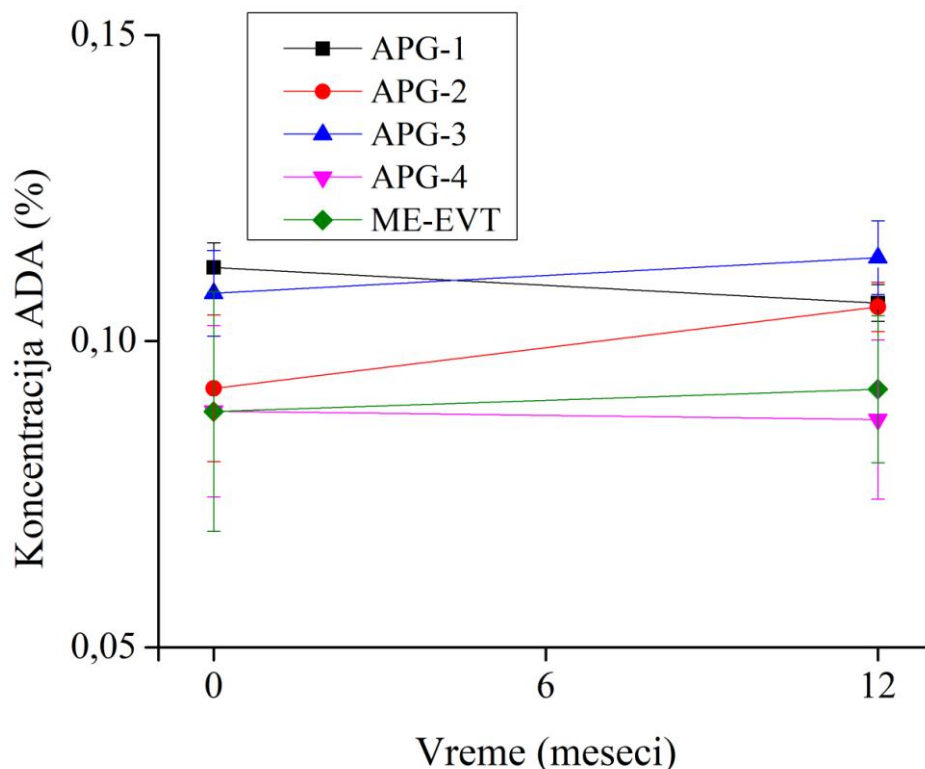
Uzorci mikroemulzija sa model lekovitim supstancama i njihovi placebo parovi su čuvani u hermetički zatvorenim staklenim bočicama sa aluminijumskom kapičom tokom godinu dana pod ambijentalnim uslovima ($20\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$). Kao indikatori promena u sistemima, praćene su vrednosti pH i električne provodljivosti 48 h nakon izrade uzoraka, te nakon godine dana stajanja. Dodatno, u istim vremenskim tačkama je određen sadržaj lekovitih supstanci, kao mera njihove hemijske stabilnosti u izabranim nosačima.



Slika 4.17. Sadržaj SN (% m/m) u ispitivanim mikroemulzijama tokom čuvanja uzoraka u trajanju od godinu dana (srednja vrednost \pm SD, n = 3)

Tokom godinu dana stajanja uzoraka, ni u jednom uzorku nisu primećene fizičke promene poput pojave turbiditeta, separacije faza ili precipitacije lekovitih supstanci. Ipak, u uzorcima sa ADA i njihovim odgovarajućim placebo parovima je došlo do pada pH vrednosti i rasta vrednosti električne provodljivosti (Tabela 4.7). Sličan trend promena merenih parametara, ali zanemarljiv, je uočen i u slučaju uzoraka sa SN i njegovih placebo nosača (Tabela 4.6). Ovakve promene mogu da se objasne postepenom hidrolitičkom degradacijom estara masnih kiselina, što vodi nastanku slobodnih masnih kiselina. Kao logična posledica toga, povećava se broj vodoničnih jona što uzrokuje povećanje električne provodljivosti, paralelno sa padom pH vrednosti.

Sa druge strane, sadržaj lekovite supstance nije značajno promenjen nakon godinu dana čuvanja uzoraka na sobnoj temperaturi, ni u slučaju SN (Slika 4.17) ni ADA (Slika 4.18). Ovakvi rezultati potvrđuju da promene pH i električne provodljivosti potiču od degradacije estara masnih kiselina i takođe ukazuju na prihvatljivu preliminarnu stabilnost svih ispitivanih uzoraka.



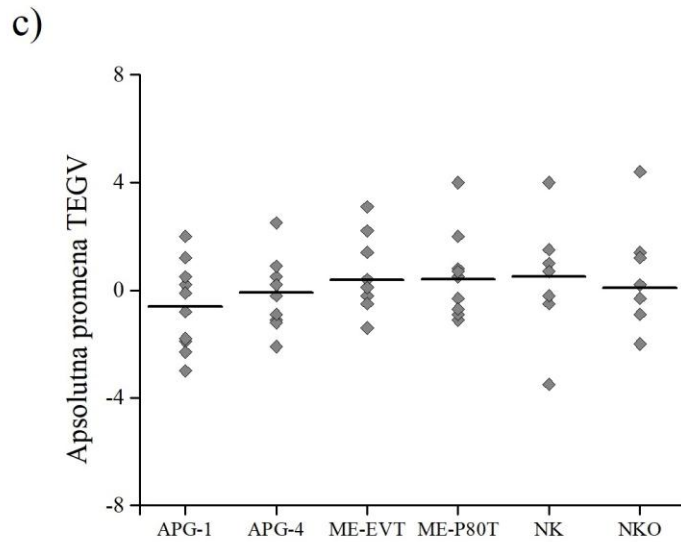
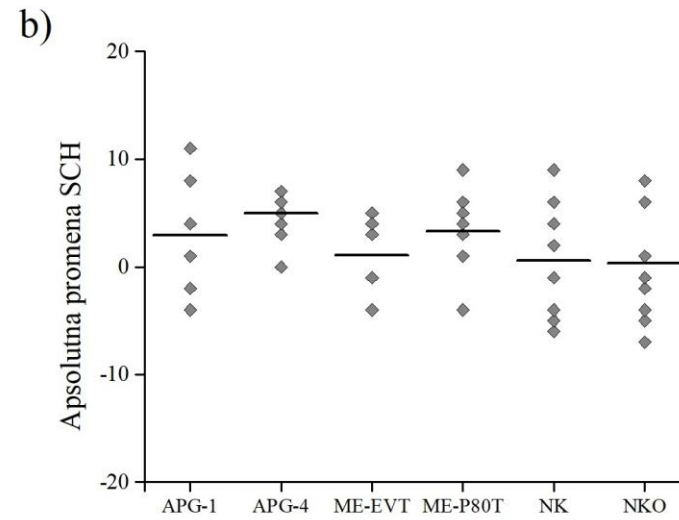
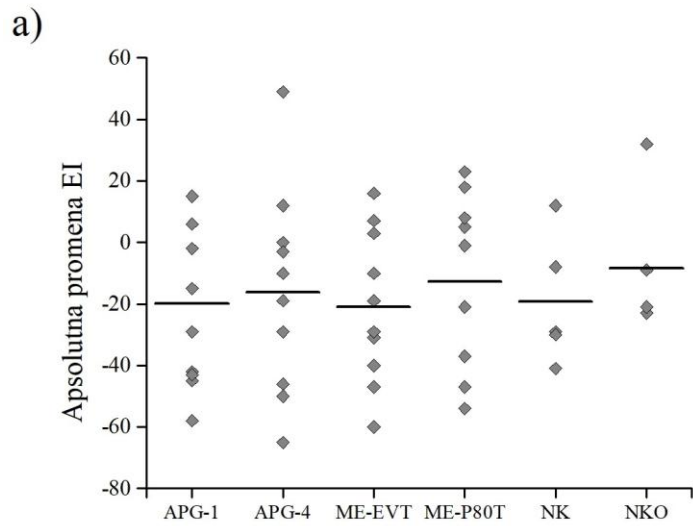
Slika 4.18. Sadržaj ADA (% m/m) u ispitivanim mikroemulzijama tokom čuvanja uzoraka u trajanju od godinu dana (srednja vrednost \pm SD, n = 3)

4.2.4. *In vivo* procena bezbednosnog profila mikroemulzija

Lokalna primena farmaceutskih preparata je uobičajeno povezana sa promenom barijerne funkcije kože, te je stoga od presudnog značaja formulisati nosač sa niskim rizikom ili bez ikakvog rizika za potencijalnom iritacijom kože. Budući da mikroemulzije obično sadrže relativno visok udeo surfaktanata, ovi sistemi se očekivano smatraju za nosače sa određenim potencijalom za senzibilizaciju kože. Takođe, upotreba novijih surfaktanata koji se koriste za stabilizaciju mikroemulzija je još uvek nedovoljno istražena u smislu njihovog delovanja na koži, kada su konstituenti različitih koloidnih nosača lekova poput mikroemulzija.

APG se, za razliku od polietoksilovanih surfaktanata, generalno smatraju blagim PAM, koje su prijatelji kože. Takođe, za topikalne formulacije koje sadrže polietoksilovani surfaktant korišćen u okviru ove doktorske disertacije – EV (do koncentracije 23,3%), se navode njihove povoljne osobine zasnovane na rezultatima Zein testa i RBC testa. Kako bi se uporedio iritacioni potencijal, odnosno bezbednosni profil odabranih nosača zasnovanih na APG (APG-1 i APG-4), u odnosu na odabrane mikroemulzije zasnovane na polietoksilovanim surfaktantima (ME-EVT i ME-P80T), ali i potencijal različitih surfaktanata iz ovih dveju grupa međusobno, sprovedena je *in vivo* studija na deset zdravih dobrovoljaca. Selekcija uzoraka je sprovedena tako da su sve mikroemulzije sadržavale istu vrstu ulja u istoj ili sličnoj koncentraciji, kako bi se što više umanjio uticaj kvalitativnog/kvantitativnog sastava formulacija (Tabela 4.2 i Tabela 4.3) na rezultate.

Dodatna *in vivo* studija (na deset drugih ispitanika) je sprovedena kako bi se ispitao uticaj vrste ulja u APG-uzorcima na merene biofizičke parametre. Rezultati dobijeni u ova dva odvojena 24-h eksperimenta pod okluzijom su prikazani na Slikama 4.19. i 4.20.



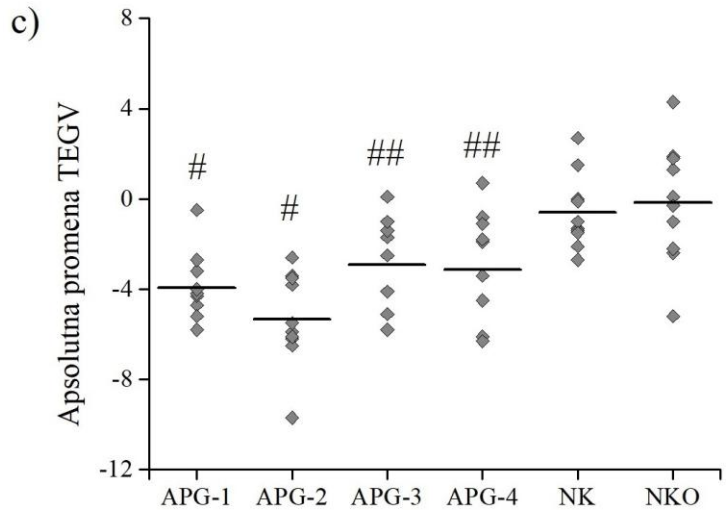
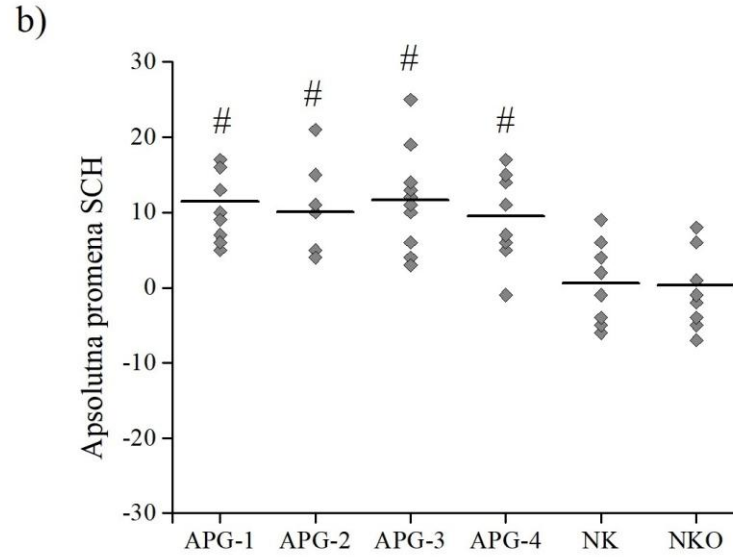
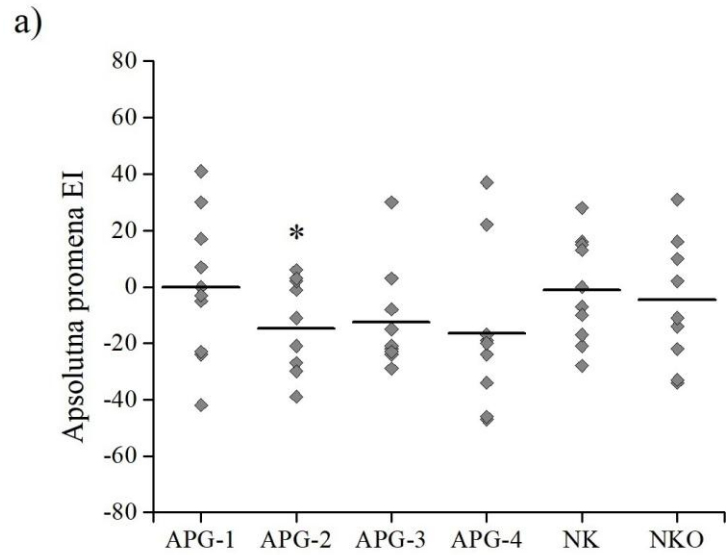
Slika 4.19. *In vivo* procena bezbednosnog profila ispitivanih izabranih mikroemulzija – apsolutna promena vrednosti: a) eritema indeksa (EI), b) hidratacije stratum corneum-a (SCH), i c) transepidermalnog gubitka vode (TEGV); Prikazane su promene za svakog ispitanika (dobijene kao razlika između inicijalnih vrednosti i vrednosti izmerenih 3 h nakon uklanjanja okluzije) sa označenim srednjim vrednostima (dugačka linija) za ispitivane placebo mikroemulzije i netretirane kontrole bez okluzije (NK) i sa okluzijom (NKO)

Na slici 4.19 su prikazane apsolutne razlike merenih parametara (EI, TEGV i SCH) za svakog ispitanika, dobijene kao razlika vrednosti 3 h nakon skidanja 24-h okluzije i inicijalno izmerenih vrednosti pre primene ispitivanih uzoraka (APG-1, APG-4, ME-EVT i ME-P80T). Isti parametri su izmereni i na kontrolnim mestima pod okluzijom i bez primene okluzije (NKO i NK). Iritacioni potencijal formulacija je procenjen na osnovu merenja EI, dok je detaljniji uvid u efekte mikroemulzija na kožu obezbeđen merenjem SCH i TEGV vrednosti, kao indikatora stanja barijerne funkcije kože [221]. Statistički značajne promene u odnosu na bazalne vrednosti nisu dobijene ni za jedan ispitivani parametar za sve ispitivane formulacije i obe netretirane kontrole. Samo blagi trend u porastu EI vrednosti (Slika 4-19a) može da bude primećen. Međutim, uzimajući u obzir velike interindividualne varijacije, kao i intaktnu barijernu funkciju kože na koju ukazuju nepromenjene vrednosti TEGV (Slika 4.19c), trend porasta EI vrednosti se ne smatra značajnim. Drugim rečima, ispitivane placebo mikroemulzije nisu izazvale crvenilo ili oštećenje kože, niti su imale ikakav uticaj na stepen hidratacije kože.

Važno je da se naglasi da statistički značajne razlike nisu uočene ni između ispitivanih formulacija, bez obzira na tip surfaktanta (APG ili polietoksilovani surfaktanti; decil-glukozid ili kaprilil/kapril-glukozid; EV ili P80). Ovakav nalaz na neki način nije bio očekivan, budući da literaturni podaci navode da je P80 prilikom stajanja na sobnoj temperaturi, slično kao i ostali polietoksilovani surfaktanti, podložan oksidaciji pod delovanjem atmosferskog kiseonika. Proizvodi nastali u ovoj reakciji (npr. peroksidi, formaldehid i serija etoksilovanih aldehida) mogu da deluju kao senzibilizatori kože koji mogu da uzrokuju iritaciju i kontaktni dermatitis, naročito kod preosetljivih osoba [33, 222]. Takođe, relevantna literatura dokumentuje i prednosti surfaktanata zasnovanih na šećerima u topikalnoj isporuci različitih lekova [36, 215, 223], što se može smatrati prednošću u odnosu na konvencionalno korišćene etoksilovane PAM. Međutim, treba da se napomene da je sprovedena studija ograničena na mali broj ispitanika, i da je za donošenje generalnih zaključaka o iritacionom potencijalu različitih grupa surfaktanata neophodno daleko sveobuhvatnije istraživanje uz korišćenje kvantitativno istih mikroemulzija, koje bi se razlikovale samo po tipu upotrebljenog surfaktanta (što u našem slučaju nije bilo izvodljivo zbog prirode komercijalno dostupnih APG i nemogućnosti obrazovanja mikroemulzija uz korišćenje istih ostalih sastojaka kao kod sistema sa etoksilovanim surfaktantima).

Rezultati drugog eksperimenta, u kojem su na deset dobrovoljaca ispitane APG-mikroemulzije (Tabela 4.3) prikazani su na Slici 4.20. 2 h nakon uklanjanja okluzije nije došlo do značajnih promena u vrednostima EI u slučaju APG-1, APG-3 i APG-4, potvrđujući njihovu prihvatljivu podnošljivost na koži (Slika 4.19a). Takođe, uočeni porast EI vrednosti nije bio značajan u odnosu na promene EI koje su se desile kod netretiranih kontrola (NKO i NK). Sa druge strane, EI nakon skidanja okluzije je kod APG-2 uzorka bio značajno viši u odnosu na njegovu bazalnu vrednost, ali u odnosu na NK i NKO je rast EI bio samo neznatno viši. Osim toga, statistički značajne razlike nisu nađene između ispitivanih mikroemulzija, ponovo sugerišući da iritacioni profil mikroemulzija nije bio promenjen ni zamenom surfaktanta ni uljane faze u formulacijama. Analizom SCH i TEGV vrednosti (Slika 4.20 b i c) ustanovljene su značajne promene vrednosti oba biofizička parametra za sva tretirana mesta, i to i kada se poredi sa njihovim inicijalnim vrednostima, kao i u odnosu na NKO. TEGV je rastao, dok je SCH imao trend snižavanja, ukazujući na dehidrataciju kože.

Značajna dehidratacija kože može da bude posledica visoke koncentracije propilenglikola u ispitivanim uzorcima (28-30%, m/m). Ovaj efekat je verovatno potpomognut jakim interakcijama (vodonične veze) hidrosil grupa u strukturi APG surfaktanata sa molekulima vode. Međutim, niska hidratacija kože može da dovede i do poboljšanja penetracije lekovitih supstanci kroz SC [215]. Budući da okluzija kože sama po sebi dovodi do promena barijerne funkcije kože, rast TEGV vrednosti koji je uočen nakon topikalne primene mikroemulzija je očekivan [221]. Naime, dobro je poznata činjenica da sastojci mikroemulzija (i to surfaktanti, kosurfaktanti i ulja) mogu da interferiraju sa lipidima SC i na taj način povećaju njihovu fluidnost [18], što je jedan od mehanizama kojima promovišu penetraciju lekova u kožu putem mikroemulzija.



Slika 4.20. *In vivo* procena bezbednosnog profila APG-mikroemulzija – apsolutna promena vrednosti: a) eritema indeksa (EI), b) hidratacije stratum corneum-a (SCH), i c) transepidermalnog gubitka vode (TEGV); Prikazane su promene za svakog ispitanika (dobijene kao razlika između inicijalnih vrednosti i vrednosti izmerenih 2 h nakon uklanjanja okluzije) sa označenim srednjim vrednostima (dugačka linija) za ispitivane placebo mikroemulzije i netretirane kontrole bez okluzije (NK) i sa okluzijom (NKO). * statistički značajna promena ($p < 0,05$) u poređenju sa inicijalnim vrednostima; # statistički značajna promena ($p < 0,05$) u poređenju sa inicijalnim vrednostima i obema netretiranim kontrolama (NK i NKO); ## statistički značajna promena ($p < 0,05$) u poređenju sa inicijalnim vrednostima i netretiranom kontrolom pod okluzijom (NKO)

Dodatno treba da se istakne da su razlike između ispitivanih APG-mikroemulzija bile neznate kada je reč o njihovom uticaju na posmatrane biofizičke parametre. Iz toga proizilazi da se njihovom primenom ne može očekivati ni značajno različita dermalna raspoloživost ADA.

Dakle, na osnovu promena vrednosti EI indukovanih mikroemulzijama, koje se nisu razlikovale od promena na kontrolnim mestima (NKO i NK), sve APG-mikroemulzije su pokazale zadovoljavajuće preliminarne bezbednosne profile. Simultani pad SCH, paralelno sa porastom vrednosti TEGV, sugeriše moguću fluidizaciju i solubilizaciju lipida SC, što sa druge strane ukazuje da bi ispitivane mikroemulzije mogle da budu efikasni nosači za poboljšanu isporuku ADA u/kroz kožu.

Na kraju, kao poseban aspekt celokupne *in vivo* studije treba da se istakne izbor eksperimentalnih uslova. Naime, kao što može da se uoči, uzorci APG-1 i APG-4 su bili predmet istraživanja u oba dela ove studije, koji su se neznatno razlikovali u postavci – količina nanesenog uzorka (15 ili 25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$), površina test mesta (2 cm \times 2 cm ili 3 cm \times 3 cm), vreme merenja parametara nakon uklanjanja okluzije (3 h ili 2 h). Osim toga, ove dve faze studije su sprovedene na različitim ispitanicima. Međutim, u obe faze *in vivo* studije je pokazano da ispitivane formulacije (APG-1 i APG-4) nisu uzrokovale značajne promene EI u odnosu na njihove bazalne vrednosti, što je u oba slučaja potvrdilo odsustvo iritacije kože izazvano njihovom primenom. Nasuprot tome, iako je u obe studije zabeležen porast TEGV praćen padom SCH, ove promene su očekivano bile značajne samo u eksperimentu u kojem su mikroemulzije primenjene u većoj količini (25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$), a merenje vršeno u kraćem vremenu nakon uklanjanja okluzije (2 h). Na onovu toga može da se zaključi da se funkcija kože tretirane mikroemulzijama zasnovanim na APG potpuno oporavlja već najduže nakon 2-3 h od ukljanjanja 24-h okluzije. Ovakav rezultat, iako dobijen na različitim ispitanicima, ističe u prvi plan važnost eksperimentalne postavke u ovakvom tipu istraživanja i sugeriše da se procena bezbednosti mikroemulzija treba vršiti veoma pažljivo, pri čemu naročit oprez treba da bude preduzet prilikom odabira eksperimentalnih uslova, posebno ukoliko je cilj istraživanja da se dobijeni rezultati porede sa literaturno dostupnim podacima.

4.3. REZULTATI TREĆE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA

Budući da je u prethodne dve faze eksperimentalnog rada pokazano da su odabrane mikroemulzije pogodne za primenu na kožu, stabilne, kao i da je preliminarno potvrđen njihov povoljan bezbednosni profil *in vivo*, kroz treću fazu eksperimenata ove doktorske disertacije je pod *in vitro* uslovima procenjen potencijal odabranih nosača da poboljšaju isporuku model lekovitih supstanci u/kroz kožu.

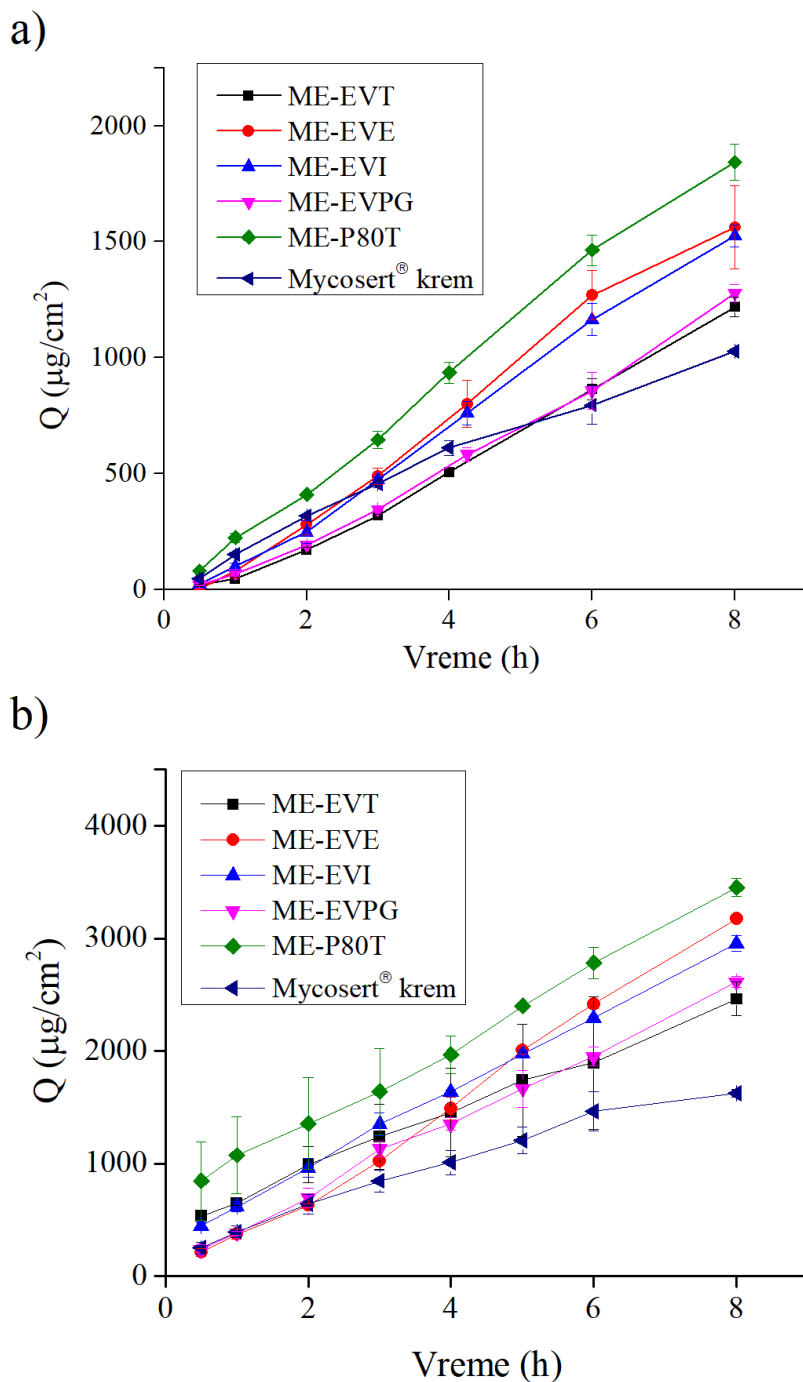
4.3.1. Biofarmaceutske karakteristike mikroemulzija sa SN

4.3.1.1. Procena *in vitro* oslobađanja SN iz mikroemulzija kroz veštačku membranu primenom *Franz*-ovih difuzionih ćelija i imerzionih (inhenser) ćelija

Budući da se testom *in vitro* oslobađanja lekovite supstance iz nosača mogu obezbediti korisne informacije o uticaju različitih faktora uključenih u transport i isporuku leka u/kroz kožu, a samim tim i indirektno njenu terapijsku efikasnost i biološku raspoloživost [224], u ovom delu doktorske disertacije je ispitano da li se razlike u sastavu i sveukupnoj mikrostrukturi odražavaju na *in vitro* liberacione profile SN solubilizovanog u ispitivanim formulacijama. Procena potencijala novijih koloidnih sistema (mikroemulzija) da poboljšaju isporuku SN u tkiva kože je sprovedena primenom *Franz*-ovih difuzionih ćelija, što je bio slučaj i prilikom procene uzoraka sa ADA. Konsultujući relevantnu naučnu literaturu, može se uočiti da se vertikalne difuzione ćelije uobičajeno koriste u svrhe *in vitro* ispitivanja oslobađanja lekovitih supstanci iz mikroemulzija. Takođe, nacrt Vodiča za kvalitet i ekvivalentnost preparata za primenu na koži koji je 2018. godine objavila EMA (engl. *European Medicines Agency*) – *Draft guideline on quality and equivalence of topical products* [225], sugeriše primenu difuzionih ćelija za ovu vrstu ispitivanja.

Ipak, iako je generalni stav da se za isti lekoviti preparat korišćenjem imerzionih (inhenser) ćelija dobijaju slični rezultati kao u slučaju ispitivanja na difuzionim ćelijama, imerzione ćelije se mnogo ređe primenjuju u te svrhe [226]. Zapravo, prema dosadašnjim saznanjima, u literaturi nisu zabeleženi primeri *in vitro* oslobađanja lekovite supstance iz mikroemulzija paralelnim korišćenjem ove dve različite aparature kako bi se utvrdila njihova pogodnost za primenu kod ove vrste naprednih koloidnih nosača lekova. Stoga, jedan od ciljeva ovog eksperimenta je bio da se uporedi potencijal obe metodologije ponaosob za detekciju varijacija u sastavu i karakteristikama ispitivanih mikroemulzija.

Kao što je prikazano na Slici 4.21 i Tabeli 4.8, kumulativna količina leka oslobođena po jedinici površine dijalizne membrane ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) je bila veća iz mikroemulzija nego iz referentnog preparata sa tržišta, bez obzira na vrstu korišćene aparature. Ovaj trend su pratile i vrednosti transmembranskog fluksa dobijenog za različite formulacije. Međutim, dobijene razlike u oslobađanju SN između koloidnih nosača i komercijalnog krema nisu pokazale statističku značajnost samo u slučaju uzorka ME-EVT ($p = 0,07$) pri ispitivanjima vršenim na *Franz*-ovim ćelijama. Kinetika oslobađanja SN dobijena za isti uzorak primenom *Franz*-ovih i imerzionih ćelija je ostala ista za sve uzorke (Tabela 4.8). Oslobađanje SN iz mikroemulzija se odvijalo kinetikom nultog reda, koji se karakteriše linearnom zavisnošću između kumulativne količine oslobođenog leka po jedinici površine membrane i vremena. S obzirom da model nultog reda ukazuje na konstantno, koncentraciono nezavisno oslobađanje leka, mikroemulzije služe kao rezervoari iz kojih se lek postepeno oslobađa, te se nakon primene mikroemulzija može očekivati zadržavanje leka u koži u toku dužeg vremenskog perioda. Na taj način se može postići produženo farmakološko delovanje leka, što u slučaju SN može da se smatra prednošću [150]. Sa druge strane, oslobađanje leka iz kontrolnog uzorka se razlikovalo i najbolje može da se opiše *Higuchi* kinetičkim modelom, primenljivim kod velikog broja polučvrstih preparata za lokalnu primenu na koži [26]. Ovakva kinetika oslobađanja upućuje na to da se SN iz Mycosert[®] krema oslobađao difuzijom koja je kontrolisana nosačem, kao i to da je lek bar delimično suspendovan u nosaču.



Slika 4.21. Profili oslobađanja SN iz mikroemulzija i referentnog preparata primenom: a) vertikalnih difuzionih ćelija; b) imerzionih ćelija. Podaci prikazuju srednju vrednost \pm SD ($n = 3$)

Fracija leka oslobođenog iz mikroemulzija nakon 8 h je generalno bila niska, dostižući vrednosti od 12,24-18,53% i 16,24-34,53% od primenjene količine, kada su ispitivanja vršena na *Franz*-ovim i imerzionim ćelijama, redom. Dakle, koncentracija leka u akceptorskom medijumu nije bila viša od 30% od ukupne količine leka koja je aplikovana u donorsku komoru aparature. Prema tome, izbegnuta je difuzija SN u donorski deo *Franz*-ovih ćelija i „pravilo 30%“ je ispoštovano [226]. Nasuprot tome, liberacija SN na imerzionim ćelijama je bila nešto viša iz uzoraka ME-EVE i ME-P80T (31,73% i 34,53%, sledstveno).

Tabela 4.8. Parametri oslobađanja SN kroz dijaliznu membranu primenom *Franz*-ovih i imerzionih ćelija

Formulacija	Franz-ove ćelije				Imerzione ćelije			
	Fluks ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}$)	Q_{8h} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Oslobodeni SN u odnosu na primenjenu količinu (%)	Kinetički model (r^2)	Fluks ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}$)	Q_{8h} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Oslobodeni SN u odnosu na primenjenu količinu (%)	Kinetički model (r^2)
ME-EVT	$163,97 \pm 3,90^a$	$1218,39 \pm 41,4^a$	$12,24 \pm 0,42^a$	nulti (0,9927)	$253,40 \pm 6,69$	$2464,04 \pm 148,57^a$	$24,64 \pm 1,49^a$	nulti (0,9958)
ME-EVE	$217,87 \pm 21,70^b$	$1562,44 \pm 178,45^c$	$15,70 \pm 1,79^c$	nulti (0,9937)	$407,20 \pm 12,38^h$	$3172,70 \pm 16,32^g$	$31,73 \pm 0,16^g$	nulti (0,9945)
ME-EVI	$206,64 \pm 6,94^c$	$1524,44 \pm 46,84^c$	$15,32 \pm 0,47^c$	nulti (0,9967)	$333,7 \pm 3,7$	$2954,34 \pm 68,20^g$	$29,54 \pm 0,68^g$	nulti (0,9993)
ME-EVPG	$167,88 \pm 2,28^d$	$1278,05 \pm 38,2^d$	$12,84 \pm 0,38^d$	nulti (0,9925)	$315,70 \pm 6,36$	$2614,91 \pm 46,21^d$	$26,15 \pm 0,46^d$	nulti (0,9976)
ME-P80T	$240,03 \pm 8,42^e$	$1843,71 \pm 78,45^g$	$18,53 \pm 0,79^g$	nulti (0,9967)	$346,30 \pm 7,77$	$3453,40 \pm 78,64^g$	$34,53 \pm 0,79^g$	nulti (0,997)
Mycosert® krem	$127,58 \pm 4,75^f$	$1027,95 \pm 10,42^f$	$10,33 \pm 0,10^f$	<i>Higuchi</i> (0,9942)	$188,80 \pm 11,27^i$	$1624,81 \pm 32,67^f$	$16,25 \pm 0,33^f$	<i>Higuchi</i> (0,9892)

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SD ($n = 3$).

^a statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na ME-EVE, ME-EVI i ME-P80T; ^b statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na Mycosert® krem, ME-EVT i ME-EVPG; ^c statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na Mycosert® krem, ME-EVT, ME-EVPG i ME-P80T; ^d statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na Mycosert® krem, ME-EVE, ME-EVI i ME-P80T; ^e statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na Mycosert® krem, ME-EVT, ME-EVI i ME-EVPG; ^f statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na sve ispitivane mikroemulzije; ^g statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na Mycosert® krem i sve ostale ispitivane mikroemulzije; ^h statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na Mycosert® krem; ⁱ statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na ME-EVE.

Poredeći rezultate dobijene korišćenjem dve različite aparturne postavke (Slika 4.21, Tabela 4.8), očigledno je da su vrednosti transmembranskog fluksa i frakcije oslobođenog SN značajno više iz svih ispitivanih formulacija kada su ispitivanja vršena na imerzionim ćelijama. Ovaj nalaz je u saglasnosti sa zapažanjima dobijenim u sličnim studijama [227], gde je takođe uočeno da je oslobađanje NSAIL bilo daleko izraženije na imerzionim u odnosu na vertikalne difuzione ćelije. Uprkos različitoj količini primenjene formulacije na različitim aparaturama, SN je doziran na isti način u oba eksperimenta – $\sim 0,5 \text{ g/cm}^2$ dijalizne membrane, te se dobijeni rezultati ne mogu pripisati uticaju ovog faktora. Međutim, iako su i ostali eksperimentalni uslovi postavljeni tako da budu što je moguće sličniji, značajna razlika postoji u zapremini receptorske faze (12 ml *Franz*-ove naspram 300 ml imerzione ćelije), što je obezbedilo bolje rastvaranje leka i olakšalo održavanje *sink* uslova. Takođe, na rezultate je moglo da utiče i to što je kod imerzionih ćelija moguća difuzija receptorskog medijuma u odeljak sa formulacijom, što može da promeni njenu mikrostrukturu i/ili rastvorljivost leka u nosaču, što menja i njegovu termodinamičku aktivnost [226, 228]. Ipak, veoma važna da se istakne jeste činjenica da je poredak parametara liberacije SN (Q_{8h} , transmembranski fluks i % oslobođenog leka u odnosu na ukupnu primenjenu količinu leka) isti bez obzira na korišćenu aparaturu: ME-P80T > ME-EVE > ME-EVI > ME-EVPG > ME-EVT > Mycosert® krem (Tabela 4.8). Razlike uočene između efikasnosti formulacija da oslobode lek su postale izraženije kada su ispitivanja sprovedena na imerzionim ćelijama, pri čemu je odsustvo značajnih varijacija zadržano samo između količine SN oslobođene nakon 8 h iz uzoraka ME-EVT i ME-EVPG. Drugim rečima, pokazano je da su i ređe korišćene imerzione ćelije takođe pogodne za *in vitro* ispitivanje oslobađanja lekovite supstance iz mikroemulzionih sistema, kao i to da se njihovom primenom mogu detektovati varijacije u liberaciji leka prouzrokovane razlikama u formulacijama (npr. sastav formulacije, viskozitet, unutrašnja struktura i polarnost sistema, rastvorljivost leka u nosaču).

Nadalje, kao što se može videti iz Tabele 4.8, kumulativna količina oslobođenog SN na kraju eksperimenta, kao i brzina oslobađanja, bile su u direktnoj vezi sa sastavom formulacija. Kada se uporedi sa ostalim mikroemulzionim uzorcima, oslobađanje SN iz ME-EVT se odvijalo manjom brzinom. Analizirajući kvantitativno iste uzorke stabilizovane EV koji sadrže različite kosurfaktante, može da se ustanovi pospešujući efekat kratkolančanih alkohola na liberaciju SN. Međutim, ne postoje značajne razlike između uticaja etanola i izopropanola. Dovodeći u vezu dobijene rezultate sa fizičko-hemijskim karakteristikama ispitivanih uzoraka (Tabela 4.6), može se zaključiti da su na oslobađanje SN uticale reološke osobine. Kumulativna količina oslobođenog leka je bila značajno viša iz uzoraka koji su imali niži viskozitet, što je olakšalo difuziju leka. Ovaj podatak je interesantan, imajući u vidu da je suprotan efekat uočen u slučaju oslobađanja ADA iz mikroemulzija, sugerišući da dobijeni trendovi oslobađanja model lekovitih supstanci zavise od vrste upotrebljenih sastojaka, i da generalne zaključke o uticaju reoloških osobina na oslobađanje lekova treba donositi pojedinačno za svaki slučaj. Dodatno, prema rezultatima EPR studije (Slika 4.13, Tabela 4.5), mikrookruženje međufaznog filma ME-EVE i ME-EVI uzoraka se odlikovalo većom polarnošću i manjom uređenošću u odnosu na ME-EVT. Kao rezultat toga, migracija SN kroz fleksibilniju međufazu je bila poboljšana [200]. Takođe, monosloj S-CoS u ovim sistemima, a naročito njegov polarni deo, ima niži solubilizacioni kapacitet za visoko lipofilni lek što vodi ka njegovoj većoj termodinamičkoj aktivnosti i boljem oslobađanju. Zaista, ovakvi stavovi su u potpunoj saglasnosti sa kapacitetom uzoraka za solubilizaciju leka (Tabela 4.6). Dakle, što je rastvorljivost SN u mikroemulzijama zasnovanim na EV bila veća, oslobađanje leka je bilo slabije, najverovatnije zbog niže termodinamičke aktivnosti leka. Slično ponašanje u oslobađanju celekoksiba iz mikroemulzija su ranije primetili Zvonar i sar. [211]. Zaista, oslobađanje leka je pratilo redosled ME-EVE > ME-EVI > ME-EVPG > ME-EVT, dok je vrednost saturacione rastvorljivosti imala obrnut trend. Dakle, u ovom slučaju se može ustanoviti inverzna zavisnost između oslobađanja SN i solubilizacionog kapaciteta njegovih nosača.

Međutim, rezultati dobijeni sa mikroemulzijom ME-EVPG ne mogu da se objasne niti rezultatima reologije, niti mikropolarnošću i mobilnošću njenog međufaznog filma. Zbog nižeg sadržaja vode u ovom sistemu, niže vrednosti α'_0 , uređenije mikrostrukture i višeg viskoziteta ovog

uzorka, očekivano je slabije oslobađanje leka u odnosu na ME-EVT. Iznenađujuće, liberacija SN je bila viša iz ME-EVPG formulacije, što može da se pripíše drugačijoj lokalizaciji leka unutar nosača (na koju su ukazali EPR rezultati), nižem solubilizacionom kapacitetu nosača za lek i višoj termodinamičkoj aktivnosti.

Konačno, vrsta surfaktanta je takođe odigrala veoma važnu ulogu jer je oslobađanje SN iz ME-P80T, koja se od ME-EVT razlikovala samo po tipu upotrebljenog surfaktanta, bilo značajno više (Slika 4.21, Tabela 4.8) ne samo u odnosu na ME-EVT, nego i na ostale ispitivane mikroemulzije. Neočekivano, ME-P80T koji je imao najveći viskozitet je obezbedio najbolje oslobađanje leka, implicirajući da uticaj reoloških osobina sa zamenom polietoksilovanog surfaktanta nije pratio isti trend promena kao kada je u sistemu menjan kosurfaktant. Objašnjenje za ovakvo ponašanje se može naći u nižoj rastvorljivosti SN u ME-P80T formulaciji, kao i njenim sastojcima (Tabela 4.1 i 4.6). Osim toga, solubilizacija leka u sistemu ME-P80T je dovela do povećanja mikroviskoziteta i stepena uređenosti njegovog međupovršinskog filma, nagoveštavajući da je SN u određenom stepenu interagovao sa polarnim delom S-CoS monosloja i pojačao interakcije sastojaka u ovom delu sistema u pravcu obrazovanja gušćeg pakovanja. Moguće je da je ovaj proces indukovao nastanak kapljične U/V strukture, što se pozitivno odrazilo na oslobađanje leka. Naime, pokazano je da je mobilnost leka veća kad je lek lokalizovan na međupovršini U/V mikroemulzija [55].

Kada se sveobuhvatno sagledaju rezultati *in vitro* oslobađanja SN, karakteristike ispitivanih uzoraka (Tabela 4.6) i rezultati dobijeni EPR merenjima (Slika 4.13, Tabela 4.5), kao logičan se nameće zaključak da je oslobađanje SN iz mikroemulzija bilo dominantno zavisno od rastvorljivosti leka i njegove lokalizacije unutar mikroemulzija. Viskozitet uzoraka i količina vode u njima su takođe mogli da doprinesu procesu oslobađanja leka, pri čemu su suprotne tendencije u količini oslobođenog SN uočene pri zameni surfaktanta, odnosno kosurfaktanta u sistemu.

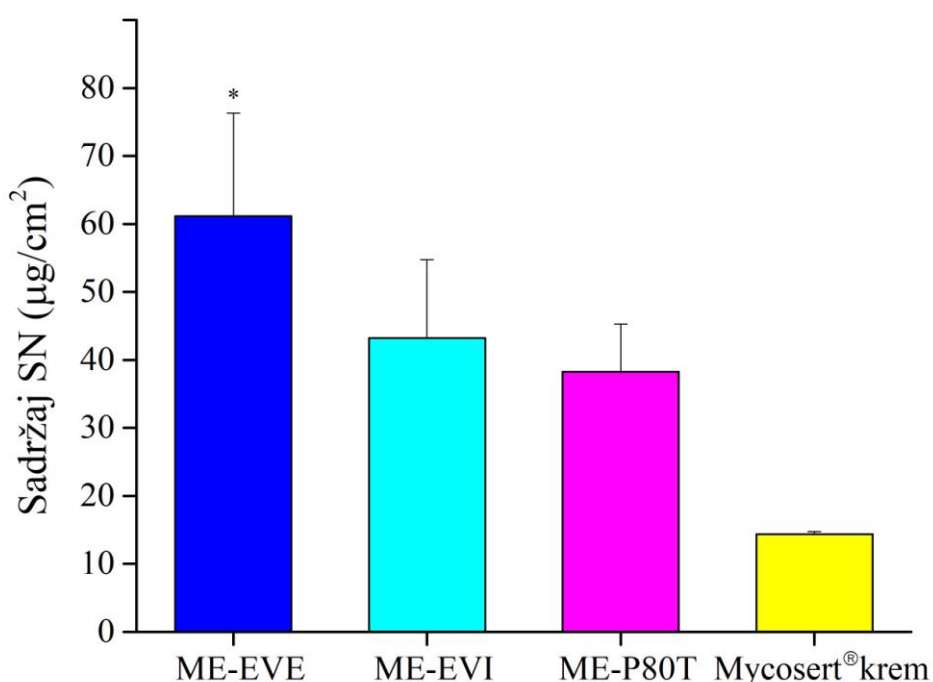
Dodatno, rezultati dobijeni u ovom delu doktorske disertacije su ukazali da selekcija sastojaka za formulaciju mikroemulzionih nosača lekova treba da se vrši obazrivo. Naime, odabir sastojaka je uobičajeno primarno zasnovan na rastvorljivosti model lekovite supstance u različitim uljima i amfifilima, pri čemu se ekscipijensi sa najvećim solubilizacionim kapacitetom za lek smatraju najpogodnijima. Međutim, prema rezultatima ove doktorske disertacije, ne samo da su obrazovane šire mikroemulzione oblasti, nego je postignuto i značajnije oslobađanje leka kada su u formulaciji mikroemulzija korišćeni ekscipijensi sa nižim potencijalom za rastvaranje lekovite supstance.

4.3.1.2. *In vitro* studija penetracije/permeacije SN

Zbog značajno većeg oslobađanja SN, formulacije ME-EVE, ME-EVI i ME-P80T su odabrane za *in vitro* procenu dermalne i transdermalne isporuke leka. Test penetracije/permeacije je sproveden na koži uha svinje pune debljine zbog njene sličnosti sa humanom kožom u pogledu strukture, građe i permeabilnosti, a time pogodnosti ovog modela za simuliranje *in vivo* ponašanja na humanoj koži [4, 229]. Rezultati ove faze istraživanja su prikazani na Slici 4.22 i Tabeli 4.9. Dermalna isporuka SN je određena na osnovu sadržaja leka koji je penetrirao po jedinici površine kože ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) po završetku eksperimenta, te upoređena sa istim parametrom dobijenim nakon primene referentnog preparata sa tržišta. Na taj način je omogućena procena efikasnosti (ER_D – *dermal enhancement ratio*) mikroemulzija kao naprednih nosača za isporuku lekova. Može se primetiti da je inkorporiranje SN u mikroemulzije dovelo do značajnog povećanja akumulacije leka u koži, pri čemu je parametar ER_D dostigao vrednosti u rasponu od 2,66-4,25 (Tabela 4.9). Kao što je ranije pomenuto, bolje performanse mikroemulzija u odnosu na Mycosert[®] krem su verovatno posledica visokog solubilizacionog kapaciteta mikroemulzija za SN i prisustva sastojaka koji deluju kao pojačivači penetracije [55, 61, 79].

Posmatrajući ispitivane mikroemulzione uzorke, najveća količina leka zadržanog u koži je obezbedena primenom ME-EVE formulacije, iako razlike u rezultatima dobijenim sa različitim mikroemulzijama nisu imale statističku značajnost. Sa druge strane, ME-EVE je pokazao superiornu dermalnu isporuku leka u odnosu na kontrolni preparat ($p = 0,0013$). Mikroemulzija

zasnovana na P80 se neočekivano pokazala kao najmanje efikasna u pogledu usmeravanja i akumulacije leka u koži, uprkos tome što je najveća količina leka oslobođena upravo iz ovog uzorka. Budući da je koncentracija leka bila ista u svim mikroemulzijama, koncentracioni gradijent nije mogao da utiče na dobijene rezultate. Međutim, pažljivom analizom bezbednosnih aspekata ME-EVT i ME-P80T mikroemulzija (Slika 4.19) se može primetiti da je povećanje EI kod ispitanika bilo nešto izraženije nakon primene uzorka zasnovanog na EV kao glavnom surfaktantu. Prema tome mogu se pretpostaviti i nešto snažnije interakcije EV naspram P80 sa lipidima kože i promene u barijernim svojstvima SC koje vode ka pospešivanju difuzije lekova u kožu. Takođe, ne treba da se zanemari prisustvo etanola u ME-EVE, kao dobro poznatog inhensera penetracije [230, 231], koji je najverovatnije značajno doprineo dobijenom povećanju dermalne isporuke SN. U saglasnosti sa dostignutim sličnim oslobađanjem SN iz uzoraka stabilizovanih kratkolančanim alkoholima, količina leka ekstrahovanog iz kože tretirane uzorkom ME-EVI je bila neznatno niža u poređenju sa ME-EVE.



Slika 4.22. Rezultati studije penetracije posle primene mikroemulzija i kontrolne formulacije – ukupna količina SN koja je penetrirala u kožu po jedinici površine kože uha svinje nakon 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD (n = 3). * statistički značajna razlika u odnosu na kontrolni uzorak (p < 0,05)

Slične studije su takođe ukazale na izraženije povećanje transporta lokalno primenjenih lekova iz mikroemulzija koje su sadržavale etanol umesto izopropanola [29, 61]. Takođe treba da se napomene, uprkos istom kvantitativnom sastavu ove dve formulacije, zbog prisustva rezidualne vode u etanolu (96% V/V), ME-EVE je verovatno sadržavala nešto veći udeo vodene faze. Shodno tome, primenom ovog sistema može da se očekuje pojačana hidratacija kože i izraženije otvaranje kanala za transport leka u kožu [29, 55]. U svakom slučaju, predloženi mehanizmi povećanja isporuke leka treba da se provere i potvrde odgovarajućim *in vivo* ispitivanjima.

Tabela 4.9. Rezultati *in vitro* studije penetracije i *in vitro* antifungalne aktivnosti ispitivanih formulacija koje sadrže 2 % (m/m) SN

Formulacija	SN deponovan u koži ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	ER _D	Prečnik zone inhibicije rasta gljivica (mm)
ME-EVE	61,14 ± 15,17	4,25	40,0 ± 3,6
ME-EVI	43,22 ± 11,53	3,00	44,00 ± 0,87
ME-P80T	38,28 ± 7,01	2,66	48,00 ± 2,65
Mycosert [®] krem	14,39 ± 0,39	1,00	30,0 ± 0,5

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD (n = 3)

Poredeći penetraciju leka sa njegovim oslobađanjem (Slika 4.21, Tabela 4.8), zanimljivo je da ispitivane formulacije nisu pratile iste trendove. Zaista, kada je reč o penetraciji SN, poredak uzoraka je bio sledeći: ME-EVE > ME-EVI > ME-P80T > Mycosert[®], dok je liberacija leka odgovarala ME-P80T > ME-EVE > ME-EVI > Mycosert[®] redosledu. Dakle, dermalna isporuka leka nije zavisila od njegovog oslobađanja. Zapravo, što je oslobađanje SN iz mikroemulzija bilo sporije, zadržavanje leka u koži je bilo izraženije, potvrđujući da se solubilizacijom SN u mikroemulzijama može postići produženo delovanje leka. Dodatno, penetracija leka u kožu iz mikroemulzija (ME-EVE > ME-EVI > ME-P80T) je bila obrnuto proporcionalna solubilizacionom kapacitetu nosača za SN (ME-EVE < ME-EVI < ME-P80T). Prema tome, niža akumulacija leka u koži tretiranoj uzorkom ME-P80T može da se pripíše različitoj distribuciji SN, njegovoj boljoj rastvorljivosti, a time i većim afinitetom za nosač nego za tkiva kože [62]. Takođe, prisustvo sastojaka koji deluju kao pojačivači penetracije je doprinelo poboljšanju transporta leka u kožu. Čini se da su etanol i izopropanol u kombinaciji sa EV imali izraženiji uticaj u odnosu na P80 i Transcutol[®] P. Iako je opšteprihvaćeno da Transcutol[®] P ispoljava efekte penetracionog inhensera *per se* [232], pokazano je da je njegovo delovanje bilo slabije u odnosu na efekte kratkolančanih alkohola [230], za koje je poznato da povećavaju fluks lekova delovanjem različitih mehanizama [233]. Osim toga što menjaju hidrofилne/lipofilne karakteristike mikroemulzionih sistema i na taj način utiču na difuzivnost solubilizovanog leka, zbog penetracije u monosloj koji obrazuje primarni surfaktant na međufazi mikroemulzija, dolazi do povećanja fluidnosti međupovršinskog filma. Slično tome, prisustvo alkohola utiče na rotacionu slobodu acil lanaca lipida kože dovodeći do fluidizacije intercelularnog lipidnog matriksa [231]. Dakle, osim uticaja na rastvorljivost leka u nosaču, etanol takođe ekstrakcijom lipida i njihovom fluidizacijom menja strukturu bioloških membrana što za posledicu ima povećanu propustljivost kože za lekovitu supstancu [196]. Zaista, EPR studija je ukazala na fluidniju i više fluktuiruću međupovršinu vehikuluma koji sadrže kratkolančane alkohole, što je moglo da pospeši njihove interakcije sa kožom. Dodatno objašnjenje za dobijene rezultate penetracije SN u kožu mogla bi da bude supersaturacija nosača i povećanje termodinamičke aktivnosti leka što je uobičajeno kod formulacija koje sadrže isparljive sastojke (ME-EVE i ME-EVI). Međutim, ova mogućnost može da se isključi jer su tokom celog ispitivanja održavani okluzivni uslovi.

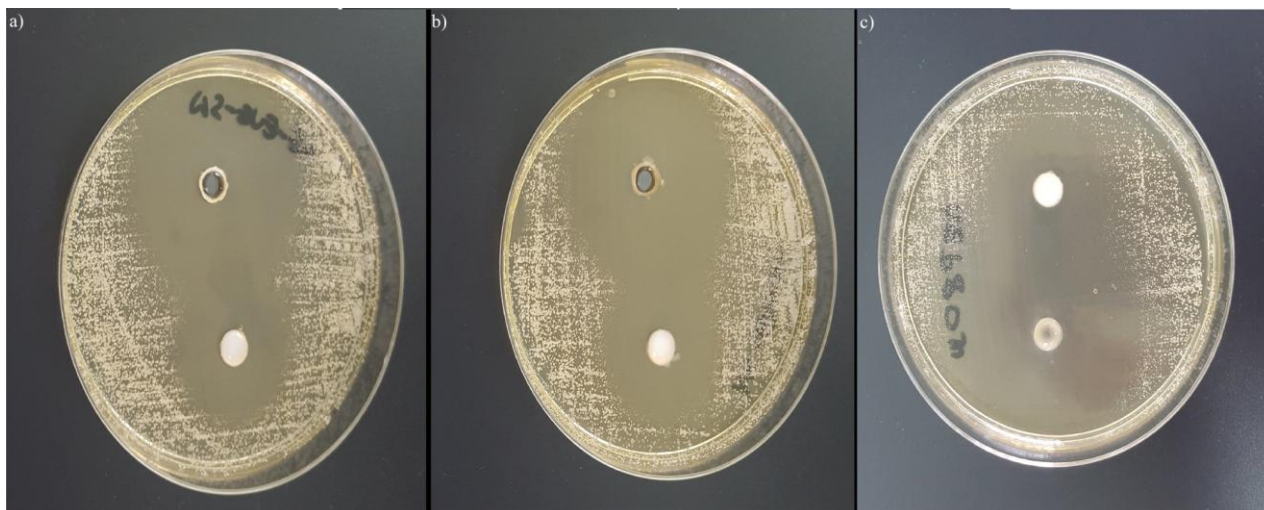
Kada je reč o prolasku leka kroz kožu u receptorski medijum, potrebno je da se naglasi da SN nije detektovan u analiziranim uzorcima uzimanim u definisanim vremenskim intervalima. Prema tome, prolazak leka u sistemsku cirkulaciju nije očekivan, takođe ni pojava sistemskih neželjenih reakcija na lek, što znači da bi se primenom ispitivanih mikroemulzija mogla postići ciljna dermalna isporuka leka [141].

Konačno, uprkos tome što sadrže različite kosurfaktante (što otežava međusobno poređenje formulacija), uzorci koji sadrže EV su pokazali veći potencijal za isporuku SN u kožu u odnosu na uzorak sa P80. Poredeći uticaj vrste kosurfaktanta, viša efikasnost se može pripisati uzorku sa etanolom, potvrđujući ranije zabeležene rezultate [29, 61, 234]. Takođe, rezultati ove faze eksperimentalnog rada su istakli nemogućnost sintetskih membrana da predvide kompleksne

interakcije koje se odvijaju između formulacija i kože i potrebu za obaveznim izvođenjem testova penetracije/permeacije prilikom procene performansi preparata za lokalnu primenu.

4.3.1.3. *In vitro* ispitivanje antifungalne aktivnosti mikroemulzija sa SN

Antifungalna aktivnost ME-EVE, ME-EVI i ME-P80T je procenjena i upoređena sa efikasnošću komercijalno dostupnog preparata (Mycosert® krem) kao pozitivne kontrole, kao i u odnosu na negativnu kontrolu (fosfatni pufer pH vrednosti 7,4). Slika 4.23 jasno ilustruje rast gljivica i sposobnost testiranih formulacija da ga inhibiraju. Ispitivanjem je ustanovljeno da su sve odabrane mikroemulzije značajno efikasnije sprečavale razmnožavanje gljivica u odnosu na pozitivnu kontrolu (Slika 4.23). Prosečne vrednosti prečnika zone inhibicije, koja je bila parametar na osnovu kojeg je procenjena antifungalna aktivnost uzoraka, su predstavljene u Tabeli 4.9. Rezultati mikrobioloških ispitivanja nisu bili sinhronizovani u potpunosti sa studijom penetracije. Preciznije, kao najefikasnija se pokazala ME-P80T, čija je prosečna zona inhibicije rasta *Candida albicans* imala prečnik $48,00 \pm 2,65$ mm. Snažnija antifungalna aktivnost mikroemulzije sa P80 potencijalno može da kompenzuje nižu penetraciju leka postignutu njenom primenom. Prema tome, sve tri mikroemulzije ispitane u ovom i prethodnom potpoglavlju ove doktorske disertacije, mogu dalje da se proučavaju kao obećavajući nosači za poboljšanu dermalnu isporuku SN, bez gubitka antimikotičkog delovanja leka, odnosno kompromitovanja terapijske efikasnosti.



Slika 4.23. *In vitro* antifungalna aktivnost formulacija: a) ME-EVE, b) ME-EVI i c) ME-P80T u odnosu na Mycosert® krem, određena na soju *Candida albicans*

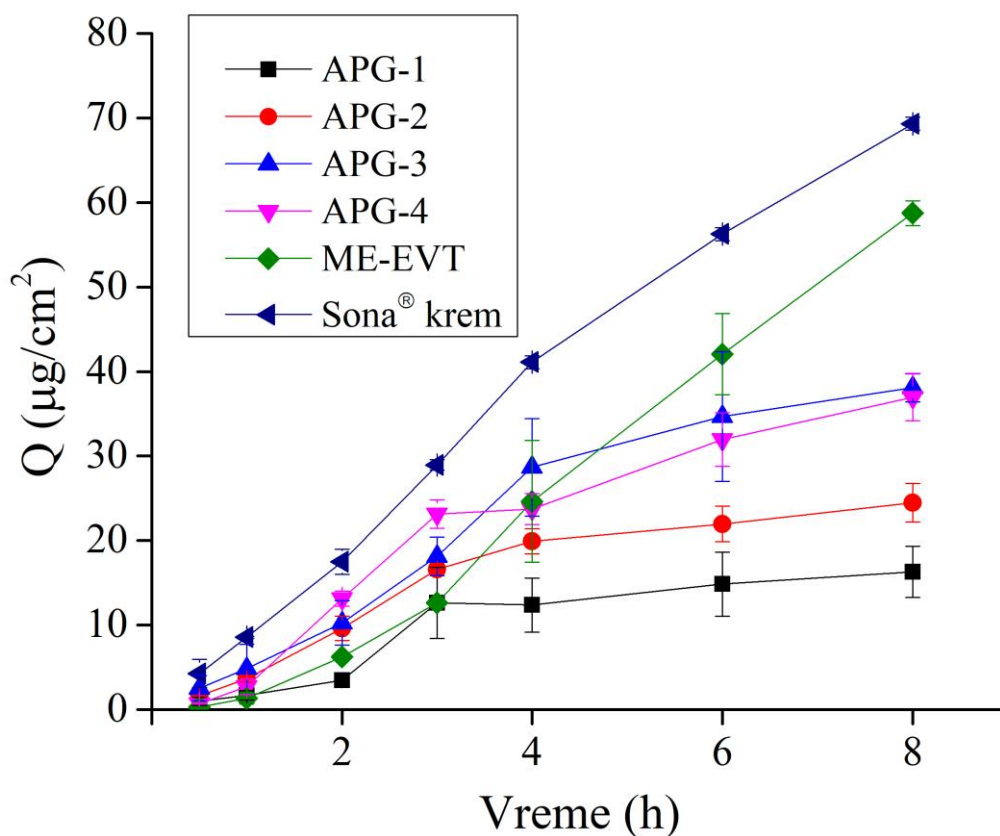
4.3.2. Biofarmaceutske karakteristike mikroemulzija sa ADA

4.3.2.1. Procena *in vitro* oslobađanja ADA kroz veštačku membranu primenom Franz-ovih difuzionih ćelija

Procena brzine oslobađanja ADA iz mikroemulzija kao novijih koloidnih nosača lekova je sprovedena *in vitro* primenom vertikalnih difuzionih ćelija (Franz-ovih ćelija) opremljenih sintetskim dijaliznim membranama.

Kumulativna količina ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) leka oslobođenog tokom 8 h iz svih ispitivanih mikroemulzija je bila niska i oslobađanje je bilo usporeno, što je prikazano na Slici 4.24. Kao što se može uočiti, *in vitro* profili oslobađanja ADA su ispoljili karakteristično i kompleksno ponašanje, sa malom brzinom oslobađanja tokom prvih 1-2 h i poslednjih 4 h. Korelacija oslobađanja leka sa matematičkim modelima iz APG-mikroemulzija je bila relativno niska ($r^2 < 0,97$) (Tabela 4.10), što se može pripisati kompleksnim i dinamičnim strukturnim transformacijama koje se odigravaju u

uzorcima tokom ispitivanja. Ipak, oslobađanje leka iz uzoraka APG-1 i APG-3 se najbolje može opisati modelom prvog reda, ukazujući na oslobađanje ADA kontrolisano kapacitetom nosača za lekovitu supstancu. Sa druge strane, oslobađanje ADA iz mikroemulzija APG-2 i APG-4 je bilo kontrolisano nosačem, što se najbolje može opisati *Higuchi* modelom. Interesantno, statistički značajne razlike u ukupnoj količini leka oslobođenog na kraju eksperimenta postoje između svih ispitivanih uzoraka, osim u slučaju APG-3 i APG-4 mikroemulzija. Takođe je zanimljivo i što je nosač sa polietoksilovanim surfaktantom obezbedio bolje oslobađanje ADA u odnosu na APG-mikroemulzije i linearni difuzioni trend, koji se najbolje uklapao u nulti model (Tabela 4.10), ukazujući na konstantno, koncentraciono nezavisno oslobađanje leka. Poboljšano oslobađanje ADA iz ME-EVT uzorka, delimično nije očekivano jer ostali uzorci sadrže veću količinu vode, što je uobičajeno povoljniji scenario za oslobađanje leka iz ove vrste koloidnih nosača lekova. Međutim, pretpostavke o uzrocima ovakvog ponašanja je teško postaviti, s obzirom na različit i kvalitativni i kvantitativni sastav ME-EVT u odnosu na ostale mikroemulzije. Posmatrajući fizičko-hemijske karakteristike ispitivanih uzoraka (Tabela 4.7), može se uočiti da ME-EVT formulacija ima niži viskozitet, što je verovatno omogućilo bolju difuzivnost leka.



Slika 4.24. Profili oslobađanja ADA iz mikroemulzija zasnovanih na APG, odnosno EV i iz referentnog preparata. Podaci prikazuju srednju vrednost \pm SD ($n = 3$)

Među ispitivanim uzorcima, najniži stepen oslobađanja leka je uočen kod APG-1 sistema ($Q_{8h} = 16,30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Čini se da je vrsta APG surfaktanta imala značajnu ulogu na ovaj biofarmaceutski parametar, s obzirom da je oslobađanje leka iz APG-4 uzorka zasnovanog na P810 bilo značajno bolje – $36,97 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Dodatnom analizom sistema sa P2000 koji sadrže različitu vrstu ulja, a imaju isti kvantitativni sastav, može se ustanoviti povoljan uticaj monoglicerida na oslobađanje ADA. Ovaj efekat se može pripisati većoj hidrofilnosti APG-2 i APG-3 nosača, koja je pretpostavljena na osnovu rezultata DSC. Dakle, međufazni film ova dva uzorka je verovatno polarniji i pokretljiviji u odnosu na APG-1, što pospešuje oslobađanje leka koji je solubilizovan u

ovom delu sistema [200]. Naime, lek će imati veću mobilnost ukoliko je lociran na međufazi hidrofiličnih mikroemulzija [55]. Ipak, uticaj glicerol-monokaprilata (I742), koji ima neznatno kraći alkil lanac u odnosu na glicerol-monokaprilat/kaprat (I988) je bio neočekivano više izražen i statistički značajan. Korelirajući dobijene rezultate sa fizičko-hemijskim karakteristikama ispitivanih mikroemulzija (Tabela 4.7), čini se da je oslobađanje leka povezano sa razlikama u reološkim karakteristikama nosača zasnovanih na P2000. Zaista, oslobađanje ADA je pratilo poredak APG-3 > APG-2 > APG-1, dok su vrednosti njihovog prividnog viskoziteta poređane na suprotan način. Kumulativna količina leka oslobođenog u receptorski medijum je bila viša iz uzoraka koji imaju veći viskozitet, što nije očekivano budući da je u literaturi ranije zabeleženo poboljšano oslobađanje solubilizovanog leka iz bikontinuiranih mikroemulzionih vehikuluma nižeg viskoziteta [215]. U svakom slučaju, kada je reč o retinoidima, usporeno oslobađanje leka se može smatrati i prednošću, s obzirom da može da vodi ka poboljšanom zadržavanju leka u koži tokom dužeg perioda. Na taj način se smanjuje mogućnost za pojavu “retinoidne reakcije” koja je koncentraciono zavisna [144].

Tabela 4.10. Vrednosti koeficijenta determinacije (r^2) za različite modele kojima se opisuju profili brzine oslobađanja ADA iz mikroemulzija

Formulacija	Model			
	Model nultog reda	Higuchi model	Model prvog reda	Korsemeier-Peppas model
APG-1	0,8292	0,8940	0,8841	0,7930
APG-2	0,8696	0,9519	0,9633	0,7553
APG-3	0,9368	0,9660	0,9142	0,9108
APG-4	0,9169	0,9745	0,9599	0,4596
ME-EVT	0,9862	0,9214	0,7855	0,9801
Sona [®] krem	0,9844	0,9879	0,9054	0,9834

Interesantno, oslobađanje ADA iz referentnog krema se razlikovalo od oslobađanja postignutog primenom mikroemulzija i bilo je značajno više, što je delimično bilo neočekivano. Podaci dobijeni u studiji za Sona[®] krem su se najbolje uklapali u *Higuchi* kinetički model, što znači da je oslobađanje leka difuzijom bilo kontrolisano nosačem. Takođe, kao što je ranije objašnjeno, ovakav način oslobađanja ukazuje i da je lek u referentnom preparatu prisutan u suspendovanoj formi bar delimično, što je povećalo njegovu termodinamičku aktivnost. Stoga su slobodni kristali leka u direktnom kontaktu sa receptorskim medijumom, ubrzavajući njegovo rastvaranje. Dobijena manja količina oslobođenog ADA iz koloidnih nosača lekova naspram komercijalno dostupnog konvencionalnog farmaceutskog oblika je u saglasnosti sa ranijim rezultatima dobijenim sa drugim nano-nosačima ove lekovite supstance [171]. Ovaj fenomen može da se objasni visokom lipofilnošću ADA ($\log P = 8,04$), zbog čega lek, umesto da se oslobodi u vodeni medijum, postaje manje mobilan i radije ostaje u nosaču [171, 184], verovatno zbog interakcija molekula ADA sa S-CoS i uljanom fazom u mikroemulzionim sistemima.

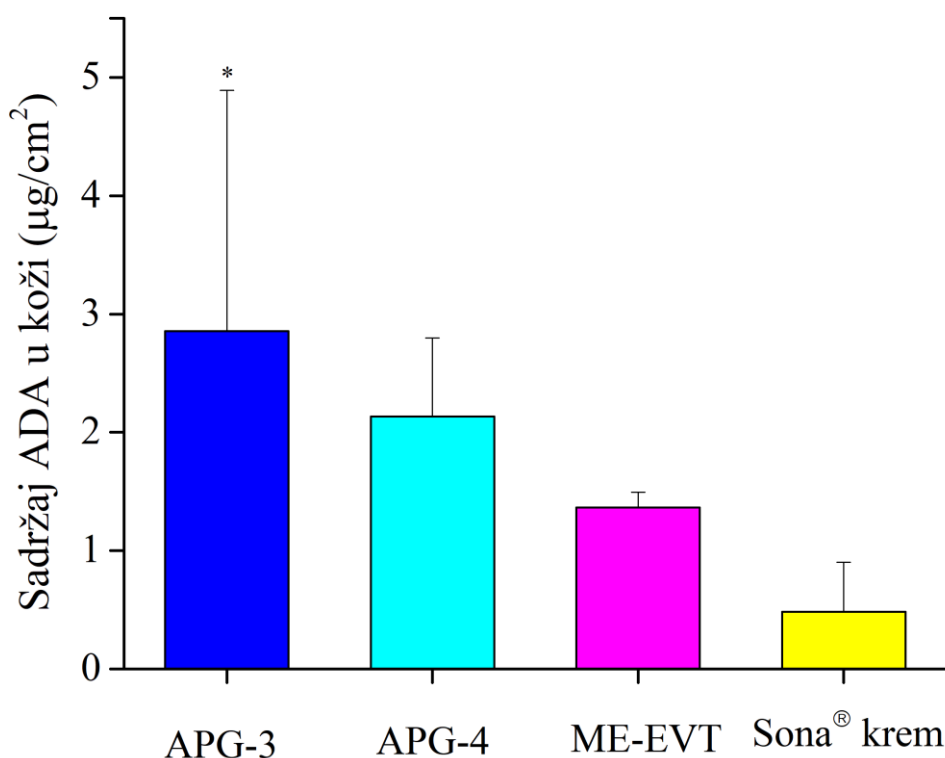
Shodno rezultatima ove faze istraživanja, zbog značajno nižeg oslobađanja ADA iz mikroemulzija APG-1 i APG-2, za dalja *in vitro* biofarmaceutska ispitivanja su odabrane tri formulacije – APG-3, APG-4 i ME-EVT, kao i referentni preparat sa tržišta.

4.3.2.2. *In vitro* studija penetracije/permeacije ADA

Kako bi se procenila isporuka ADA u kožu, odnosno potencijal uzoraka odabranih u prethodnoj fazi ove doktorske disertacije da poboljšaju dermalnu raspoloživost ove lekovite supstance, studija penetracije/permeacije je sprovedena na *Franz*-ovim difuzionim ćelijama koristeći svinjsku kožu pune debljine. Premda nacrt vodiča za uspostavljanje permeacionih profila topikalnih preparata [225] koji je predložila EMA preporučuje da se za ovakvu vrstu ispitivanja koristi koža humanog porekla zbog zakonskih okolnosti i ograničenih izvora dobijanja humane

kože, u ovom eksperimentu je korišćena koža uha svinje kao prihvatljiva i odgovarajuća zamena za ljudsku kožu [4, 229].

Rezultati dobijeni u ovoj studiji su predstavljeni na Slici 4.25 kao ukupna količina ADA koja je zadržana u koži na kraju 24-h eksperimenta. Dermalna isporuka ADA je procenjena na osnovu sadržaja leka ekstrahovanog iz kože tretirane mikroemulzionim formulacijama i ovaj parametar je poređen sa količinom leka koja je zadržana u koži nakon primene Sona[®] krema. Ovaj odnos (ER_D) je predstavljao meru efikasnosti mikroemulzija u dermalnoj isporuci ADA. Za razliku od rezultata *in vitro* brzine oslobađanja lekovite supstance, opisanih u prethodnom poglavlju, inkorporiranje ADA u odabrane mikroemulzije je povećalo zadržavanje leka u koži u odnosu na primenu referentnog preparata sa tržišta, pri čemu je dermalna raspoloživost ADA bila 1,6-5,9 puta viša kada su korišćene mikroemulzije. Dakle, može se zaključiti da zadržavanje leka u koži nije bilo u saglasnosti sa njegovim oslobađanjem iz nosača. Zaista, najveća količina ADA je oslobođena iz preparata sa tržišta, ali je i najmanje leka zadržano u koži upravo nakon primene ovog uzorka, što je ponovo direktan pokazatelj nemogućnosti sintetskih membrana da predvide kompleksne interakcije koje se odigravaju između kože i formulacija koje se na nju aplikuju.



Slika 4.25. Rezultati penetracije ADA posle primene mikroemulzija i kontrolne formulacije – količina ADA deponovana u koži uha svinje nakon 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD (n = 3-6). * statistički značajna razlika u odnosu na kontrolni uzorak ($p < 0,05$)

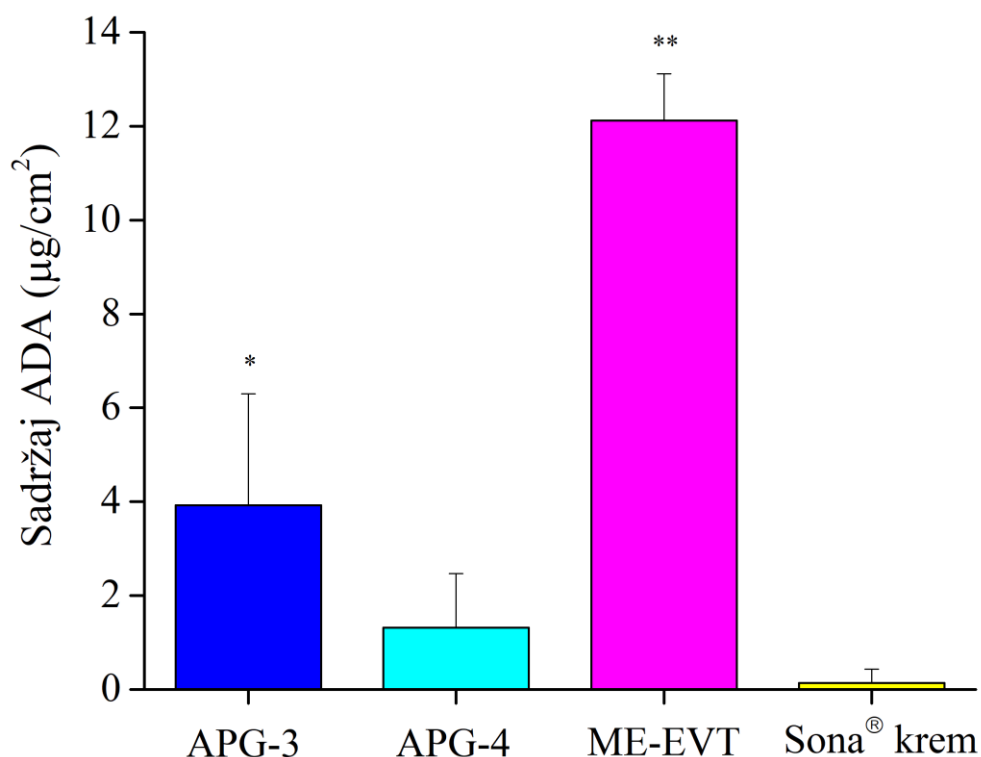
Poboljšano zadržavanje leka u koži primenom mikroemulzija je rezultat više različitih mehanizama: visokog solubilizacionog kapaciteta, blagog narušavanja integriteta kožne barijere (koje je potvrđeno u *in vivo* studiji opisanoj u potpoglavlju 4.2.4. ove doktorske disertacije) delovanjem sastojaka vehikuluma koji se ponašaju kao inhenseri penetracije [55, 79]. Formulacija APG-3 je bila superiorna u odnosu na Sona[®] krem, kada je reč o penetraciji ADA u kožu. Interesantno, iako je oslobađanje ADA bilo više iz ME-EVT nosača naspram mikroemulzija zasnovanih na APG, ova formulacija je dovela do manjeg poboljšanja isporuke ADA u kožu, što je donekle i bilo očekivano, uzimajući u obzir da ovaj uzorak ima niži sadržaj vode. S obzirom na

razlike u kvantitativnom i kvalitativnom sastavu APG-uzoraka i ME-EVT, poboljšanje penetracije ADA iz APG-mikroemulzija ne može se sa sigurnošću pripisati vrsti/količini upotrebljenih sastojaka ispitivanih sistema. Takođe, iako razlika nije imala statističku značajnost ($p = 0,73$) (zbog visoke devijacije dobijenih rezultata), čini se da je kombinacija decil-glukozida (P2000) sa gliceril-monokaprilatom/karatom (I742) imala izraženiji uticaj na preuzimanje leka u kožu nego kombinacija kaprilil/kapril-glukozida (P810) i propilenglikol-monokaprilata (C90). Uporište za ovakvu pretpostavku može da bude već demonstrirana sposobnost parcijalnih glicerida kaprilne i kaprinske kiseline da povećaju dermalnu isporuku lipofilnih jedinjenja [46, 48, 74]. Takođe treba da se uoči da APG-4 formulacija ima neznatno niži sadržaj vode, što je moglo da doprinese ovakvom efektu [55]. Ipak, dobijeni rezultati ukazuju da je izbor uljane faze imao nešto izraženiji uticaj na potencijal sistema da naruše funkciju kožne barijere i isporuče lek u kožu nego vrsta i koncentracija surfaktanta. Osim toga, još jedno objašnjenje za veću penetraciju ostvarenu primenom APG-3 mikroemulzije u odnosu na ostale uzorke može da bude i njihova različita mikrostruktura na molekularnom nivou, poput različitog oblika dispergovane faze, što se može detaljnije ispitati primenom difrakcije X-zraka pod malim uglom (engl. *Small-angle X-ray Scattering* – SAXS). Naime, ranije je dokumentovano da mikroemulzije koje imaju izdužene kapi unutrašnje faze dovode do povećanja permeacije flufenaminske kiseline [235], što nije bilo očekivano jer su ostale ispitivane mikroemulzije sadržavale više vodene faze (koja obično obezbeđuje veći transport leka u/kroz kožu), ali su imale i sferične kapi dispergovane uljane faze.

Kako bi se ispitala sistemska isporuka ADA i isključili potencijalni teratogeni neželjeni efekti razvijenih mikroemulzija, kao i komercijalnog preparata, sprovedena je studija permeacije. Kumulativna količina ADA koja je prošla u akceptorski medijum nakon 24-h kontakta formulacija sa kožom uha svinje, kao indikator prisustva leka u sistemske cirkulaciji, je prikazana na Slici 4.26. Pod korišćenim eksperimentalnim uslovima, lek je kvantifikovan u akceptorskoj komori samo u uzorcima uzetim na kraju eksperimenta (24 h), dok u uzorcima koji su uzeti u prethodnim vremenskim tačkama (2 h, 4 h, 6 h, 8 h) ADA nije detektovan. Imjući u vidu da se ADA obično primenjuje jednom dnevno (uveče, pre spavanja), a frekventnost primene može da bude i manja (u zavisnosti od kliničke slike i ispoljavanja neželjenih efekata), kontakt leka sa kožom ne bi trebalo da bude duži od 8 h zbog uobičajenog jutarnjeg čišćenja kože i higijenskih navika pacijenata, te se pretpostavlja da u ovom vremenskom intervalu ne bi došlo do perkutane resorpcije ADA. Ovo je dodatno potkrepljeno činjenicom da, zbog kontakta kože sa odećom ili drugim površinama, kao i delovanja znoja, topikalni preparati ne ostaju na koži duže od 6 h [143].

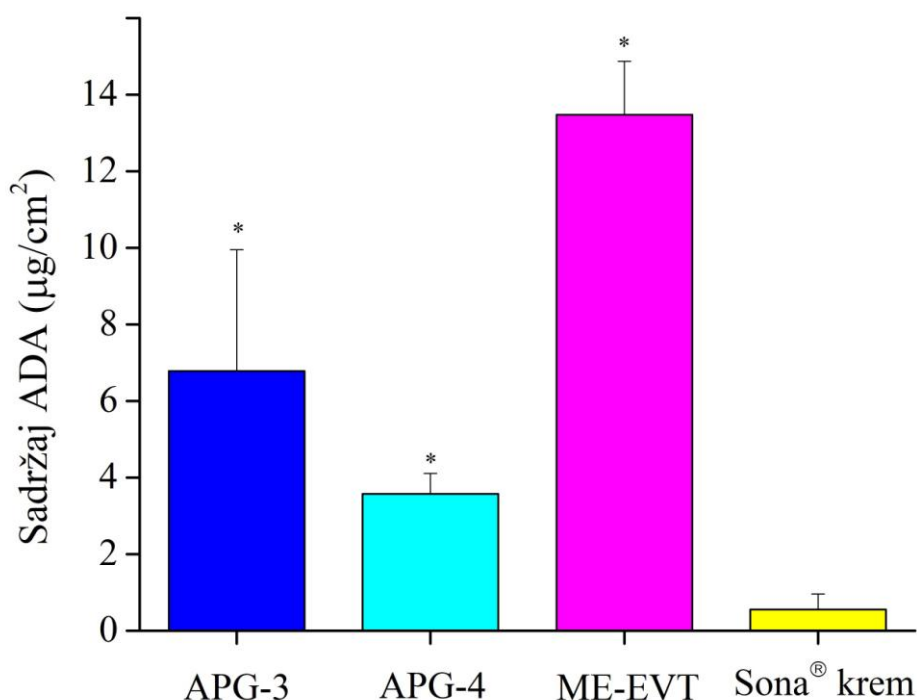
Dobijeni rezultati permeacije su bili u saglasnosti sa studijom penetracije – kada se mikroemulzije formulacije poredi sa konvencionalnim farmaceutskim oblikom (Sona[®] krem), mikroemulzije su povećale ukupnu količinu leka koja je permeirala kroz svinjsku kožu pune debljine. Ovaj efekat je bio značajan za dva uzorka – APG-3 i ME-EVT ($p = 0,0034$ i $p < 0,0001$, sledstveno). Slično rezultatima dobijenim u studiji penetracije, APG-3 je doveo do nešto veće permeacije ADA u odnosu na drugi APG-nosač, što se takođe može objasniti uticajem ulja i organizacijom unutrašnje strukture sistema na molekularnom nivou. Međutim, permeacija leka iz ME-EVT formulacije je bila neočekivano značajno viša u odnosu na sve ostale ispitivane uzorke, iako je upravo ovaj nosač obezbedio najniže zadržavanje leka u koži. Pažljivom analizom nalaza dobijenih u prethodnim fazama biofarmaceutske karakterizacije (*in vitro* brzina oslobađanja leka i *in vitro* studija penetracije), čini se ipak da je značajno veća količina oslobođenog leka uticala na rezultate permeacije i da je takođe veća količina ADA oslobođena i u kontaktu sa kožom, ali je veći deo ove frakcije difundovao kroz sve slojeve kože u akceptorsku fazu zbog većeg koncentracionog gradijenta na granici između kože i akceptorske faze. Drugim rečima, nameće se zaključak da je transport ADA primenjenog putem ME-EVT uzorka bio previše naglašen za dermalnu isporuku ovog leka i da je u ovom slučaju favorizovana transdermalna isporuka retinoidnog leka. Ipak, treba da se napomene da ovakvi rezultati nisu očekivani ako se ima u vidu visoka lipofilnost ADA. Dodatno, dobijeni rezultati dobro koreliraju sa ranijim zapažanjima Jain i sar. [161, 174] i Najafi-Taker i sar. [171] koji su takođe uočili prisustvo ADA u akceptorskom delu *Franz*-ovih ćelija nakon tretmana kože drugim nanonosačima ADA. Međutim, uprkos zabeleženoj permeaciji leka pod *in*

vitro uslovima, u sprovedenoj *in vivo* studiji nije došlo do apsorpcije leka u sistemsku cirkulaciju [171].



Slika 4.26. Rezultati studije penetracije/permeacije ADA posle primene mikroemulzija i kontrolne formulacije – količina ADA koja je permeirala u akceptorski medijum po jedinici površine kože uha svinje nakon 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD ($n = 3-6$). * statistički značajna razlika u odnosu na kontrolni uzorak ($p < 0,05$); ** statistički značajna razlika u odnosu na ostale mikroemulzije i kontrolni uzorak ($p < 0,05$)

Gledajući sveukupne rezultate dobijene u ovoj fazi istraživanja, primenom odabranih ispitivanih mikroemulzija se može ustanoviti generalni trend povećanja penetracije, ali i permeacije ADA. Ovo bi potencijalno moglo da znači da bi komparabilno deponovanje ADA u koži moglo da se dostigne primenom komercijalnog preparata (koji sadrži 0,1% m/m ADA) i nižih koncentracija leka inkorporiranog u mikroemulzione nosače. Na ovaj način bi se mogli umanjiti dozno zavisni neželjeni efekti retionoidnog leka. Međutim, ove pretpostavke bi trebalo potvrditi sprovođenjem adekvatne *in vivo* studije. Nadalje, ukoliko bi se posmatrala ukupna količina leka koja je penetrirala i permeirala iz mikroemulzija (Slika 4.27), povećanje transporta ADA iz mikroemulzija primenjenih topikalno kretalo bi se u opsegu od 6,5 (APG-4) do ~ 24,5 (ME-EVT) puta više u odnosu na referentni preparat sa tržišta. Iako transdermalna isporuka ADA nije poželjna zbog potencijalnih teratogenih efekata, koncept mikroemulzija se pokazao i na ovom primeru kao uspešan način prevazilaženja kožne barijere, koji bi verovatno više pogodovao isporuci retionoida koji mogu da se primenuju sistemski (izotretinoin).



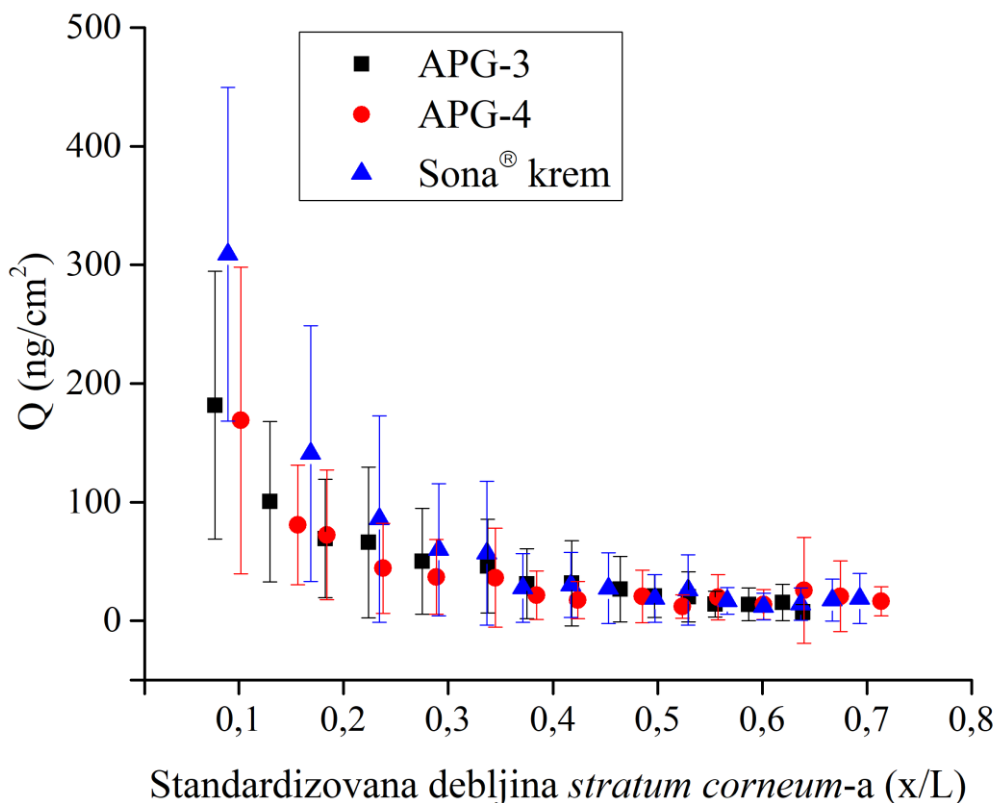
Slika 4.27. Rezultati studije penetracije/permeacije ADA posle primene mikroemulzija i kontrolne formulacije – ukupna količina ADA koja je penetrirala i permeirala u kožu i akceptorski medijum po jedinici površine kože uha svinje nakon 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD (n = 3-6). * statistički značajna razlika u odnosu na kontrolni uzorak i ostale mikroemulzije (p < 0,05)

4.3.2.3. Procena penetracije ADA primenom metode *diferencijalnog stripping-a*

Kako bi se dobile detaljnije informacije o uticaju ispitivanih formulacija na isporuku leka u kožu i ustanovila njihova ekvivalencija sa postojećim preparatom sa tržišta ili njeno odsustvo [225], kao i da bi se obezbedio uvid u udeo transfolikularnog puta transporta ADA u kožu koji u slučaju ADA može da bude veoma značajan, sprovedena je diferencijalna metoda sa adhezivnim trakama (engl. *differential stripping*). Za ovo ispitivanje su odabrane formulacije APG-3 i APG-4 zbog veće količine ADA ekstrahovanog iz kože u studiji penetracije u odnosu na ME-EVT, a niže permeacije. Imajući u vidu da brzina i stepen u kojem se lekovite supstance deponuju u SC korelira sa količinom leka koja dospeva u ciljna tkiva u dubljim slojevima kože, najpre je primenjena konvencionalna metoda sa adhezivnim trakama (engl. *tape stripping*) koja omogućuje dublje sagledavanje dermalne raspoloživosti leka iz ispitivanih formulacija [236]. Nakon toga, primenjena je cijanoakrilatna biopsija kože (koja sa *tape stripping*-om čini *diferencijalni stripping*) sa ciljem da se kvantifikuje količina ADA koja je deponovana u folikule dlaka, kao važne lokuse u patogenezi akni. Osim toga, transfolikularnim putem se zaobilazi intaktan SC i obezbeđuje rezervoar za topikalno primenjene lekove sa ogromnim potencijalom za isporuku lekova u vijabilne slojeve kože [184]. Bitno je napomenuti da je preliminarna studija pokazala da je primena 15 adhezivnih traka dovoljna za uklanjanje leka iz SC (lek nije mogao da se kvantifikuje u trakama primenjenim nakon prvih 15 traka), i prema tome, ADA ekstrahovan cijanoakrilatnom biopsijom može da se definiše kao lek deponovan u folikulima dlaka.

Uprkos određenim ograničenjima, koža uha svinje je korišćena za procenu preuzimanja ADA u SC i folikule dlaka kao pogodan model za humanu kožu [184]. Budući da ADA ima potencijal za indukovanje sistemskih teratogenih i neželjenih efekata na koži [145, 161, 166], kao i da cijanoakrilatna biopsija dovodi do značajnog narušavanja kožne barijere, sprovođenje *in vivo*

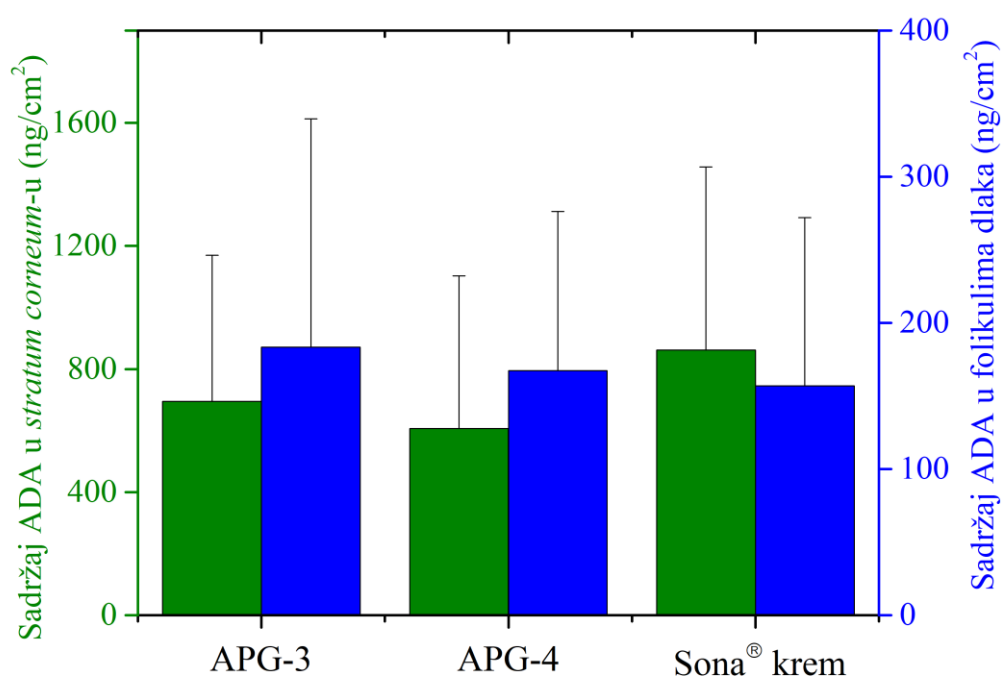
metode sa trakama na humanim dobrovoljcima, koju regulatorna tela preporučuju za ispitivanje ekvivalencije topikalnih preparata, može biti komplikovano. Iz tog razloga, metoda sa adhezivnim trakama je sprovedena *in vitro* na koži uha svinje pod *finite* uslovima doziranja, oponašajući uobičajen način njihove primene u praksi od strane pacijenata.



Slika 4.28. Dermalna raspoloživost ADA procenjena *in vitro* na koži uha svinje primenom metode sa adhezivnim trakama, predstavljena kao zavisnost kumulativne količine penetriranog leka (ng/cm²) i standardizovane debljine SC. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD, n = 5

Na Slici 4.28. je prikazana kumulativna količina penetriranog ADA (ng/cm²) nakon 1-h aplikacije ispitivanih formulacija u zavisnosti od normalizovane (standardizovane) debljine uklonjenog sloja SC (x/L). Kao što se može primetiti, ispitivane mikroemulzije nisu dovele do povećanja nivoa penetracije ADA u SC u odnosu na referentni preparat. Naprotiv, nešto veće količine leka su ekstrahovane iz SC tretiranog Sona[®] kremom (Slika 4.28). Poredeći ove rezultate sa 24-h *in vitro* studijom penetracije/permeacije (pogledati deo 4.3.2.2), ovakav ishod nije očekivan. Međutim, ne treba zaboraviti da delovanje topikalnih preparata zavisi od mnogih faktora, uključujući i eksperimentalne uslove. U tom smislu, neophodno je da se naglasi da je ranija studija penetracije/permeacije sprovedena pod *infinite* uslovima doziranja formulacija, dok je aktuelna metoda sa adhezivnim trakama podrazumevala *finite* način primene uzoraka, koji je reprezentativan za uobičajenu *in vivo* situaciju korišćenja topikalnih preparata u praksi [237]. Druga važna razlika je ta što je procedura *tape stripping*-a sprovedena bez primene okluzivnih uslova, za razliku od studije penetracije/permeacije, u kojoj su difuzione ćelije tokom celog eksperimenta bile pod okluzijom. Dobro je poznato da stepen okluzije može da se odrazi na transport leka tako što dolazi do promena u hidrataciji kože ili u sastavu aplikovanih formulacija zbog isparavanja sastojaka [61, 237]. Prema tome, profili penetracije ADA su se mogli promeniti zbog isparavanja vode iz mikroemulzija i stoga i promene njihove mikrostrukture [18, 55]. Slično, isparavanje sastojaka iz komercijalnog preparata je moglo dovesti do supersaturacije i povećanja termodinamičke aktivnosti leka, kao pokretačke snage za njegov transport u kožu. Osim toga, primena krema koji u svom sastavu sadrži

ciklometikon i skvalen je mogla da dovede do okluzije rožnatog sloja što je pospešilo prelazak ADA u kožu. Takođe treba da se napomene da je procedura sa adhezivnim trakama kratkotrajni eksperiment (1 h), za razliku od ispitivanja penetracije/permeacije (24 h), što je dodatno moglo da se odrazi na dobijene rezultate, naročito imajući u vidu sporije oslobađanje ADA iz mikroemulzija u toku prvih nekoliko časova (Slika 4.24). Kada se dobijeni rezultati uporede sa nalazima zabeleženim u sličnim studijama, komparabilne količine penetriranog ADA u SC su dostignute primenom mikroemulzija zasnovanih na polisorbatu 20 i kontrolne formulacije [69], što potkrepljuje delimično rezultate dobijene u aktuelnoj studiji. Sličan trend su takođe uočili Lauterbach i Müller-Goymann [184] nakon kratkotrajne (30-min) primene disperzije čvrstih lipidnih mikročestica sa inkorporiranim ADA koristeći *finite* uslove njihovog doziranja. Analizirajući posebno penetraciju ADA u SC iz mikroemulzija koje imaju različit kvalitativni i kvantitativni sastav (Tabela 4.3), razlika u količini leka ekstrahovanog iz SC nije značajna, kao što je moglo i da se nagovesti iz *in vivo* studije bezbednosnog profila mikroemulzija, kao i procene penetracije pod *infinite* uslovima doziranja.



Slika 4.29. Rezultati *diferencijalnog stripping-a* – ukupna količina ADA koji je iz mikroemulzija i kontrolnog uzorka penetrirao u SC i folikule dlaka kože uha svinje. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD (n = 5)

Za razliku od sadržaja ADA deponovanog u SC, kvantifikovanje dveju cijanoakrilatnih traka je otkrilo poboljšanu penetraciju leka u folikule dlaka iz mikroemulzija u odnosu na Sona® krem (Slika 4.29). Folikularna akumulacija ADA tokom 1-h izlaganja kože uzorcima je bila u opsegu od $157,00 \pm 114,91$ ng/cm² do $183,30 \pm 156,32$ ng/cm², na mestima tretiranim Sona® kremom i APG-3, sledstveno. Dakle, uzimajući u obzir da su mikroemulzije u odnosu na komercijalno dostupan preparat obezbedile bolju penetraciju leka u kožu i komparabilnu isporuku u folikule dlaka, njihova primena u tretmanu akni deluje obećavajuće. Međutim, uprkos značajnom povećanju dermalne isporuke leka putem APG-3 formulacije, njena primena bi mogla biti ograničena zbog prolaska leka u akceptorsku fazu, što bi moglo da vodi ka nepoželjnoj perkutanoj resorpciji ADA. Iz tog razloga, APG-4 sistem, koji sadrži P810 kao surfaktant i C90 kao uljanu fazu (Tabela 4.3), može da bude u prednosti. Međutim, ovakve navode je potrebno potkrepiti odgovarajućim *in vivo* ispitivanjima.

4.4. REZULTATI I DISKUSIJA ČETVIRTE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA

Kako je u prethodnoj fazi eksperimentalnog rada ove doktorske disertacije potvrđen koncept mikroemulzija kao pojačivača selektivne dermalne isporuke model lekovite supstance (SN), cilj poslednje faze eksperimentalnog rada je bio da se utvrdi da li transport leka u kožu može dodatno da se unapredi kombinovanom primenom fizičkog i hemijskog inženjera penetracije. Preciznije, poslednja faza rada je imala za cilj da se mikroemulzije, kao opcija hemijskog pojačivača penetracije, prevedu u rastvorljive mikroigle, koje poboljšavaju penetraciju lekova u kožu fizičkim narušavanjem barijere SC. Paralelno su rastvorljive mikroigle takođe formulisane i iz rastvora čiste lekovite supstance. Dodatno je u ovoj fazi rada ispitana mogućnost poboljšanja dermalne isporuke SN kombinovanom primenom mikroemulzija i čvrstih silikonskih mikroigala, sa ciljem poređenja efikasnosti različitih pristupa u dermalnoj isporuci leka.

4.4.1. Izrada rastvorljivih mikroigala

Kao što je pomenuto u eksperimentalnom delu ove doktorske disertacije, rastvorljive mikroigle se izrađuju punjenjem šupljina kalupa (uglavnom izrađenih od PDMS) odgovarajućom tečnom formulacijom uz primenu vakuuma i/ili centrifugiranja [104], kako bi se osiguralo potpuno ispunjavanje šupljina kalupa i uklanjanje vazduha. Kao polazna formulacija za izradu rastvorljivih mikroigala, odabrane su mikroemulzije ME-EVE i ME-P80T, koje su se pokazale kao najefikasnije kada je reč o penetraciji SN u kožu. Međutim, imajući u vidu da je u formulaciji rastvorljivih mikroigala neophodna primena polimera ili ugljenih hidrata koji određuju mehaničke osobine i čvrstinu mikroigala [92, 102], sama mikroemulziona formulacija nije pogodna za fabrikovanje ove vrste fizičkog inženjera penetracije. Iz tog razloga, u placebo uzorke ispitivanih mikroemulzija su dodavani različiti biokompatibilni polimeri, koji se često koriste u izradi rastvorljivih mikroigala: PVA, PVP, HPMC i CMC ultra niskog viskoziteta, svi u koncentraciji od 5% m/V izuzev CMC (3% m/V). CMC nije mogla da se disperguje i hidratiše u ME-EVE i ME-P80T, tj. došlo je do njene precipitacije u uzorcima. Sa druge strane, dodatak PVA, PVP i HPMC je rezultovao u rastvaranju polimera u mikroemulzijama te su ove formulacije služile za punjenje PDMS kalupa pomoću kapilare, a kontrola procesa punjenja je vršena pod svetlosnim mikroskopom (Olympus SZ61, PA, SAD). Odmah nakon punjenja, kalupi su ostavljani da se suše u eksikatoru tokom 2 h, odnosno preko noći, kako bi se utvrdilo optimalno vreme sušenja. Međutim, niti jedan od navedenih uslova nije obezbedio formiranje rastvorljivih mikroigala jer nije došlo do sušenja primenjenih formulacija. Razlog za neuspeh u izradi rastvorljivih mikroigala iz mikroemulzija najverovatnije potiče od sastava formulacija, pre svega od prisustva relativno velikih količina ulja i surfaktanata (koji su takođe na sobnoj temperaturi u tečnom agregatnom stanju). Vrlo je moguće da je ovakvom ishodu doprinela i unutrašnja struktura sistema, koja se odlikuje odsustvom potpuno razvijenih U/V kapi. Naime, iako na uspešnost izrade rastvorljivih mikroigala utiče veliki broj formulacionih i eksperimentalnih faktora, među kojima su izbor odgovarajućeg polimera i njegova koncentracija među najznačajnijim [109, 110, 238], treba da se napomene da se ova vrsta mikroigala uglavnom fabrikuje iz vodenih rastvora/hidrogela lekovitih supstanci [94, 109, 110, 113] ili hidro-alkoholnih rastvora [239]. Takođe, iako se u formulaciji rastvorljivih mikroigala koriste surfaktanti kao solubilizatori ili plastifikatori [110, 113, 240], njihova koncentracija je značajno niža nego u mikroemulzijama razvijenim u okviru ove doktorske disertacije. Daljim uvidom u literaturu može se primetiti da je, sa ciljem poboljšane i kontrolisane isporuke lekova, rastvorljive mikroigle moguće izraditi iz svega nekoliko različitih naprednih nosača lekova, kao što su polimerne nanočestice [85, 128-130], nanosuspencije [132, 133] ili mikročestice [134]. Treba da se uoči da su svi navedeni koloidni nosači zapravo korišćeni kao osušeni praškovi ili čvrste čestice/vezikule, koje su neposredno pre izrade dispergovane u vodenoj fazi, koja je činila osnovu formulacija namenjenih za prevođenje u rastvorljive mikroigle. Dodatkom polimera u vodenu sredinu dolazilo je do rastvaranja polimera, a isparavanjem vode nakon punjenja kalupa u sistemima je zaostajao

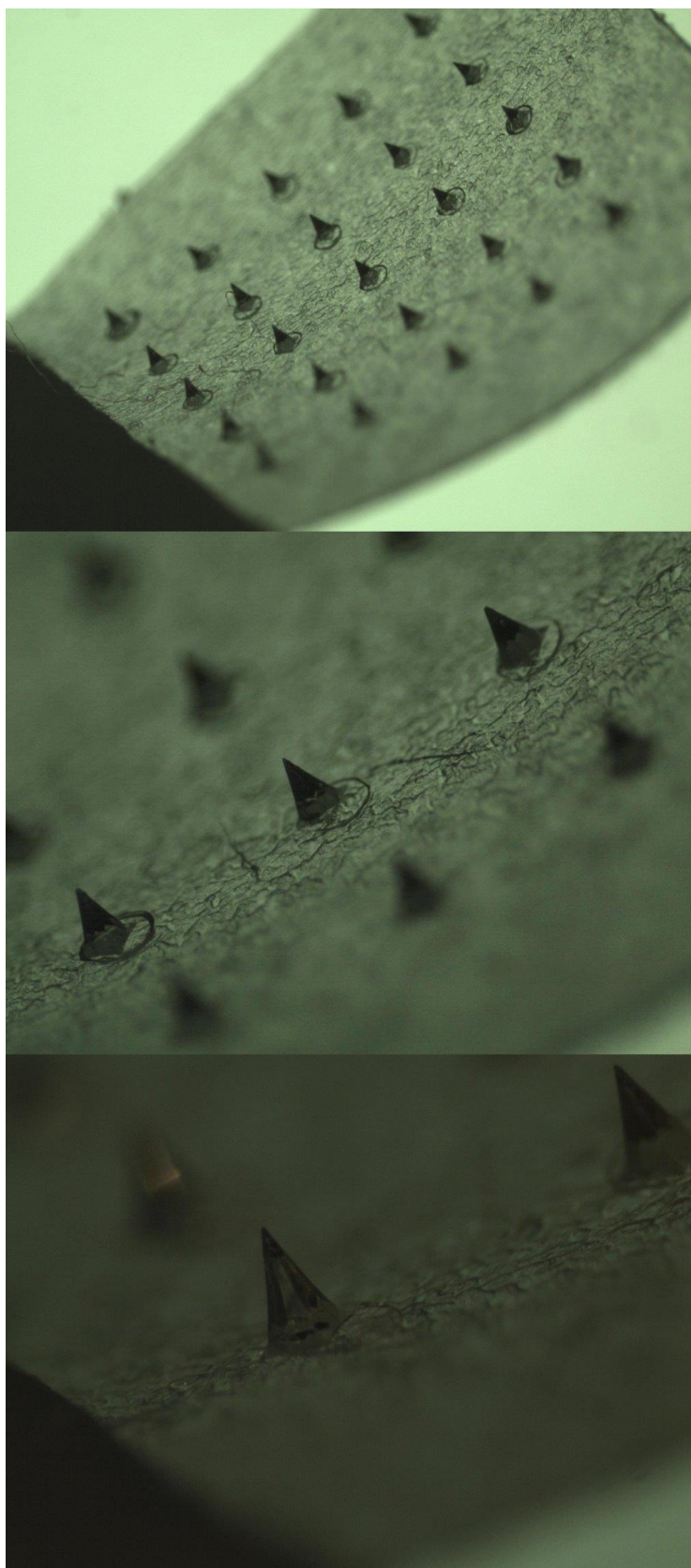
očvrtnuli polimerni matriks koji je sadržavao početnu formulaciju sa aktivnom supstancom. U okviru pomenutih studija je takođe primećeno da je neophodno uložiti dodatne napore u smislu izbora ekscipijenasa i optimizovanja eksperimentalnih uslova za izradu. Shodno tome, čini se da mikroemulzije nisu pogodan vehikulum za prevođenje u rastvorljive mikroigle, bar ne one koje sadrže veliki udeo teško isparljivih tečnih ekscipijenasa. Međutim, mogućnost obrazovanja rastvorljivih mikroigala iz mikroemulzija ne može u potpunosti da se isključi na osnovu rezultata dobijenih na ovako malom broju uzoraka. U tom kontekstu, trebalo bi da se razmotre kapljični U/V sistemi sa nižim sadržajem ulja i PAM, stabilizovani surfaktantima dostupnim u čvrstom agregatnom stanju i isparljivim kosurfaktantima poput alkohola.

Naredni cilj ove faze istraživanja je bio da se rastvorljive mikroigle formulišu iz rastvora leka, kako bi se omogućila komparativna evaluacija potencijala fizičkog i hemijskog pojačivača penetracije SN u kožu. S obzirom na rastvorljivost SN (Tabela 1.6), kao lako isparljiv rastvarač je odabran metanol jer može da obezbedi inkapsulaciju najveće količine SN u rastvorljive mikroigle. Korišćenje organskih rastvarača u fabricaciji rastvorljivih mikroigala je način na koji se može prevazići slaba rastvorljivost lipofilnih lekova u vodi [239]. Naredni korak je bila selekcija odgovarajućeg biokompatibilnog polimera, što je od izuzetnog značaja, kako za obrazovanje odgovarajuće strukture, tako i za biološku prihvatljivost nosača leka. Nakon pažljive analize fizičko-hemijskih karakteristika polimera koji se koriste u fabricaciji mikroigala, naročito njihove rastvorljivosti, za dalja ispitivanja je odabran niskomolekularni povidon (PVP) (Kollidon 17PF, BASF, Nemačka).

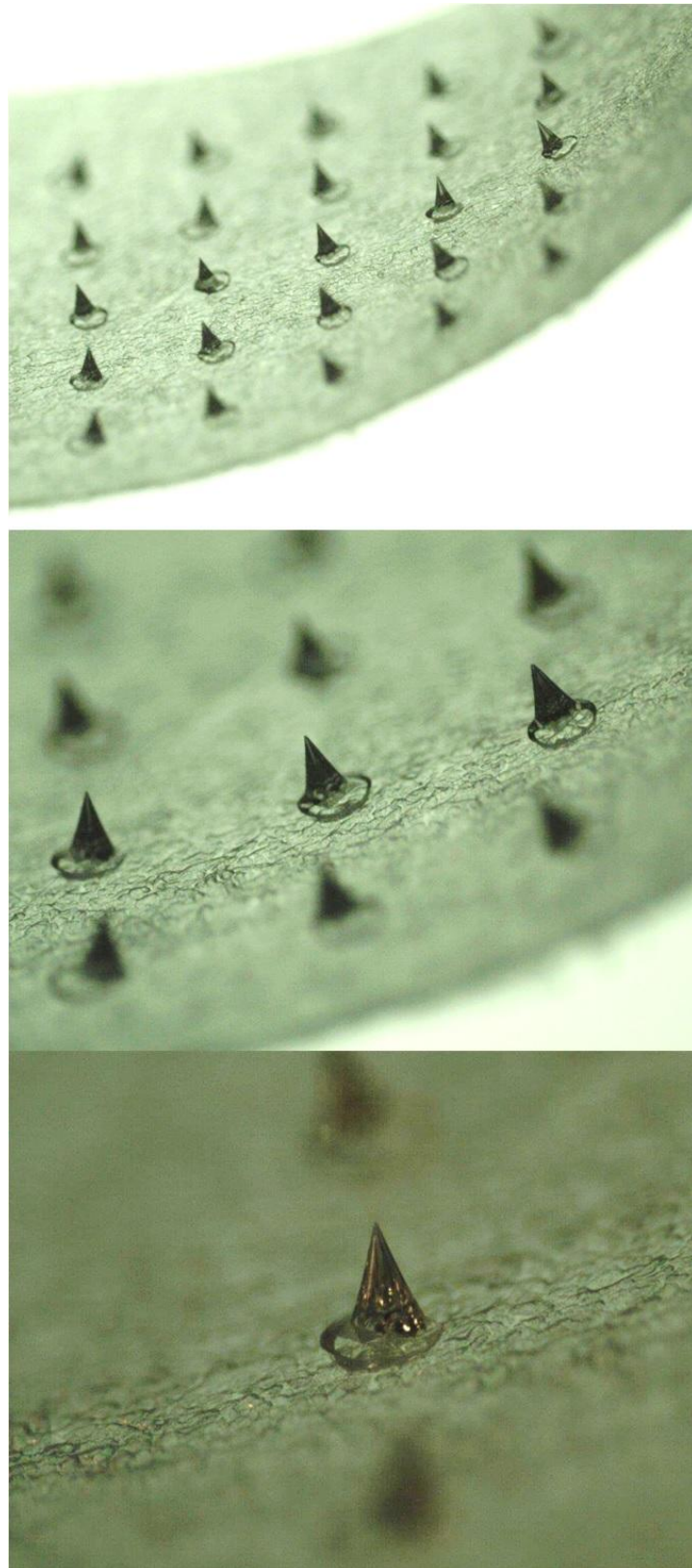
PVP je biokompatibilni polimer koji je odobrila FDA i koji se koristi kao plazma-ekspander, sredstvo za vezivanje u formulaciji tableta, ali i fabricaciji rastvorljivih mikroigala [238, 241]. Kao polazna formulaciju za izradu rastvorljivih mikroigala, PVP obrazuje hidrogel u vodenoj sredini pri koncentracijama koje se kreću do 60% m/V, u zavisnosti od molekulske mase korišćenog PVP [238]. S obzirom na nedostatak literaturnih podataka o formulaciji rastvorljivih mikroigala iz rastvora PVP u drugim rastvaračima, najpre je ispitana mogućnost njihove izrade iz metanola bez rastvorene lekovite supstance, pri čemu je varirana koncentracija povidona – 10, 20 i 30% m/V. Pokazano je da se nizovi mikroigala mogu uspešno fabrikovati pri svim ispitivanim koncentracijama upotrebljenog polimera. Mikroskopskim pregledom dobijenih nizova (Slika 4.30) je uočeno da su mikroigle imale pravilan piramidalan oblik i da su u potpunosti odgovarale master kalupima u kojima su izrađivane. Međutim, vrhovi igala izrađenih iz 10% rastvora PVP su bili blago savijeni, što može da ukaže na loše mehaničke osobine i neupuh prilikom njihove insercije u kožu. Iz tog razloga, za dalju pripremu rastvorljivih mikroigala sa lekovitom supstancom, odabrani su 20% i 30% m/V rastvori PVP u metanolu. U okviru ovog dela eksperimentalnog rada je utvrđeno da su optimalni uslovi punjenja kalupa postignuti pri protoku formulacije kroz kapilaru od 7,5 μ l/min. Osim toga, u ovoj preliminarnoj fazi razvoja fizičkog pojačivača penetracije leka, način sušenja je prepoznat kao kritičan korak u izradi, što je bilo očekivano, imajući u vidu laku isparljivost metanola. Stoga su u daljoj pripremi uzoraka sa lekom kalupi stavljeni u eksikator nakon punjenja svaka tri kalupa i ostavljani preko noći kako bi se osušili.

U narednoj fazi je SN kao model lekovita supstanca rastvoren u osnovnim placebo formulacijama u tri različite koncentracije: 5, 25 i 66,7 mg/ml, pri čemu je koncentracija 66,7 mg/ml predstavljala saturacionu koncentraciju leka u metanolnim rastvorima PVP. Punjenje kalupa tako dobijenim polaznim formulacijama, njihovim sušenjem i evaluacijom je ustanovljeno da upotreba SN u maksimalnoj koncentraciji vodi ka obrazovanju mikroigala koje nisu imale odgovarajuće morfološke karakteristike jer je nakon isparavanja metanola dolazilo do kristalizacije leka i njegovog izdvajanja iz sistema. Sa druge strane, ista pojava nije mogla da se zapazi pri sadržaju leka od 5 mg/ml, odnosno 25 mg/ml. Kako je cilj bio da se što veća količina leka isporuči selektivno u kožu, za dalju evaluaciju su izabrane formulacije sa 25 mg/ml SN (Slika 4.31). Takođe, treba da se naglasi da, iako je upotreba PVP u obe koncentracije (20% i 30% m/V) rezultovala u nastanku mikroigala pravilnog oblika, prinos dobijanja nizova mikroigala zadovoljavajućih karakteristika (vrednovanih sa 90 ili više poena) je bio niži (30%) pri korišćenju uzoraka izrađenih

iz rastvora sa 20% PVP, što je procenjivano mikroskopski, koristeći interne kriterijume za njihovu evaluaciju (Tabela 3.4, Slika 4.32).



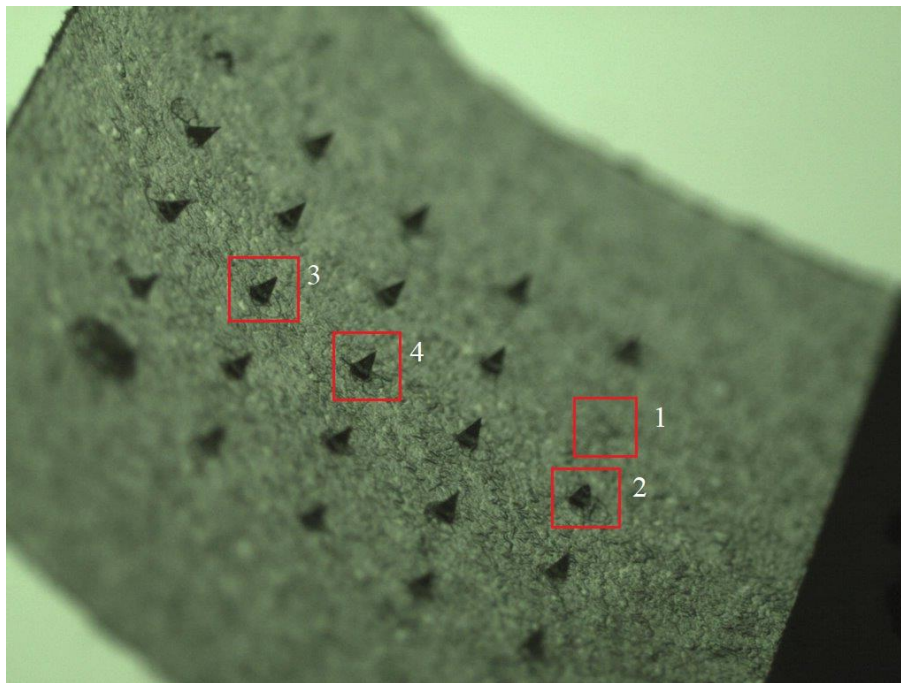
Slika 4.30. Mikrografije izrađenih placebo rastvorljivih mikroigala (polazna formulacija – konc. PVP 30% m/V)



Slika 4.31. Mikrografije izrađenih rastvorljivih mikroigala sa SN (polazna formulacija – konc. PVP 30% m/V, sadržaj leka 25 mg/ml)

Na izrađenim nizovima mikroigala (Slika 4.32) se mogao primetiti izostanak formiranja (ocena 1) i po nekoliko mikroigala, kao i nepotpune (ocena 2), mikroigle nepravilnih oblika ili sa iskrivljenim vrhovima (ocena 3), što je uočeno ne samo kod uzoraka sa 20% m/V PVP, nego i pri koncentraciji polimera od 30% m/V, ali u manjoj meri (prinos procesa izrade u ovom slučaju je bio

65,4%). Dakle, na kraju ove faze, za dalju pripremu rastvorljivih mikroigala su izabrani sledeći procesni parametri: PVP u koncentraciji od 30% m/V i sadržaj leka od 25 mg/ml. Nizovi rastvorljivih mikroigala dobijenih rastvaranjem SN u PVP polimernom matriksu, koji su imali više od 90% mikroigala vrednovanih ocenom 4 (Tabela 3.4, Slika 4.31), odnosno uzorci koji su vrednovani sa više od 90 bodova (od maksimalnih 100, što je odgovaralo nizu sa svih 25 potpuno obrazovanih mikroigala oštih vrhova i pravilnog piramidalnog oblika) podvrgnuti su daljoj karakterizaciji.



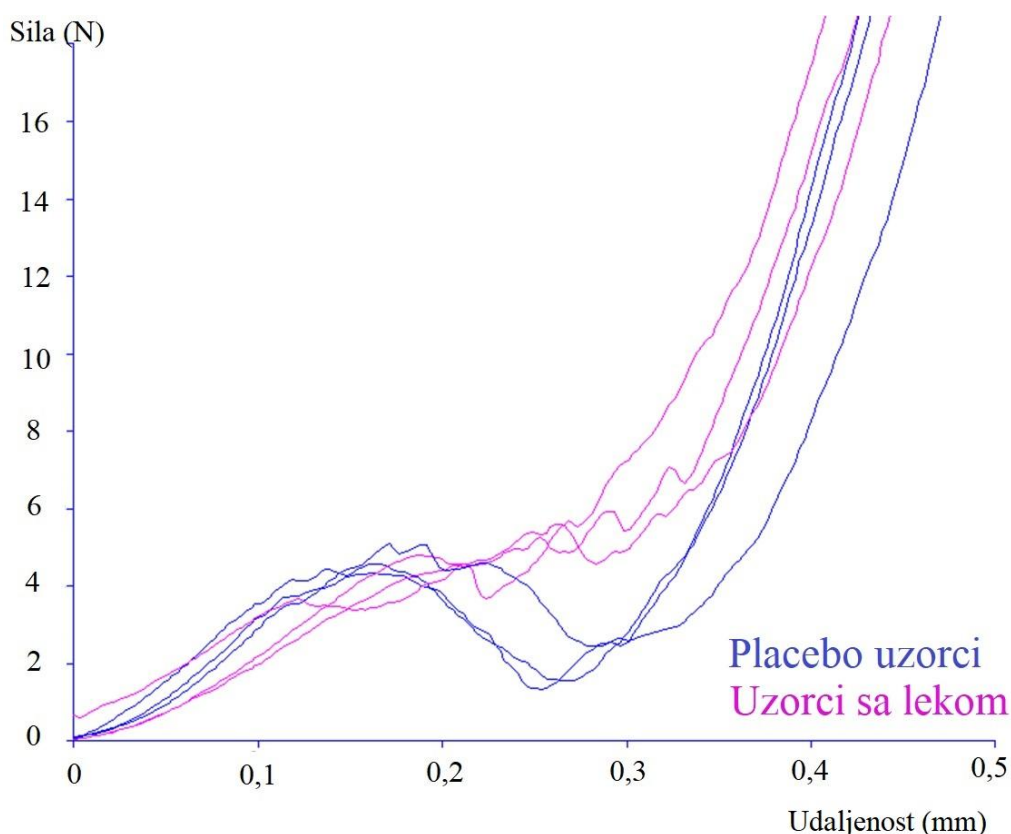
Slika 4.32. Kriterijumi korišćeni za procenu morfoloških osobina rastvorljivih mikroigala

4.4.2. Ispitivanje karakteristika rastvorljivih mikroigala

4.4.2.1. Procena morfoloških i mehaničkih osobina rastvorljivih mikroigala

Kako su dobijene mikroigle (Slika 4.30, Slika 4.31) bile identična replika originalnih silikonskih nizova mikroigala korišćenih za izradu PDMS kalupa, može se smatrati da su vrednosti važnih parametara koji određuju mehaničku otpornost mikroigala sa jedne strane, i uspešnost njihove insercije u kožu, a time i uspešnost isporuke leka, sa druge strane [85, 97], bili sledeći: visina 500 μm i prečnik baze približno 333 μm , odnosno njihov odnos približno 1,5. S obzirom da je odnos visine i širine bio veći od 1,3, očekuje se da primena mikroigala dužine od 500 μm može da obezbedi penetraciju SN u dublje slojeve kože [10, 85], što će biti utvrđeno u poslednjoj fazi ove doktorske disertacije.

Mehaničke osobine mikroigala su definisane njihovom mehaničkom čvrstinom, odnosno sposobnošću da se odupru delovanju sile pritiska, što uglavnom zavisi od vrste materijala i uslova korišćenih u njihovoj izradi [92]. Kako bi se procenile ove karakteristike dobijenih mikroigala, merena je sila koja je dovela do lomljenja mikroigala. Pokazano je da je do loma mikroigala došlo pri primeni sile od $4,68 \pm 0,32$ N ($n = 3$) (Slika 4.33), ukazujući na sposobnost mikroigala da se odupru kompresiji i lomljenju prilikom primene. Budući da je za penetraciju niza mikroigala (površine 1 cm^2) dovoljna sila 0,1-3 N [10, 242], može se pretpostaviti da će insercija formulisanih rastvorljivih mikroigala u kožu biti uspešna.



Slika 4.33. Mehanička otpornost izrađenih rastvorljivih mikroigala – placebo uzorci i uzorci sa lekovitom supstancom

4.4.2.2. Određivanje sadržaja SN u rastvorljivim mikroiglama

U narednom koraku su uzorci rastvorljivih mikroigala (jedan niz mikroigala je predstavljao jedan uzorak) analizirani u pogledu sadržaja inkapsuliranog SN. Sadržaj lekovite supstance se nalazio u rasponu od 74,48-79,67 μg po nizu, sa prosečnom vrednošću od $77,89 \pm 2,35$ ($n = 10$). Iz ovoga se može zaključiti da su se izrađene rastvorljive mikroigle odlikovale dobrom ujednačenošću sadržaja lekovite supstance. Sadržaj leka u mikroiglama je takođe bitan parametar koji omogućava procenu efikasnosti sistema u isporuci leka, u smislu određivanja količine leka koja je transportovana u i kroz kožu, u odnosu na ukupnu primenjenu količinu leka.

4.4.2.3. *In vitro* procena brzine rastvaranja rastvorljivih mikroigala

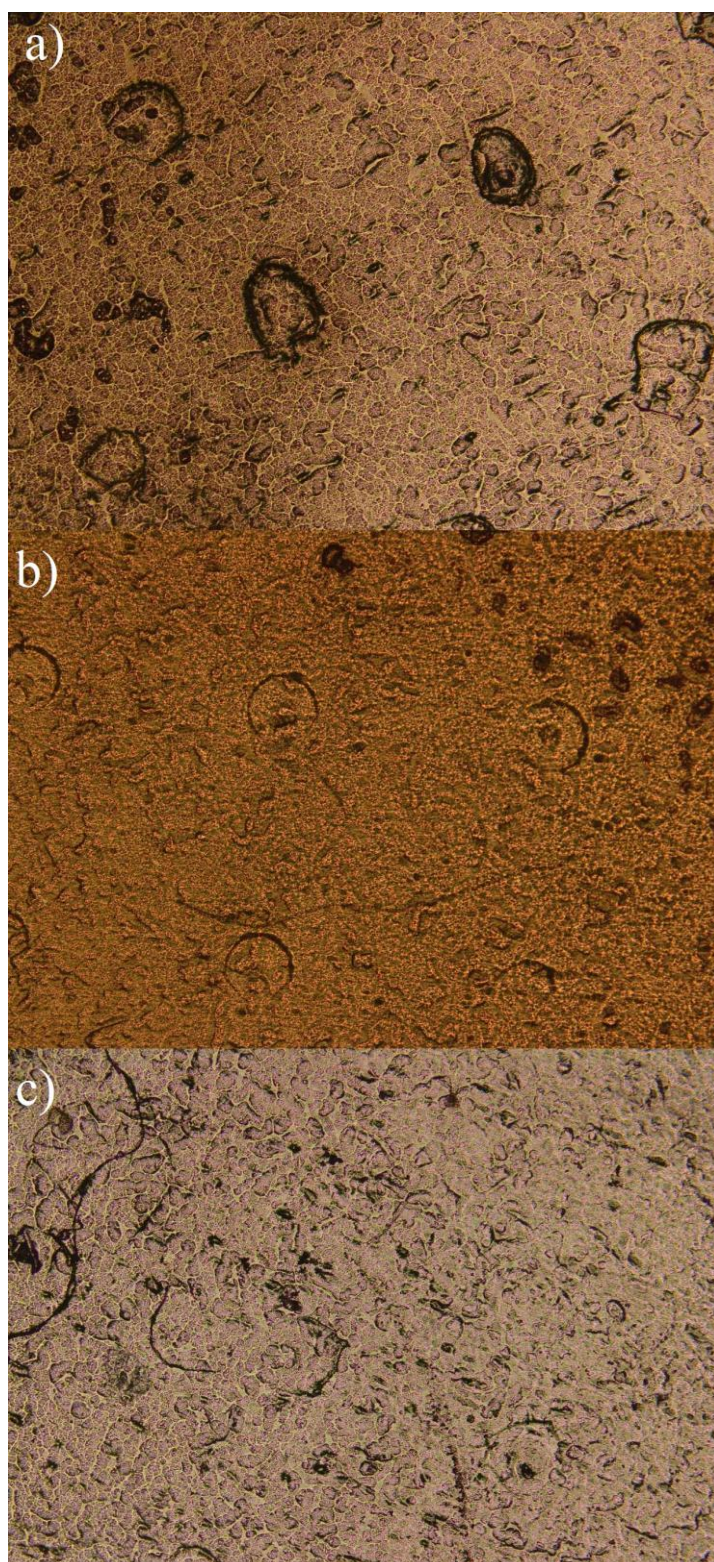
Tabela 4.11. Rezultati *in vitro* brzine rastvaranja SN iz rastvorljivih mikroigala

Vreme (min)	% rastvorenog SN u odnosu na primenjenu količinu
5	$112,28 \pm 12,06$
15	$92,87 \pm 13,55$
30	$91,84 \pm 3,99$

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD ($n = 3$)

Kako bi se utvrdilo da će se mikroigle nakon primene rastvoriti, odnosno da će doći do oslobađanja i rastvaranja SN, sprovedeno je *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja leka. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 4.11. Kao što se može zapaziti, celokupna količina leka se rastvorila već nakon prvih 5 minuta ispitivanja, a potpuno rastvaranje je potvrđeno i u uzorcima koji su bili u kontaktu sa medijumom u toku 15, odnosno 30 min. Ovi nalazi su potvrđeni i mikroskopskom

inspekcijom (Slika 4.34) jer se na ostacima 3M potporne trake može uočiti odsustvo kristala leka i nerastvorenih delova sistema, što je siguran znak rastvaranja ispitivanih mikroigala.

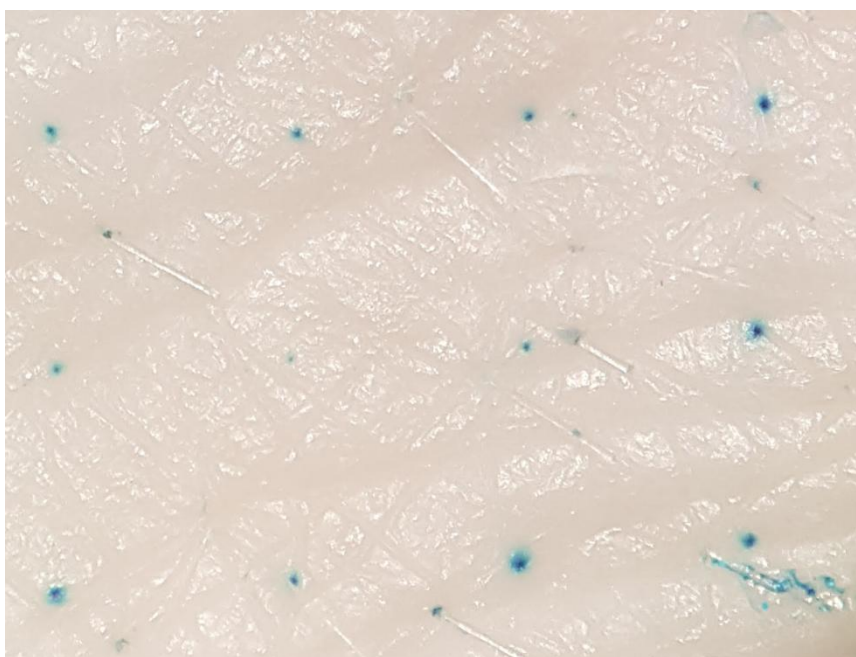


Slika 4.34. Rezultati *in vitro* brzine rastvaranja SN iz rastvorljivih mikroigala – mikrografija 3M potporne trake nakon: a) 5 min; b) 15 min i c) 30 min ispitivanja

4.4.3. *In vitro* procena penetracije/permeacije SN primenom različitih vrsta mikroigala

4.4.3.1. *In vitro* procena penetracije/permeacije SN kombinovanom primenom mikroemulzija i čvrstih silikonskih mikroigala („poke and patch“ pristup)

Kako je u prethodnim fazama istraživanja pokazano (poglavlje 4.3.1) da primenom mikroemulzija može značajno da se unapredi transport SN u kožu, u ovoj fazi istraživanja je testirana hipoteza da predtretman kože mikroigalama rezultuje u dodatnom poboljšanju isporuke leka. Iako je u značajnom broju istraživanja zapaženo da perforacija kože čvrstim mikroiglama rezultuje u pospešivanju penetracije/permeacije lekovitih supstanci iz konvencionalnih i naprednih nosača [111, 112, 124, 135], kombinovana primena mikroigala i mikroemulzija je još uvek slabo dokumentovana u literaturi [125-127]. Zu i sar. [127] su dokazali i u *in vitro* i *in vivo* uslovima da kombinacija mikroemulzija i čvrstih silikonskih mikroigala vodi ka poboljšanju perkutane isporuke hidrofилnog leka. Slično je potvrđeno i u slučaju lipofilnih lekova [125, 126].

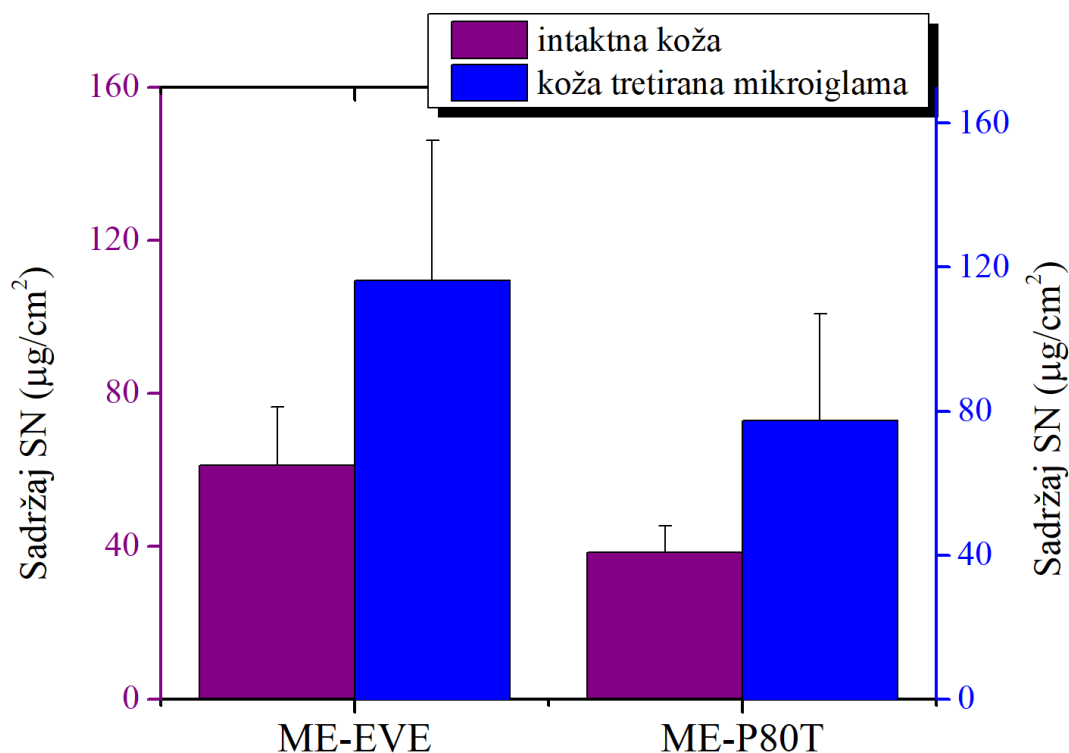


Slika 4.35. Mikrografija kože uha svinje pune debljine obojene rastvorom metilenskog plavog neposredno nakon primene čvrstih silikonskih mikroigala

Eksperiment je obuhvatao aplikaciju kvantitativno istih mikroemulzija ME-EVE i ME-P80T, koje su se razlikovale po vrsti upotrebljenih stabilizatora (Tabela 4.2), pod *infinite* uslovima doziranja, na kožu prethodno tretiranu ImmuPatch mikroiglama dužine 200 μm . Dobijeni rezultati su potvrdili ranija zapažanja o narušavanju integriteta kožne barijere i povećanju permeabilnosti kože nakon aplikacije mikroigala (Slika 4.35 i Slika 4.36). Studija bojenja kože metilenskim plavim neposredno nakon primene čvrstih silikonskih mikroigala je pokazala da je došlo do narušavanja strukture SC i obrazovanja mikrokanala u koži. Bojenje kože metilenskim plavim je moguće jer se ova boja vezuje za proteine kože. Tipično, zbog svoje hidrofobne prirode, SC ne može da apsorbuje hidrosolubilnu boju, međutim jednom kada je SC prevaziđen primenom mikroigala, boja difunduje kroz kožu u njene hidrofilne delove [187]. Drugim rečima, pokazano je da je aplikacija mikroigala obezbedila formiranje pora u koži koje povećavaju njenu propustljivost.

Predtretman kože mikroiglama je poboljšao isporuku SN u kožu iz obe ispitivane mikroemulziona formulacije. 24 h nakon primene mikroemulzionih uzoraka ME-P80T i ME-EVE, količina leka koja je deponovana po 1cm^2 kože tretirane mikroiglama je bila $77,42 \pm 29,64 \mu\text{g}$ i $116,32 \pm 38,89 \mu\text{g}$, respektivno, što predstavlja povećanje od 1,90-2,02 puta u odnosu na efekte

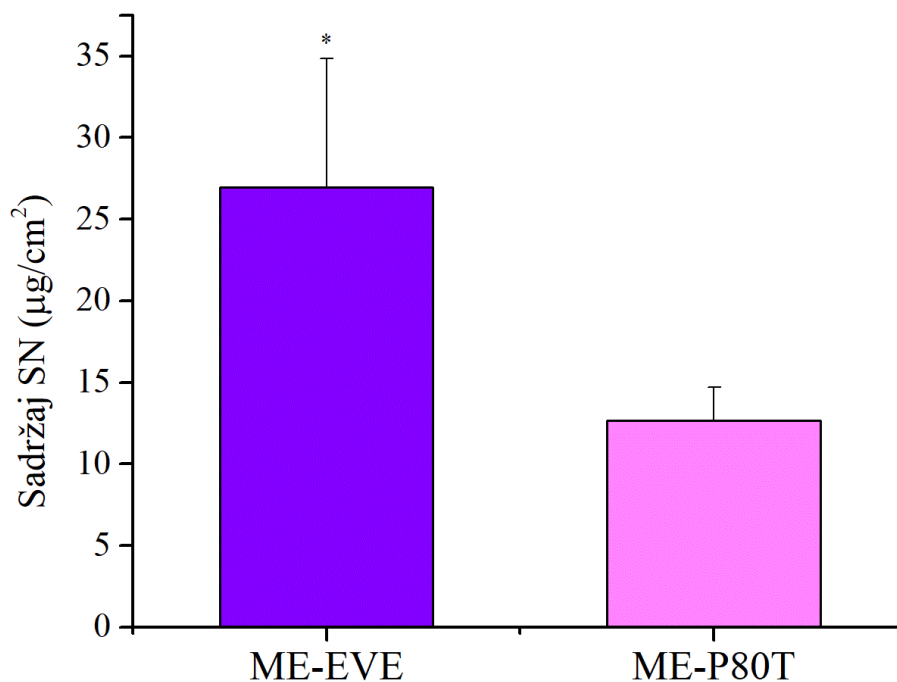
mikroemulzija na intaktnu kožu. Međutim, zbog visoke varijabilnosti dobijenih vrednosti, ispostavilo se da ovo povećanje nije statistički značajno. Dobijeni nalazi su u dobroj korelaciji sa ranijim zapažanjima Mojeiko i sar. [126] koji su takođe iz tretirane kože ekstrahovali ~ 2 puta više ispitivane lekovite supstance, za razliku od Kelchena i Brogdna [125] koji su dostigli 20 puta bolju penetraciju propranolola u kožu nakon aplikacije mikroigala. Međutim, kod poređenja rezultata dobijenih u različitim istraživanjima ne treba da budu zanemarene razlike u fizičkim i mehaničkim osobinama mikroigala, načinu njihove aplikacije, vrsti i načinu pripreme kože korišćene za ispitivanje, trajanju eksperimenta, količini primenjene formulacije itd. Tako na primer, imajući u vidu da je penetracija propranolola ispitivana 24 h bez primene okluzije [125], značajno povećanje njegove penetracije nije iznenađujuće i može da se objasni značajnim isparavanjem etanola i vode iz formulacija, što je povećalo termodinamičku aktivnost leka. Poredeći različite mikroemulzione formulacije, treba takođe da se istakne da je nešto više leka ekstrahovano iz uzoraka kože na koje je nakon aplikacije mikroigala nanosena ME-EVE u poređenju sa ME-P80T, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim pri aplikaciji samih mikroemulzija. Ovim je još jednom potvrđeno da mikroemulzija zasnovana na EV surfaktantu ispoljava nešto veću efikasnost u dermalnoj akumulaciji model lekovite supstance. Konačno, kada se uporede količine leka deponovane kombinovanjem dva različita pristupa za poboljšanje njegove isporuke (mikroemulzije i čvrste silikonske mikroigle), odnosno primenom konvencionalnog farmaceutskog oblika (Mycosert® krem), ER_D dostiže vrednosti 5,4-8,1, što predstavlja značajno pojačavanje dermalne isporuke SN ($p = 0,0212$ i $p = 0,0105$).



Slika 4.36. Ukupna količina SN penetrirala iz mikroemulzija u kožu uha svinje pune debljine tretirane mikroiglama u toku 24 h (izraženo kao srednja vrednost \pm SD, $n = 5$)

Dodatnu potvrdu da su mikroigle dovele do obrazovanja mikropora u koži je obezbedila kvantifikacija SN u receptorskom medijumu (Slika 4.37). Preciznije, kumulativna količina leka koja je permeirala nakon 24 h iz mikroemulzija ME-EVE i ME-P80T kroz kožu tretiranu mikroiglama je bila $26,96 \pm 7,88$ µg/ml i $12,66 \pm 2,07$ µg/ml, redom, dok SN u istom vremenskom periodu nije detektovan u akceptorskoj fazi nakon primene samih mikroemulzija (poglavlje 4.3.1.2). Tokom

prvih 8 h ispitivanja, SN nije detektovan u akceptorskoj fazi ni u jednom od ispitivanih uzoraka. Slično penetraciji leka, još jednom je transport SN kroz kožu bio manje naglašen primenom ME-P80T u odnosu na ME-EVE. Činjenica da lek nakon kombinovane aplikacije mikroemulzija i mikroigala dospeva u receptorski medijum upućuje na zaključak da je na ovaj način moguće isporučiti antifungalni lek u dublje slojeve kože ili nokte, a potencijalno i u sistemsku cirkulaciju, što može da bude prednost u lečenju dubljih gljivičnih infekcija ili onihomikoza. Iako SN zasad nije dostupan niti u jednom farmaceutskom obliku namenjenom njegovoj sistemskoj isporuci, koncept paralelne upotrebe mikroemulzija i mikroigala bi mogao da bude korisna sprega za povećanje isporuke različitih antimikotika (npr. flukonazol, ketokonazol, terbinafin) u sistemsku cirkulaciju kod ozbiljnijih dermatomikoza.



Slika 4.37. Ukupna količina SN permeirala u akceptorsku fazu 24 h nakon aplikacije mikroemulzionih uzoraka na kožu tretiranu čvrstim silikonskim mikroiglama (izraženo kao srednja vrednost \pm SD, n = 5); * statistički značajna razlika u odnosu na ME-P80T (p < 0,05)

4.4.3.2. *In vitro* procena penetracije/permeacije SN primenom rastvorljivih mikroigala („poke and release“ pristup)

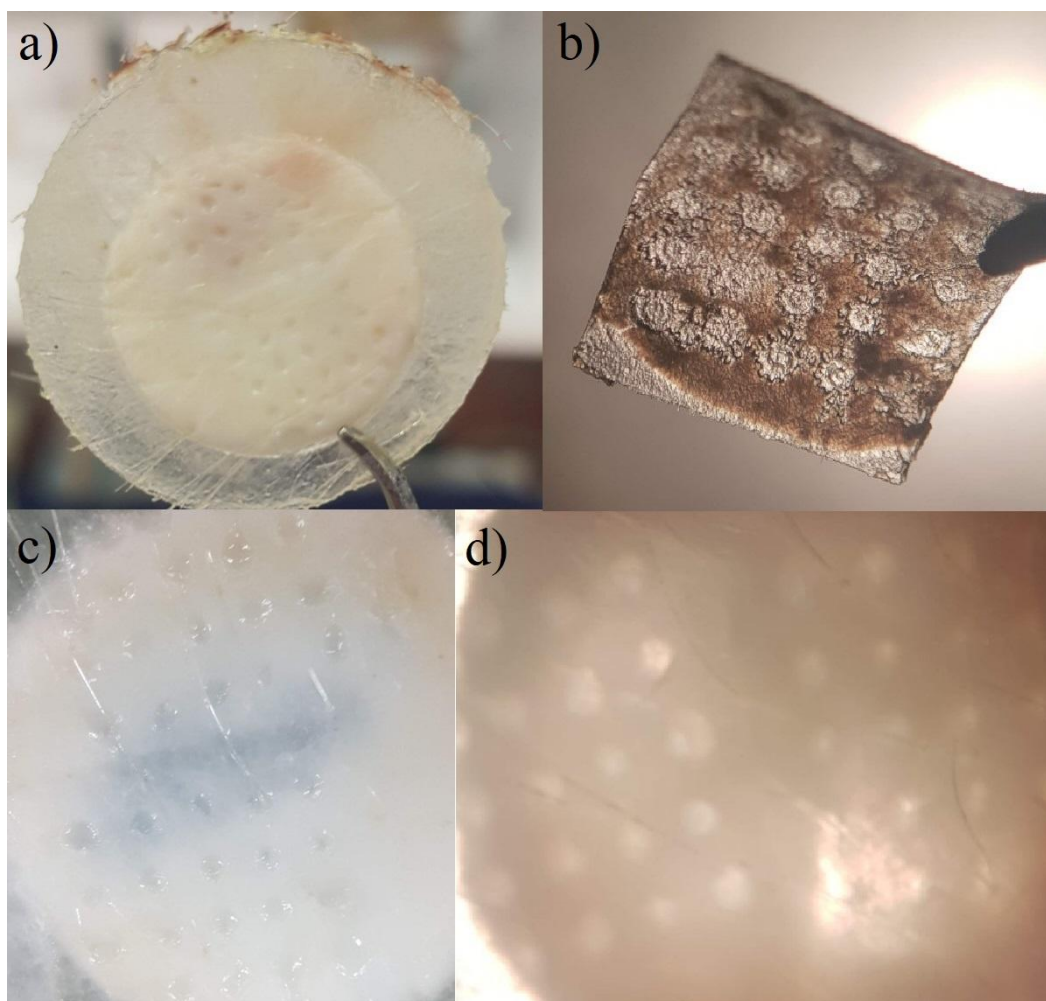
Kako su dobijeni rezultati prikazani u prethodnim potpoglavljima (4.4.2.2. i 4.4.2.3) potvrdili da su izrađene rastvorljive mikroigle imale prihvatljive karakteristike u pogledu čvrstine i brzine rastvaranja leka, u poslednjoj fazi eksperimenata su pod *in vitro* uslovima sprovedene studije penetracije/permeacije ispitivane model lekovite supstance iz rastvorljivih mikroigala u/kroz kožu uha svinje pune debljine. Jedan od glavnih ciljeva ove doktorske disertacije je bio da se ispita i uporedi doprinos različitih pristupa poboljšanju isporuke leka u kožu: hemijski (mikroemulzije) ili fizički inhenser penetracije (rastvorljive mikroigle) ili njihove kombinacije, što je takođe obezbeđeno eksperimentima izvedenim u ovoj poslednjoj fazi istraživanja. Dakle, izvršena je komparativna evaluacija efikanosti kombinacije hemijskog (mikroemulzije) i fizičkog (čvrste silikonske mikroigle) pojačivača penetracije u odnosu na primenu samih mikroemulzija, odnosno samih rastvorljivih mikroigala.

Budući da je sadržaj lekovite supstance po jednom nizu mikroigala površine 1 cm² bio 77,89 \pm 2,35 µg, kao i da je dostupna površina za primenu rastvorljivih mikroigala bila 2,01 cm², ovo

ispitivanje je vršeno pod *finite* uslovima doziranja. Kako bi se omogućila adekvatna komparacija potencijala različitih mehanizama za povećanje isporuke leka u/kroz kožu, mikroemulzije su aplikovane na netretiranu, odnosno kožu tretiranu čvrstim silikonskim mikroiglama (3 niza sa po 16 mikroigala) u količini u kojoj je sadržaj SN odgovarao sadržaju u dva niza rastvorljivih mikroigala.

Kako bi došlo do penetracije lekovite supstance iz rastvorljivih mikroigala, neophodno je da one imaju odgovarajuće morfološke i mehaničke osobine, o čemu je diskutovano u okviru ove doktorske disertacije. Potvrda da su izrađene rastvorljive mikroigle uspešno penetrirale u kožu je data na Slici 4.38, koja prikazuje izgled kože uha svinje pune debljine tretirane rastvorljivim mikroiglama po okončanju studije penetracije/permeacije. Jasno može da se primeti šablon mikropora na koži (dva niza od 5×5 mikroigala). Osim toga, na istoj slici je prikazana mikrografija 3M potporne trake nakon završenog ekperimenta, koja se odlikuje odsustvom ostatka mikroigala i ukazuje na njihovo potpuno rastvaranje. U prilog ovim zapažanjima govori i analiza sadržaja SN deponovanog u koži, što je takođe pokazatelj uspešne penetracije rastvorljivih mikroigala i isporuke lekovite supstance u kožu (Slika 4.39).

Na Slici 4.39a je prikazana ukupna količina lekovite supstance koja je deponovana u koži svinje tokom celokupnog eksperimenta penetracije/permeacije. Ukupna količina slobodnog SN koja je oslobođena iz rastvorljivih mikroigala u toku 24 h i zadržana u koži je bila $3,45 \pm 0,62 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Istovremeno, pod istim uslovima doziranja, količina leka ekstrahovanog iz kože tretirane mikroemuzionom formulacijom je bila neznatno niža ($3,25 \pm 1,00 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) ($p = 0,996$).



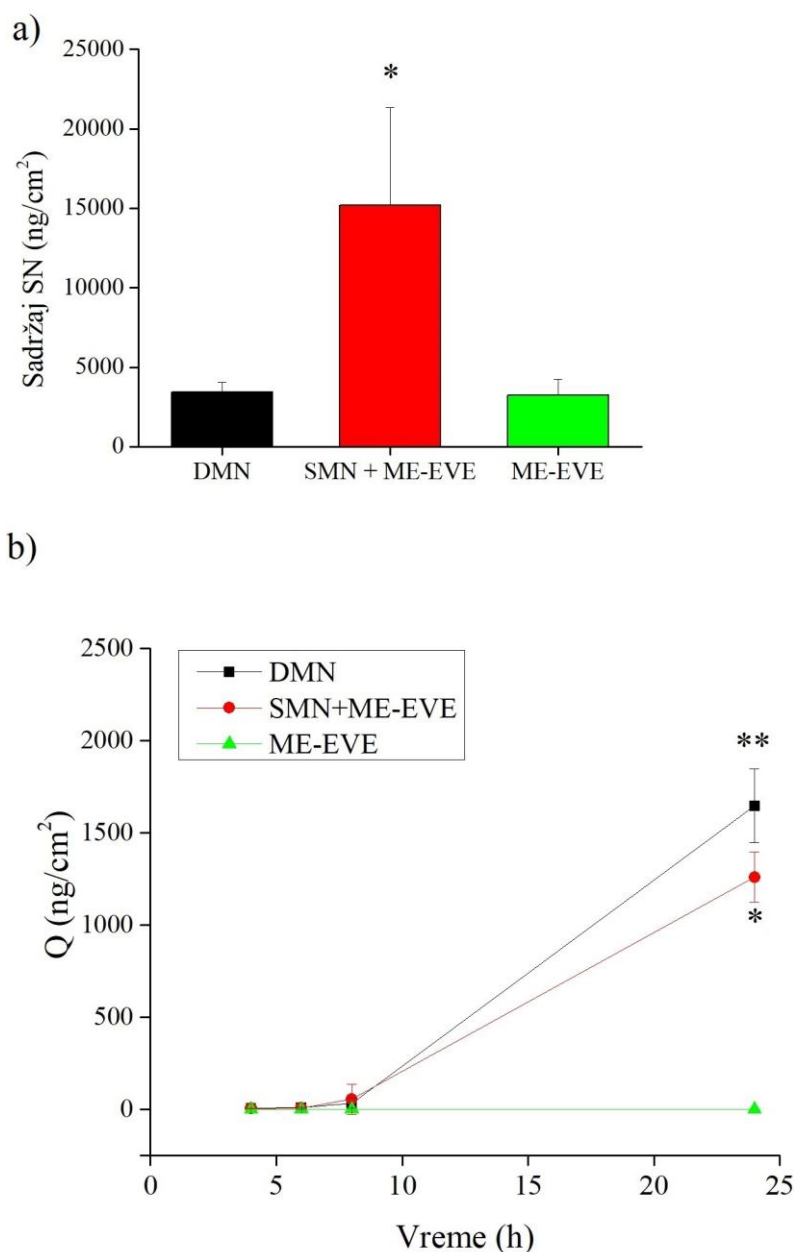
Slika 4.38. a) Vizuelni pregled uzorka kože svinje pune debljine tretirane rastvorljivim mikroiglama po okončanju studije penetracije/permeacije (nakon 24 h); b) mikrografija 3M potporne trake po okončanju studije penetracije/permeacije; c) i d) mikrografije uzoraka kože svinje pune debljine tretirane rastvorljivim mikroiglama po okončanju studije penetracije/permeacije

Iako se aplikacijom rastvorljivih mikroigala (koje se uspešno insertuju u kožu) lekovita supstanca uvodi direktno u kožu gde dolazi do njenog brzog rastvaranja, difuzijom leka u kožu iz mikroemulzione formulacije je nakon 24 h ostvareno podjednako deponovanje SN. Ovaj rezultat je veoma značajan, imajući u vidu da, kada je reč o proceni dermalne isporuke lekovitih supstanci, paralelna analiza efikasnosti rastvorljivih mikroigala u odnosu na submikronske emulzije do sada nije sprovedena. Takođe, poređenje kapaciteta rastvorljivih mikroigala izrađenih iz slobodnog leka u odnosu na druge napredne savremene nosače lekova, prema dosadašnjim saznanjima nije zabeleženo. Ipak, budući da je u relevantnim naučnim publikacijama [132, 133] dokumentovano da primena rastvorljivih mikroigala rezultuje u većoj penetraciji/permeaciji lekovite supstance u odnosu na polaznu formulaciju korišćenu za fabrikaciju mikroigala, ovakav rezultat delimično nije očekivan. Prema dobijenim rezultatima, čini se da se primenom fizičkog inhensera penetracije obezbeđuje sličan transport model lekovite supstance u kožu kao kada se na kožu aplikuje opcija hemijskog inhensera penetracije. Dakle, pokazano je da su različiti mehanizmi pomoću kojih mikroemulzije povećavaju permeabilnost kože i isporuku lekova u/kroz kožu, o kojima je bilo diskutovano u okviru ove doktorske disertacije, ekvivalentni fizičkom narušavanju integriteta kožne barijere do kojeg dolazi primenom rastvorljivih mikroigala.

Sa druge strane, vrednosti perkutane akumulacije SN dobijene primenom rastvorljivih mikroigala, odnosno mikroemulzije, su se značajno razlikovale od dermalnog deponovanja leka postignutog kombinovanom primenom mikroemulzije i čvrstih silikonskih mikroigala (Slika 4.39a). Imajući u vidu rezultate eksperimenta sprovedenog pod *infinite* uslovima doziranja, ovakav rezultat je bio očekivan i dodatno je potvrdio da je predtretman kože čvrstim silikonskim mikroiglama pogodan pristup za povećanje perkutane penetracije leka primenjenog u formi mikroemulzija. Značajno veća količina SN je ekstrahovana iz kože na kojoj je testirana paralelna primena dva različita mehanizma povećanja permeabilnosti kože – $15,19 \pm 6,16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, ukazujući još jednom na njihovo sinergističko delovanje. Međutim, za razliku od ispitivanja penetracije pod *infinite dose* uslovima, gdje je postignuto povećanje isporučenog SN u kožu od 2,02 puta (što je bilo bez statističke značajnosti), u slučaju studije koja odgovara realnoj situaciji primene leka u praksi vrednost ER_D je bila 4,67. Dakle, nakon uspešnog obrazovanja mikropora u koži primenom ImmuPatch silikonskih mikroigala, difuzija leka iz mikroemulzija je očekivano bila pospešena. Imajući u vidu otvaranje pora na koži indukovano aplikacijom mikroigala, bikontinuirana mikroemulzija formulacija je verovatno olakšano difundovala kroz rožati sloj kože i isporučivala lek u tkiva kože.

Takođe treba primetiti da su rastvorljive mikroigle obezbedile 4,37 puta nižu dermalnu raspoloživost model lekovite supstance u odnosu na primenu mikroemulzije na kožu prethodno tretiranu mikroiglama. Treba naglasiti da je broj mikroigala kojim je tretirana svinjska koža bio sličan kod primene obeju vrsta mikroigala (50 rastvorljivih mikroigala vs. 48 čvrstih silikonskih mikroigala). Međutim, korišćene ImmuPatch mikroigle su imale dužinu od 200 μm , dok su rastvorljive mikroigle bile duže (500 μm), te ovakav nalaz nije bio pretpostavljen. Naime, ranije je pokazano je da se sa povećanjem dužine mikroigala povećava transport primenjenih supstanci u/kroz kožu [243-245]. Sa druge strane, u studiji u kojoj su ispitivane mikroigle različite dužine (225-600 μm) obložene ovalbuminom imuni odgovor je bio nezavisan od dužine insertovanih mikroigala [246]. Dodatno, zbog brzog *in vitro* rastvaranja SN iz rastvorljivih mikroigala u hidro-alkoholnom medijum intuitivno je očekivano da će doći do brzog i kompletnog rastvaranja leka i u svinjskoj koži. Međutim, ovaj efekat je izostao. Moguće objašnjenje za dobijene razlike u ova dva odvojena eksperimenta može da bude ograničena količina tečnosti i niska difuzivnost leka isporučenog putem rastvorljivih mikroigala u uzorcima kože u poređenju sa većom količinom smeše vode i etanola koja je korišćena pri *in vitro* proceni brzine rastvaranja SN iz rastvorljivih mikroigala. Osim toga, ranije studije su ukazale na značaj mehaničkih osobina rastvorljivih mikroigala (determinisanih njihovim sastavom) u pogledu kapaciteta penetracije u kožu [94, 129]. Monkare i sar. [129] su uočili snažniji imuni odgovor kada je antigen primenjen u obliku suspenzije nanočestica (tečna formulacija) pomoću šupljih mikroigala u odnosu na rastvorljive mikroigle

izrađene iz nanočestica u suvom obliku, što delimično potkrepljuje rezultate dobijene u ovom radu. Pored toga, efikasnost penetracije mikroigala je uslovljena i silom koja se primenjuje prilikom aplikacije mikroigala, kao i dužinom njenog trajanja [247]. Sve ovo skupa je moglo da dovede do toga da je primenom rastvorljivih mikroigala došlo do kompresije kože, nepotpune insercije rastvorljivih mikroigala u kožu i zaostajanja slobodnog leka na površini kože umesto insercije mikroigala u kožu. Međutim, da bi se ove pretpostavke proverile, neophodna je sveobuhvatnija optimizacija metode ispitivanja mehaničke jačine izrađenih mikroigala na uzorcima kože.



Slika 4.39. Rezultati studije penetracije/permeacije pod *finite* uslovima doziranja: a) Ukupna količina SN primenjenog u formi rastvorljivih mikroigala (DMN), mikroemulzije (ME-EVE) i čvrstih silikonskih mikroigala u kombinaciji sa mikroemulzijom (SMN + ME-EVE) deponovanog u uzorcima kože svinje u toku 24 h; b) Permeacioni profili SN primenjenog na kožu uha svinje u toku 24 h u formi DMN, ME-EVE i SMN + ME-EVE. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD, $n = 3-5$. * statistički značajna razlika u odnosu na ME-EVE i DMN ($p < 0,05$); ** statistički značajna razlika u odnosu na ME-EVE i ME-EVE + SMN ($p < 0,05$)

Slično je moglo da se desi i nakon primene same mikroemulzione formulacije, gde je zbog male količine uzorka došlo do brzog isparavanja sastojaka formulacije, ostavljajući slobodan lek na površini kože, koji je imao nisku termodinamičku aktivnost.

Kada je reč o permeaciji SN primenjenog u različitim formulacijama, u skladu sa ranijim rezultatima studija permeacije, lek nije detektovan u akceptorskom medijumu nakon aplikacije mikroemulzije ME-EVE, potvrđujući njenu pogodnost za selektivnu i ciljnu dermalnu isporuku SN. Sa druge strane, iako je prolazak leka kroz kožu tretiranu mikroiglama bio očekivan, detekcija SN u uzorcima uzetim u vremenskim intervalima manjim od 24 h je neočekivana (Slika 4.39b). Međutim, za razliku od eksperimenata koji su sprovedeni pod *infinite* uslovima primene, u kojima je za analizu sadržaja leka primenjena HPLC metoda, u studiji izvedenoj u ovoj fazi istraživanja SN je kvantifikovan pomoću osetljivije LC-MS/MS metode.

Ipak, količine leka koje su detektovane u uzorcima uzetim nakon 4 h, 6 h i 8 h su generalno bile niske (vrednosti su bile ispod 55 ng/cm^2), dostižući vrednost od $1646,12 \pm 199,80 \text{ ng/cm}^2$ i $1259,84 \pm 136,18 \text{ ng/cm}^2$ nakon primene rastvorljivih mikroigala, odnosno kombinacije mikroemulzije i ImmuPatch silikonskih mikroigala. Permeacija SN se najbolje mogla opisati kinetikom nultog reda, sugerišući postepeni, koncentraciono nezavisan transport leka kroz kožu. Transdermalni fluks je bio nešto viši u slučaju primene rastvorljivih mikroigala ($87,91 \text{ ng/cm}^2/\text{h}$ naspram $66,99 \text{ ng/cm}^2/\text{h}$). Veća količina SN koja je u akceptorsku fazu difundovala iz rastvorljivih mikroigala je verovatno posledica njihove veće dužine i direktnog transporta leka u dublje, hidrofилne slojeve kože [243-245], odakle je lek difundovao u hidro-alkoholni medijum za koji je imao veći afinitet.

Prema tome, permeacija SN je bila znatno veća iz rastvorljivih mikroigala nego kada je SN primenjen na kožu prethodno tretiranu čvrstim mikroiglama u formi mikroemulzije ($p = 0,027$). Dakle, dokazana je i potvrđena ranija tvrdnja da su rastvorljive mikroigle uspešno penetrirale u kožu, odakle je SN difundovao u akceptorski medijum, što je u saglasnosti sa ranije uočenim prolaskom leka u akceptorsku fazu, odnosno u sistemsku cirkulaciju, u slučaju aplikacije rastvorljivih mikroigala većih dužina (od $500 \mu\text{m}$ i više) [109, 110, 113]. Prema tome, rezultatima *in vitro* studije penetracije/permeacije je potvrđen koncept primene rastvorljivih mikroigala, ne samo u dermalnoj, nego i u transdermalnoj isporuci lekovitih supstanci. Dodatno, sposobnost „poke and patch“ pristupa da omogući perkutanu resorpciju model lekovitih supstanci iz mikroemulzija je ranije demonstrirana *in vitro* i/ili *in vivo* u slučaju korišćenja mikroigala različitih dužina ($200, 250$ i $750 \mu\text{m}$) [125-127]. Stoga, rezultati dobijeni u ovom radu predstavljaju još jedan primer uspešnog korišćenja pomenutog pristupa za dermalnu i transdermalnu isporuku antifungalnog leka. Međutim, kada se uporedi odnos sadržaja SN u koži i akceptorskom medijumu, značajno veće vrednosti se dobijaju u korist „poke and patch“ ($12,05$) naspram „poke and release“ pristupa ($2,10$), što je poželjno u slučaju ciljne terapije dermatomikoza ispitivanim lekom.

Na kraju, sagledavajući sveobuhvatno rezultate dobijene u *in vitro* studijama penetracije/permeacije SN kao model lekovite supstance, može se zaključiti da je jedino primena mikroemulzija pod korišćenim uslovima ispitivanja dovela do ciljne dermalne isporuke leka, bez njegovog prolaska u akceptorski medijum, koji bi bio indikativan za preuzimanje leka u sistemsku cirkulaciju. Nasuprot tome, mikroigle, kao fizički inhenseri penetracije, su dovele do prolaska leka kroz sve slojeve kože. Međutim, efekat je bio više naglašen nakon primene rastvorljivih mikroigala. Za razliku od rastvorljivih mikroigala, koje su obezbedile komparabilno deponovanje SN u koži kao i mikroemulzije, udružena primena mikroemulzija i čvrstih silikonskih mikroigala je predstavljala superioran pristup u poboljšanju transporta leka u kožu, pri čemu je penetracija SN u kožu bila $12,05$ puta veća nego njegova permeacija. Uzimajući u obzir druge prednosti i ograničenja ispitivanih pristupa u poboljšanju isporuke leka (o kojima je diskutovano u uvodnom delu ove doktorske disertacije), čini se da bi aplikacija mikroemulzija, kao tečnih formulacija, bila odgovarajući način za lečenje dermatomikoza na kosmatim delovima tela, dok bi se rastvorljive mikroigle potencijalno mogle koristiti u terapiji onihomikoza ili tretiranju delova tela sa debljom kožom. Takođe, imajući u vidu znatno veću dermalnu akumulaciju leka obezbedenu kombinovanjem fizičkog i hemijskog pojačivača penetracije u odnosu na njihovu pojedinačnu

aplikaciju, „*poke and patch*“ pristup bi bio veoma koristan u lečenju dubljih, ozbiljnijih gljivičnih infekcija kože. Osim toga, pomenuti kombinovani pristup bi trebalo da se ispita i kao način za povećanje isporuke antifungalnih lekova u nokatne strukture, jer je pokazano da primena čvrstih mikroigala na nokte dovodi do povećanja penetracije indikatorske boje u ove dodatke kože [248].

Međutim, svi rezultati dobijeni *in vitro* u okviru ove doktorske disertacije treba da se provere *in vivo* kako bi se stekao potpuniji uvid u potencijal različitih nosača ovog leka za lokalnu terapiju dermatomikoza.

5. ZAKLJUČCI

5.1. Prva faza eksperimentalnog rada

Na osnovu rezultata dobijenih u prvoj fazi eksperimentalnog rada mogu se izvesti sledeći zaključci o potencijalu alkil poliglukozidnih (APG) emulgatora različite strukture, odnosno polietoksilovanog emulgatora gliceret-7-kaprilat/kaprata (Emanon[®] EV-E) da obrazuju mikroemulzione sisteme, te o mogućnosti formiranja mikroemulzija različite nanostrukture, kao i potencijalu odabranih formulacija za rastvaranje terapijskih koncentracija model lekovitih supstanci (ADA i SN):

- U slučaju APG surfaktanata, koji su dostupni na tržištu u obliku vodenih rastvora, pokazano je da mogu da obrazuju mikroemulzione sisteme uz eksperimentalne uslove korišćene u okviru ove doktorske disertacije (estri masnih kiselina srednje dužine lanca kao uljana faza, propilenglikol kao kosurfaktant (maseni odnos S-CoS je bio 1-1)).
- Diskretne razlike u strukturi korišćenih parcijalnih estara masnih kiselina, kao što je dužina alkil lanca kiseline ili tip esterifikovanog alkanola, su se odrazile na veličinu mikroemulzionih oblasti u sistemu ulje/Plantacare[®] 2000 UP (decil-glukozid)-propilenglikol/voda. Ulja sa većim brojem slobodnih hidroksilnih grupa u svojoj strukturi, odnosno estri sa kraćim ugljovodoničnim lancem masne kiseline, su pokazali veću efikasnost.
- Veličina mikroemulzione oblasti na pseudoternarnim dijagramima dobijenim korišćenjem različitih APG surfaktanata – Plantacare[®] 2000 UP (decil-glukozid) i Plantacare[®] 810 UP (kaprilil/kapril-glukozid) je bila zavisna od njihovih karakteristika. Zbog različitog udela vode, odnosno udela čiste PAM u sastavu korišćenih komercijalno dostupnih APG proizvoda, procena uticaja strukturnih karakteristika APG na mikroemulzionu oblast može da bude nepouzdana. Ipak, dobijeni rezultati ukazuju na trend da APG surfaktant sa višom vrednošću HLB i kraćim alkil lancem (kaprilil/kapril-glukozid) obrazuje mikroemulzije u širem opsegu koncentracija korišćenih sastojaka.
- Rezultati su pokazali da polietoksilovani surfaktant koji je do sada nedovoljno korišćen u formulaciji farmaceutskih preparata – Emanon[®] EV-E (gliceret-7-kaprilat/kaprat) može uspešno da se koristi u formulaciji mikroemulzija kao koloidnih nosača lekova za dermalnu isporuku.
- Međutim, čini se da je efikasnost Emanon[®]-a EV-E u poređenju sa polisorbitom 80, kao široko primenjivanim surfaktantom u stabilizaciji mikroemulzija, nešto niža. Na osnovu pseudoternarnih dijagrama dobijenih za sisteme Capryol[™] 90/polietoksilovani surfaktant-Transcutol[®] P/voda, ustanovljena je suprotna tendencija u odnosu na APG surfaktante. Dakle, surfaktant koji je imao nižu HLB vrednost i veći lipofilni deo molekula je obrazovao širu mikroemulzionu oblast. Međutim, ovaj zaključak je potrebno potvrditi na većem broju uzoraka, gde bi trebalo da se variraju kosurfaktanti i/ili uljana faza sistema.
- Emanon[®] EV-E je pokazao sposobnost da formira mikroemulzije, osim u sprezi sa Transcutol[®]-om P, i sa ostalim kosurfaktantima – etanol, izopropanol, propilenglikol. Mogućnost kosurfaktanta da penetrira na međupovršinu između uljane i vodene faze, a time i veličina mikroemulzionih oblasti u sistemima u kojima je jedina promenjiva bila vrsta kosurfaktanta, je bila obrnuto proporcionalna polarnosti kosurfaktanta.
- Upotrebom različitih indirektnih fizičko-hemijskih metoda karakterizacije unutrašnje strukture sistema odabranih duž linije razblaženja S-CoS:uljana faza = 8:2, pokazano je da sistemi zasnovani na APG emulgatorima prevashodno obrazuju mikroemulzije bikontinuiranog ili invertnog bikontinuiranog tipa, bez kompletno razvijene kapljične U/V strukture. Osim toga, formiranje mikroemulzija tipa V/U je moguće jedino u slučaju korišćenja Plantacare[®] 810 UP, zbog nižeg sadržaja vode prisutne u komercijalnom proizvodu.
- Prelaz iz kapljične V/U unutrašnje strukture u mikroemulzije sa bikontinuiranom strukturom je detektovan u sistemima Capryol[™] 90/Emanon[®] EV-E/kosurfaktant/voda duž linije razblaženja S-CoS:uljana faza = 8:2, a frakcija vodene faze pri kojoj je do promene došlo

(perkolacioni prag) je bila povezana sa polarnošću kosurfaktanta u smislu lakšeg dostizanja perkolacionog praga u slučaju polarnijih kosurfaktanata.

- Na osnovu solubilizacionog kapaciteta formulacija odabranih duž linije razblaženja S-CoS:uljana faza = 8:2 za model lekovite supstance različitih fizičko-hemijskih osobina i terapijskih koncentracija – ADA i SN, odabrani su optimalni vehikulumi za njihovu topikalnu primenu. Kao pogodni nosači za ADA su se pokazale kako APG-mikroemulzije, tako i formulacija zasnovana na Emanon[®]-u EV-E. Sa druge strane, zbog niže rastvorljivosti SN u APG, njihovih visokih pH vrednosti i više terapijske koncentracije SN, APG-uzorci su se pokazali neefikasni za solubilizaciju ovog leka. Nasuprot tome, mikroemulzije sa polietoksilovanim surfaktantima koje su sadržavale različit surfaktant, odnosno različite kosurfaktante, i udeo vode od 30% (m/m) su uspešno rastvorile 2% (m/m) SN.
- Detaljnija karakterizacija unutrašnje strukture odabranih mikroemulzija kao nosača za dermalnu isporuku ADA i SN je potvrdila njihovu invertnu bikontinuiranu strukturu.
- Kod ispitivanog seta uzoraka je uočena teškoća u primeni AFM, kao direktne tehnike za karakterizaciju strukture mikroemulzija.
- EPR tehnika se pokazala kao pogodna za rasvetljavanje interakcija sastojaka sistema koje se direktno odražavaju na karakteristike međufaznog filma mikroemulzija (polarnost i pokretljivost međupovršine) i veličinu mikroemulzionih oblasti formiranih primenom različitih surfaktanata ili kosurfaktanata.
- Tokom karakterizacije strukture je uočeno da primena indirektnih tehnika (poput DSC) u nekim slučajevima može da generiše rezultate koji mogu otežano da se tumače ili navedu na pogrešne zaključke, čime je neophodnost simultane primene više različitih metoda u ove svrhe istaknuta u prvi plan. Takođe, tumačenje rezultata treba da se vrši veoma pažljivo, od slučaja do slučaja, jer se za različite sisteme može ustanoviti različito ponašanje, kao što je to slučaj u reološkom ponašanju APG-uzoraka naspram sistema zasnovanih na polietoksilovanim surfaktantima.

5.2. Druga faza eksperimentalnog rada

Na osnovu rezultata dobijenih u drugoj fazi eksperimentalnog rada, tokom koje su ispitivane karakteristike mikroemulzija sa solubilizovanim model lekovitim supstancama, lokalizacija lekova u vehikulumima, stabilnost uzoraka sa i bez lekovitih supstanci, kao i *in vivo* bezbednosni profil placebo formulacija, može se zaključiti sledeće:

- Inkorporiranje 0,1% (m/m) ADA u odabrane nosače nije promenilo značajno njihove fizičko-hemijske karakteristike (električnu provodljivost, prividni viskozitet i pH). Premda je solubilizovani ADA snizio pH vrednost svih vehikuluma, pH vrednosti uzoraka sa APG su bile nešto više i nepogodne za aplikaciju na kožu, te su dodatkom rastvora kiseline podešene na prihvatljiv nivo.
- Solubilizacijom SN (2%, m/m) je zbog rastvaranja nitratnih anjona u vodenoj fazi mikroemulzionih nosača došlo do očekivano značajnog porasta električne provodljivosti, odnosno pada pH. Međutim, uzorci su ostali prikladni za dermalnu primenu. Nasuprot tome, kao rezultat rastvaranja ove model lekovite supstance u mikroemulzijama njihov viskozitet je neznatno porastao.
- Indirektnim metodama (rastvorljivost u sastojcima mikroemulzija, merenja međupovršinskog napona i EPR) je uljana faza mikroemulzija određena kao glavno mesto solubilizacije SN u odabranim nosačima, pri čemu se nije moglo isključiti da je delom bio rastvoren na domenu međupovršine bliže uljanoj fazi. Sa druge strane, u slučaju ADA se nije moglo isključiti njegovo delimično prisustvo u vodenoj fazi, sa međufaznim filmom amfifila kao dominantim mestom solubilizacije ADA.
- Studijama stabilnosti je potvrđena inherentna termodinamička stabilnost svih uzoraka sa inkorporiranim model lekovitim supstancama, uprkos određenim promenama pH vrednosti i

električne provodljivosti, što je u slučaju uzoraka sa ADA bilo izraženije. Hemijske interakcije model lekova sa ostalim sastojcima mikroemulzionih nosača su takođe isključene FTIR spektroskopskom analizom.

- *In vivo* procena bezbednosnog profila ispitivanih placebo mikroemulzija zasnovanih na APG i polietoksilovanim surfaktantima je otkrila njihovu dobru podnošljivost, bez obzira na vrstu surfaktanta. Značajne razlike u merenim biofizičkim parametrima (EI, SCH i TEGV) nisu uočene između formulacija stabilizovanih surfaktantima koji pripadaju različitim grupama (APG i polietoksilovani surfaktanti), niti između uzoraka zasnovanih na surfaktantima u okviru iste grupe. Takođe, vrsta ulja nije značajno uticala na iritacioni potencijal uzoraka sa decil-glukozidom (Plantacare[®] 2000 UP), premda su monogliceridi ispoljili veću tendenciju ka narušavanju barijerne funkcije kože u odnosu na monoestar propilenglikola.

5.3. Treća faza eksperimentalnog rada

Rezultati dobijeni u trećoj fazi eksperimentalnog rada, tokom koje su procenjene biofarmaceutske karakteristike mikroemulzija sa solubilizovanim model lekovitim supstancama, su doveli do sledećih zaključaka:

- Količina SN ekstrahovanog iz svinjske kože pune debljine po završetku *in vitro* ispitivanja permeacije/penetracije leka je bila do 4,25 puta viša iz uzoraka kože tretiranih mikroemulzijama nego preparatom sa tržišta, što je bilo u korelaciji sa rezultatima dobijenim pri *in vitro* ispitivanju oslobađanja ovog leka, a koji su bili obrnuto proporcionalni saturacionoj rastvorljivosti SN u mikroemulzijama.
- Ciljna dermalna isporuka leka je postignuta aplikacijom mikroemulzija, jer pod korišćenim eksperimentalnim uslovima nije došlo do permacije SN.
- Mikroemulzioni uzorci čijom je primenom ostvarena nešto niža dermalna isporuka SN (ME-P80T) u odnosu na druge mikroemulzije formulacije su ovaj efekat kompenzovali nešto jačom antifungalnom aktivnošću, koja je u svim slučajevima bila značajno viša u odnosu na kontrolni komercijalni preparat.
- Primenom mikroemulzija postignuto je poboljšanje u *in vitro* dermalnoj isporuci ADA u odnosu na komercijalni preparat, pri čemu su količine leka ekstrahovane iz svinjske kože pune debljine bile više do 5,9 puta.
- Ipak, tokom biofarmaceutske karakterizacije uzoraka sa ADA zapažene su teškoće u uspostavljanju veza između rezultata dobijenih u odvojenim eksperimentima, što je bilo uslovljeno različitim eksperimentalnim uslovima (sintetske membrane ili svinjska koža, *infinite* i *finite* doziranje leka, primena ili odsustvo okluzije, dužina trajanja eksperimenta). Naime, unatoč tome što je kumulativna količina ADA oslobođenog u akceptorski medijum kroz dijalizne membrane bila niža iz mikroemulzija nego iz kontrolnog uzorka sa tržišta, zadržavanje leka u koži svinje pune debljine je bilo veće. U tom kontekstu, kao najefikasniji se pokazao APG-3 uzorak, zasnovan na Plantacare[®] 2000 UP i Imwitor[®]-u 742. Prema tome, sintetske membrane nisu bile potpuno sposobne da predvide kompleksne interakcije koje se odvijaju između kože i sastojaka mikroemulzionih sistema.
- U studiji sprovedenoj pod *finite dose* uslovima, deponovanje ADA u SC i folikule dlaka primenom mikroemulzija bilo je komparabilno akumulaciji leka u ovim odeljcima kože postignutoj aplikacijom komercijalnog preparata.
- Permeacija ADA u receptorski medijum, korišćen u *in vitro* proceni penetracije/permacije leka na koži uha svinje, koja je zabeležena nakon 24 h ispitivanja, može da bude ograničavajući faktor za kliničku primenu mikroemulzija.
- Iako je na primeru ADA, a jednim delom i na primeru SN, pokazano odsustvo sposobnosti sintetskih membrana za donošenje zaključaka o efektima mikroemulzionih uzoraka na koži, njihovom primenom mogu da se detektuju varijacije u sastavu mikroemulzionih nosača, što je potvrđeno i u slučaju *in vitro* ispitivanja (primenom vertikalnih difuzionih ćelija) sistema

sa obe model lekovite supstance. Osim toga, podjednaku sposobnost su pokazale i imerzione (inhenser) ćelije, čijom upotrebom je dobijen identičan poredak stepena oslobađanja SN iz mikroemulzija stabilizovanih različitim surfaktantima, odnosno različitim kosurfaktantima.

5.4. Četvrta faza eksperimentalnog rada

Na osnovu rezultata dobijenih u poslednjoj, četvrtoj fazi, eksperimentalnog rada mogu se izvesti sledeći zaključci o mogućnostima razvoja rastvorljivih mikroigala kao fizičkih pojačivača dermalne isporuke slabo rastvorljivog leka – SN, kao i proceni njihove efikasnosti u odnosu na prethodno razvijene mikroemulzije kao opciju hemijskog pojačivača penetracije ispitivane model lekovite supstance, kada se primene same ili u kombinaciji sa predtretmanom kože čvrstim silikonskim mikroiglama:

- Rastvorljive mikroigle kao nosači za SN nisu mogle da budu formulisane iz mikroemulzija ME-EVE i ME-P80T pri korišćenim eksperimentalnim uslovima, nagoveštavajući nepogodnost mikroemulzija za ovakvu vrstu manipulacija.
- Izrada nizova rastvorljivih mikroigala zadovoljavajućih geometrijskih i mehaničkih karakteristika je bila uspešna kada je kao polazna formulacija korišćen rastvor SN (25 mg/ml) u metanolnom rastvoru PVP (30%, m/V).
- *In vitro* rastvaranje dobijenih nizova rastvorljivih mikroigala i SN je bilo potpuno i veoma brzo (5 min).
- Zbog nižeg sadržaja leka u rastvorljivim mikroiglama i ograničene površine dostupne za izvođenje *in vitro* studije penetracije/permeacije, sprovođenje uporednih ispitivanja efikasnosti hemijskih i fizičkih pojačivača penetracije SN (mikroemulzije i mikroigle) u dermalnoj isporuci ovog leka je pod *infinite* uslovima doziranja bilo moguće samo u slučaju jedne vrste mikroigala – čvrstih silikonskih mikroigala koje su na kožu aplikovane kao predtretman, pre aplikacije mikroemulzija.
- Fizičko narušavanje barijerne funkcije kože ostvareno aplikacijom čvrstih silikonskih mikroigala neposredno pred primenu mikroemulzionih vehikuluma je dovelo do povećanja transporta leka u kožu, koje je bilo 1,90-2,02 puta više nego nakon lokalne primene istih mikroemulzija na intaktnu kožu. U slučaju primene kombinovanog pristupa je došlo do permeacije leka nakon 24-h kontakta formulacija sa kožom.
- Doprinos rastvorljivih mikroigala u poboljšanju isporuke SN u kožu u odnosu na ostale ispitivane pristupe, procenjen pod *finite dose* uslovima, je bio sličan efektu lokalno primenjene najperspektivnije mikroemulzione formulacije ME-EVE.
- Zbog nepotpune usaglašenosti rezultata dobijenih pri *in vitro* ispitivanju brzine rastvaranja SN iz rastvorljivih mikroigala u hidro-alkoholnom medijumu i *in vitro* proceni penetracije/permeacije SN iz rastvorljivih mikroigala na koži uha svinje, neophodna je optimizacija metode ispitivanja njihovih mehaničkih osobina na uzorcima svinjske kože.
- Zadržavanje SN u koži korišćenjem mikroemulzije, odnosno rastvorljivih mikroigala, je bilo značajno niže nego kada su udruženi mehanizmi delovanja fizičkog i hemijskog inhensera penetracije (sinergistički efekat čvrstih silikonskih mikroigala i mikroemulzije).
- U slučaju korišćenja fizičkih premošćivača kožne barijere uočen je prolazak leka kroz svinjsku kožu u akceptorsku fazu kod obe vrste mikroigala.

5.5. Konačan osvrt i budući koraci

Shodno dobijenim rezultatima eksperimenata izvršenim u okviru ove doktorske disertacije, kao generalni zaključak može se izvesti da se noviji i nedovoljno korišćeni nejonski surfaktanti dobijeni iz sirovina biljnog porekla (decil-glukozid, kaprilil/kapril-glukozid koji pripadaju grupi APG i polietoksilovani gliceret-7-kaprilat/kaprat) mogu uspešno primeniti u formulaciji

mikroemulzija kao naprednih koloidnih nosača različitih lekova, pri čemu u datoj eksperimentalnoj postavci prevashodno obrazuju bikontinuirane mikroemulzione sisteme.

Razvijene mikroemulzione formulacije sa solubilizovanim ispitivanim model lekovitim supstancama – ADA i SN, su pokazale veliki potencijal i zasigurno predstavljaju obećavajuće nosače za njihovu poboljšanu dermalnu isporuku. Ipak, u slučaju nekih uzoraka (pre svega sa ADA) prolazak leka u sistemsku cirkulaciju koji može da se pretpostavi na osnovu *in vitro* studija permeacije bi mogao da predstavlja faktor koji ograničava njihovu kliničku primenu. Iz tog razloga, dobijeni rezultati naglašavaju značaj pronalaženja i razvoja optimalnih formulacija koje omogućuju selektivnu isporuku leka u kožu bez prolaska u sistemsku cirkulaciju kako bi se terapijski efekat u lokalnom lečenju akni ili gljivičnih infekcija kože maksimizovao.

U okviru ove doktorske disertacije je pokazano da rastvorljive mikroigle mogu da se formulišu kao nosači za dermalnu isporuku nisko rastvorljive lekovite supstance. S obzirom da je sinergističko delovanje mikroigala i mikroemulzija bilo superiorno u odnosu na primenu samog fizičkog odnosno samog hemijskog premošćivača barijere SC, dodatni napori treba da se ulože u razvoj rastvorljivih mikroigala iz mikroemulzija kao prekursora za njihovu izradu, čime bi se u jednom nosaču iskoristile prednosti svakog od ovih različitih načina za poboljšanje dermalne i transdermalne isporuke lekova. Takođe se nametnula potreba za detaljnijom procenom mehaničkih osobina mikroigala, u smislu optimizacije načina provere njihove sposobnosti insercije u kožu.

Konačno, uzimajući u obzir da su različite biofarmaceutske metode karakterizacije ispitivanih uzoraka obezbedile donekle različite rezultate, njihova provera bi trebalo da bude sprovedena u okviru odgovarajućih *in vivo* ispitivanja.

6. LITERATURA

- [1] K.W. Ng, W.M. Lau, *Skin Deep: The Basics of Human Skin Structure and Drug Penetration*, in: N. Dragicevic, H.I. Maibach (Eds.) *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Drug Manipulation Strategies and Vehicle Effects*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2015, pp. 3-11.
- [2] T. Shukla, N. Upmanyu, M. Agrawal, S. Saraf, S. Saraf, A. Alexander, Biomedical applications of microemulsion through dermal and transdermal route, *Biomed. Pharmacother.*, 108 (2018) 1477-1494.
- [3] Y. Chen, X. Feng, S. Meng, Site-specific drug delivery in the skin for the localized treatment of skin diseases, *Expert opinion on drug delivery*, 16 (2019) 847-867.
- [4] M. Gibson, *Pharmaceutical Preformulation and Formulation*, 2nd ed., IHS Health Group, USA, 2009.
- [5] D.I.J. Morrow, P.A. McCarron, A.D. Woolfson, R.F. Donnelly, Innovative Strategies for Enhancing Topical and Transdermal Drug Delivery, *The Open Drug Delivery Journal*, 1 (2007) 36-59.
- [6] H. Marwah, T. Garg, A.K. Goyal, G. Rath, Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery, *Drug Deliv.*, 23 (2016) 564-578.
- [7] T.N. Tran, Cutaneous drug delivery: an update, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 16 (2013) S67-69.
- [8] J.P. Atkinson, H.I. Maibach, N. Dragicevic, Targets in Dermal and Transdermal Delivery and Classification of Penetration Enhancement Methods, (2015) 93-108.
- [9] N. Sharma, Agarwal, G., A. C. Rana, Bhat, Z.A., Kumar, D., A Review: Transdermal Drug Delivery System: A Tool For Novel Drug Delivery System, *Int. J. Drug Dev. & Res.*, 3 (2011) 70-84.
- [10] A. Banga, *Transdermal and intradermal delivery of therapeutic agents: Application of physical technologies*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 2011.
- [11] R.F. Donnelly, T.R.R. Singh, D.I. Morrow, A.D. Woolfson, *Microneedle-mediated transdermal and intradermal drug delivery*, John Wiley & Sons, 2012.
- [12] B. Baroli, Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality?, *J. Pharm. Sci.*, 99 (2010) 21-50.
- [13] M. Rizwan, M. Aqil, S. Talegaonkar, A. Azeem, Y. Sultana, A. Ali, Enhanced Transdermal Drug Delivery Techniques: An Extensive Review of Patents, *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 3 (2009) 105-124.
- [14] C. Nastiti, T. Ponto, E. Abd, J.E. Grice, H.A.E. Benson, M.S. Roberts, Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery, *Pharmaceutics*, 9 (2017).
- [15] M.J. Lawrence, G.D. Rees, Microemulsion-based media as novel drug delivery systems, *Adv. Drug Del. Rev.*, 64 (2012) 175-193.
- [16] S. Heuschkel, A. Goebel, R.H. Neubert, Microemulsions-modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery, *J. Pharm. Sci.*, 97 (2008) 603-631.

- [17] D.J. McClements, Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities, *Soft Matter*, 8 (2012) 1719-1729.
- [18] L.B. Lopes, Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions, *Pharmaceutics*, 6 (2014) 52-77.
- [19] R. Cortesi, C. Nastruzzi, Liposomes, micelles and microemulsions as new delivery systems for cytotoxic alkaloids, *Pharm. Sci. Technol. Today*, 2 (1999) 288-298.
- [20] S.N. Kale, S.L. Deore, Emulsion Micro Emulsion and Nano Emulsion: A Review, *Systematic Reviews in Pharmacy*, 8 (2016) 39-47.
- [21] M. Fanun, *Microemulsions: properties and applications*, CRC Press, Boca Raton, FL, 2009.
- [22] J. Sjöblom, R. Lindberg, S.E. Friberg, Microemulsions — phase equilibria characterization, structures, applications and chemical reactions, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 65 (1996) 125-287.
- [23] A. Azeem, Z.I. Khan, M. Aqil, F.J. Ahmad, R.K. Khar, S. Talegaonkar, Microemulsions as a surrogate carrier for dermal drug delivery, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 35 (2009) 525-547.
- [24] A. Perazzo, V. Preziosi, S. Guido, Phase inversion emulsification: Current understanding and applications, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 222 (2015) 581-599.
- [25] C. Tondre, Dynamic Processes in Microemulsions, in: R. Zana (Ed.) *Dynamics of Surfactant Self-Assemblies: Micelles, Microemulsions, Vesicles and Lyotropic Phases*, CRC Press 2005, pp. 233-298.
- [26] L. Đekić, Formulaciona istraživanja nejonskih mikroemulzija kao potencijalnih nosača za lokalnu primenu nesteroidnih antiinflamatornih lekova. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, 2011.
- [27] M. Todosijevic, Formulacija, fizičko-hemijska karakterizacija i biološka ispitivanja biokompatibilnih mikroemulzija za dermalnu i transdermalnu isporuku aceklofenaka. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, 2017.
- [28] R.C. Santana, F.A. Perrechil, R.L. Cunha, High- and Low-Energy Emulsifications for Food Applications: A Focus on Process Parameters, *Food Engineering Reviews*, 5 (2013) 107-122.
- [29] V. Savic, M. Todosijevic, T. Ilic, M. Lukic, E. Mitsou, V. Papadimitriou, S. Avramiotis, B. Markovic, N. Cekic, S. Savic, Tacrolimus loaded biocompatible lecithin-based microemulsions with improved skin penetration: Structure characterization and in vitro/in vivo performances, *Int. J. Pharm.*, 529 (2017) 491-505.
- [30] M.N. Todosijević, N.D. Cekić, M.M. Savić, M. Gašperlin, D.V. Randelović, S.D. Savić, Sucrose ester-based biocompatible microemulsions as vehicles for aceclofenac as a model drug: formulation approach using D-optimal mixture design, *Colloid. Polym. Sci.*, 292 (2014) 3061-3076.
- [31] G. Kaur, S.K. Mehta, Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications, *Int. J. Pharm.*, 529 (2017) 134-160.
- [32] S.L. Alade, R.E. Brown, A. Paquet, Polysorbate 80 and E-Ferol Toxicity, *Pediatrics*, 77 (1986) 593-597.

- [33] M. Bergh, K. Magnusson, J.L.G. Nilsson, A.-T. Karlberg, Contact allergenic activity of Tween[®] 80 before and after air exposure, *Contact Dermatitis*, 37 (1997) 9-18.
- [34] T.F. Tadros, *Applied Surfactants: Principles and Applications*, Wiley, Weinheim, 2005.
- [35] K. Holmberg, Natural surfactants, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 6 (2001) 148-159.
- [36] A.S. Goebel, U. Knie, C. Abels, J. Wohlrab, R.H. Neubert, Dermal targeting using colloidal carrier systems with linoleic acid, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 75 (2010) 162-172.
- [37] F. Tadros Tharwat, *An Introduction to Surfactants*, Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston, 2014.
- [38] M.B. Delgado-Charro, G. Iglesias-Vilas, J. Blanco-Méndez, M.A. López-Quintela, J.-P. Marty, R.H. Guy, Delivery of a hydrophilic solute through the skin from novel microemulsion systems, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 43 (1997) 37-42.
- [39] M.R. Patel, R.B. Patel, J.R. Parikh, B.G. Patel, Novel isotretinoin microemulsion-based gel for targeted topical therapy of acne: formulation consideration, skin retention and skin irritation studies, *Applied Nanoscience*, 6 (2015) 539-553.
- [40] F.F. Sahle, J. Wohlrab, R.H. Neubert, Controlled penetration of ceramides into and across the stratum corneum using various types of microemulsions and formulation associated toxicity studies, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 86 (2014) 244-250.
- [41] A. Kovačević, Lipidne nanočestice stabilizovane nejonskim polihidroksilnim surfaktantima: postupak dobijanja, karakterizacija, stabilnost i inkorporiranje lekovite supstance. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet 2014.
- [42] CIR, Final Safety Assessment - Decyl Glucoside and Other Alkyl Glucosides as Used in Cosmetics, 2011.
- [43] K. Fukuda, U. Olsson, M. Ueno, Microemulsion formed by alkyl polyglucoside and an alkyl glycerol ether with weakly charged films, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 20 (2001) 129-135.
- [44] L.D. Ryan, E.W. Kaler, Alkyl polyglucoside microemulsion phase behavior, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects*, 176 (2001) 69-83.
- [45] A.S. Goebel, R.H. Neubert, J. Wohlrab, Dermal targeting of tacrolimus using colloidal carrier systems, *Int. J. Pharm.*, 404 (2011) 159-168.
- [46] A. Cichewicz, C. Pacleb, A. Connors, M.A. Hass, L.B. Lopes, Cutaneous delivery of alpha-tocopherol and lipoic acid using microemulsions: influence of composition and charge, *J. Pharm. Pharmacol.*, 65 (2013) 817-826.
- [47] M. Trotta, E. Ugazio, E. Peira, C. Pulitano, Influence of ion pairing on topical delivery of retinoic acid from microemulsions, *J. Control. Release*, 86 (2003) 315-321.
- [48] D. Pepe, J. Phelps, K. Lewis, J. Dujack, K. Scarlett, S. Jahan, E. Bonnier, T. Milic-Pasetto, M.A. Hass, L.B. Lopes, Decylglucoside-based microemulsions for cutaneous localization of lycopene and ascorbic acid, *Int. J. Pharm.*, 434 (2012) 420-428.

- [49] S. Savic, G. Vuleta, R. Daniels, C.C. Müller-Goymann, Colloidal microstructure of binary systems and model creams stabilized with an alkylpolyglucoside non-ionic emulsifier, *Colloid. Polym. Sci.*, 283 (2004) 439-451.
- [50] J.C. Schwarz, V. Klang, M. Hoppel, D. Mahrhauser, C. Valenta, Natural microemulsions: formulation design and skin interaction, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 81 (2012) 557-562.
- [51] A.N. ElMeshad, M.I. Tadros, Transdermal delivery of an anti-cancer drug via w/o emulsions based on alkyl polyglycosides and lecithin: design, characterization, and in vivo evaluation of the possible irritation potential in rats, *AAPS PharmSciTech*, 12 (2011) 1-9.
- [52] A. Graf, E. Ablinger, S. Peters, A. Zimmer, S. Hook, T. Rades, Microemulsions containing lecithin and sugar-based surfactants: nanoparticle templates for delivery of proteins and peptides, *Int. J. Pharm.*, 350 (2008) 351-360.
- [53] E. Peira, M.E. Carlotti, C. Trotta, R. Cavalli, M. Trotta, Positively charged microemulsions for topical application, *Int. J. Pharm.*, 346 (2008) 119-123.
- [54] N. Pakpayat, F. Nielloud, R. Fortune, C. Tourne-Peteilh, A. Villarreal, I. Grillo, B. Bataille, Formulation of ascorbic acid microemulsions with alkyl polyglycosides, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 72 (2009) 444-452.
- [55] J. Zhang, B.B. Michniak-Kohn, Investigation of microemulsion and microemulsion gel formulations for dermal delivery of clotrimazole, *Int. J. Pharm.*, 536 (2017) 345-352.
- [56] A.C. Sintov, L. Shapiro, New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo, *J. Control. Release*, 95 (2004) 173-183.
- [57] R. Mishra, K.S. Prabhavalkar, L.K. Bhatt, Preparation, optimization, and evaluation of Zaltoprofen-loaded microemulsion and microemulsion-based gel for transdermal delivery, *J. Liposome Res.*, 26 (2016) 297-306.
- [58] A.C. Sintov, Transdermal delivery of curcumin via microemulsion, *Int. J. Pharm.*, 481 (2015) 97-103.
- [59] M.R. Patel, R.B. Patel, J.R. Parikh, B.G. Patel, Novel microemulsion-based gel formulation of tazarotene for therapy of acne, *Pharm. Dev. Technol.*, 21 (2016) 921-932.
- [60] https://www.kaochemicals-eu.com/sites/default/files/privatecontent/2013-04-23_emanon_ev-e_eng_0.pdf (poslednji pristup 25.11.2019).
- [61] G.M. El Maghraby, Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: effects of cosurfactants, *Int. J. Pharm.*, 355 (2008) 285-292.
- [62] W. Zhu, A. Yu, W. Wang, R. Dong, J. Wu, G. Zhai, Formulation design of microemulsion for dermal delivery of penciclovir, *Int. J. Pharm.*, 360 (2008) 184-190.
- [63] A.S. Narang, D. Delmarre, D. Gao, Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions, *Int. J. Pharm.*, 345 (2007) 9-25.
- [64] E. Escribano, M. Obach, M.I. Arevalo, A.C. Calpena, J. Domenech, J. Queralt, Rapid human skin permeation and topical anaesthetic activity of a new amethocaine microemulsion, *Skin Pharmacol. Physiol.*, 18 (2005) 294-300.

- [65] H. Liu, Y. Wang, Y. Lang, H. Yao, Y. Dong, S. Li, Bicontinuous cyclosporin a loaded water-AOT/Tween 85-isopropylmyristate microemulsion: structural characterization and dermal pharmacokinetics in vivo, *J. Pharm. Sci.*, 98 (2009) 1167-1176.
- [66] B. Rozman, M. Gasperlin, E. Tinois-Tessoneaud, F. Pirot, F. Falson, Simultaneous absorption of vitamins C and E from topical microemulsions using reconstructed human epidermis as a skin model, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 72 (2009) 69-75.
- [67] B. Baroli, M.A. López-Quintela, M.B. Delgado-Charro, A.M. Fadda, J. Blanco-Méndez, Microemulsions for topical delivery of 8-methoxsalen, *J. Control. Release*, 69 (2000) 209-218.
- [68] D. Pepe, M. McCall, H. Zheng, L.B. Lopes, Protein transduction domain-containing microemulsions as cutaneous delivery systems for an anticancer agent, *J. Pharm. Sci.*, 102 (2013) 1476-1487.
- [69] G. Bhatia, Y. Zhou, A.K. Banga, Adapalene microemulsion for transfollicular drug delivery, *J. Pharm. Sci.*, 102 (2013) 2622-2631.
- [70] D.I. Friedman, J.S. Schwarz, M. Weisspapir, Submicron Emulsion Vehicle for Enhanced Transdermal Delivery of Steroidal and Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs, *J. Pharm. Sci.*, 84 (1995) 324-329.
- [71] J.S. Schwarz, M.R. Weisspapir, D.I. Friedman, Enhanced Transdermal Delivery of Diazepam by Submicron Emulsion (SME) Creams, *Pharm. Res.*, 12 (1995) 687-692.
- [72] J. Shim, M.J. Kim, H.K. Kim, D.H. Kim, S.G. Oh, S.Y. Ko, H.G. Jang, J.W. Kim, Morphological effect of lipid carriers on permeation of lidocaine hydrochloride through lipid membranes, *Int. J. Pharm.*, 388 (2010) 251-256.
- [73] R.M. Hathout, S. Mansour, N.D. Mortada, A.S. Geneidi, R.H. Guy, Uptake of microemulsion components into the stratum corneum and their molecular effects on skin barrier function, *Mol. Pharm.*, 7 (2010) 1266-1273.
- [74] L.B. Lopes, H. VanDeWall, H.T. Li, V. Venugopal, H.K. Li, S. Naydin, J. Hosmer, M. Levendusky, H. Zheng, M.V. Bentley, R. Levin, M.A. Hass, Topical delivery of lycopene using microemulsions: enhanced skin penetration and tissue antioxidant activity, *J. Pharm. Sci.*, 99 (2010) 1346-1357.
- [75] N. Dragicevic, J.P. Atkinson, H.I. Maibach, Chemical Penetration Enhancers: Classification and Mode of Action, (2015) 11-27.
- [76] R.R. Gupta, S.K. Jain, M. Varshney, AOT water-in-oil microemulsions as a penetration enhancer in transdermal drug delivery of 5-fluorouracil, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 41 (2005) 25-32.
- [77] J. Zhang, B. Michniak-Kohn, Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs: ketoprofen, lidocaine, and caffeine, *Int. J. Pharm.*, 421 (2011) 34-44.
- [78] L. Djordjevic, M. Primorac, M. Stupar, In vitro release of diclofenac diethylamine from caprylocaproyl macroglycerides based microemulsions, *Int. J. Pharm.*, 296 (2005) 73-79.

- [79] R.M. Hathout, T.J. Woodman, S. Mansour, N.D. Mortada, A.S. Geneidi, R.H. Guy, Microemulsion formulations for the transdermal delivery of testosterone, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 40 (2010) 188-196.
- [80] M. Kreilgaard, Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery, *Adv. Drug Del. Rev.*, 54 (2002) S77-S98.
- [81] L.M. Land, P. Li, P.M. Bummer, Mass transport properties of progesterone and estradiol in model microemulsion formulations, *Pharm. Res.*, 23 (2006) 2482-2490.
- [82] A. Patzelt, J. Lademann, Drug delivery to hair follicles, *Expert opinion on drug delivery*, 10 (2013) 787-797.
- [83] S.S. Biju, A. Ahuja, R.K. Khar, Tea tree oil concentration in follicular casts after topical delivery: determination by high-performance thin layer chromatography using a perfused bovine udder model, *J. Pharm. Sci.*, 94 (2005) 240-245.
- [84] A. Teichmann, S. Heuschkel, U. Jacobi, G. Presse, R.H. Neubert, W. Sterry, J. Lademann, Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 67 (2007) 699-706.
- [85] S. Vučen, Formulacija i karakterizacija rastvorljivih mikroigala za kontrolisanu transdermalnu primjenu ketoprofena inkapsuliranog u polimerne nanočestice. Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet - Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2013.
- [86] J.J. Escobar-Chavez, D. Bonilla-Martinez, M.A. Villegas-Gonzalez, E. Molina-Trinidad, N. Casas-Alancaster, A.L. Revilla-Vazquez, Microneedles: a valuable physical enhancer to increase transdermal drug delivery, *J. Clin. Pharmacol.*, 51 (2011) 964-977.
- [87] H. Lev-Tov, How Microneedles Can Change Cutaneous Drug Delivery-Small Needles Make a Big Difference, *JAMA dermatology*, 153 (2017) 631-632.
- [88] H. Lee, C. Song, S. Baik, D. Kim, T. Hyeon, D.H. Kim, Device-assisted transdermal drug delivery, *Adv Drug Deliv Rev*, 127 (2018) 35-45.
- [89] K. van der Maaden, W. Jiskoot, J. Bouwstra, Microneedle technologies for (trans)dermal drug and vaccine delivery, *J. Control. Release*, 161 (2012) 645-655.
- [90] K. Ita, Transdermal Delivery of Drugs with Microneedles-Potential and Challenges, *Pharmaceutics*, 7 (2015) 90-105.
- [91] Y.C. Kim, J.H. Park, M.R. Prausnitz, Microneedles for drug and vaccine delivery, *Adv Drug Deliv Rev*, 64 (2012) 1547-1568.
- [92] S. Bhatnagar, P. Kumari, S.P. Pattarabhiran, V.V.K. Venuganti, Zein Microneedles for Localized Delivery of Chemotherapeutic Agents to Treat Breast Cancer: Drug Loading, Release Behavior, and Skin Permeation Studies, *AAPS PharmSciTech*, 19 (2018) 1818-1826.
- [93] E. Larrañeta, R.E.M. Lutton, A.D. Woolfson, R.F. Donnelly, Microneedle arrays as transdermal and intradermal drug delivery systems: Materials science, manufacture and commercial development, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 104 (2016) 1-32.

- [94] M.G. McGrath, S. Vucen, A. Vrdoljak, A. Kelly, C. O'Mahony, A.M. Crean, A. Moore, Production of dissolvable microneedles using an atomised spray process: effect of microneedle composition on skin penetration, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 86 (2014) 200-211.
- [95] S. Vučen, Bubić Pajić, N., Savić, S., & Vuleta, G, Mikroigle - fizički pojačivači (trans)dermalne isporuke lijekova, *Arhiv za farmaciju*, 64 (2014) 295-321.
- [96] R.F. Donnelly, T.R. Raj Singh, A.D. Woolfson, Microneedle-based drug delivery systems: microfabrication, drug delivery, and safety, *Drug Deliv.*, 17 (2010) 187-207.
- [97] J.H. Park, M.G. Allen, M.R. Prausnitz, Polymer microneedles for controlled-release drug delivery, *Pharm. Res.*, 23 (2006) 1008-1019.
- [98] A. Laurent, F. Mistretta, D. Bottigioli, K. Dahel, C. Goujon, J.F. Nicolas, A. Hennino, P.E. Laurent, Echographic measurement of skin thickness in adults by high frequency ultrasound to assess the appropriate microneedle length for intradermal delivery of vaccines, *Vaccine*, 25 (2007) 6423-6430.
- [99] V. Sachdeva, A. K. Banga, Microneedles and their Applications, *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 5 (2011) 95-132.
- [100] T. Waghule, G. Singhvi, S.K. Dubey, M.M. Pandey, G. Gupta, M. Singh, K. Dua, Microneedles: A smart approach and increasing potential for transdermal drug delivery system, *Biomed. Pharmacother.*, 109 (2019) 1249-1258.
- [101] S. Dharadhar, A. Majumdar, S. Dhoble, V. Patravale, Microneedles for transdermal drug delivery: a systematic review, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 45 (2019) 188-201.
- [102] R.F. Donnelly, R. Majithiya, T.R. Singh, D.I. Morrow, M.J. Garland, Y.K. Demir, K. Migalska, E. Ryan, D. Gillen, C.J. Scott, A.D. Woolfson, Design, optimization and characterisation of polymeric microneedle arrays prepared by a novel laser-based micromoulding technique, *Pharm. Res.*, 28 (2011) 41-57.
- [103] S. Henry, D.V. McAllister, M.G. Allen, M.R. Prausnitz, Microfabricated microneedles: a novel approach to transdermal drug delivery, *J. Pharm. Sci.*, 87 (1998) 922-925.
- [104] A. Vrdoljak, E.A. Allen, F. Ferrara, N.J. Temperton, A.M. Crean, A.C. Moore, Induction of broad immunity by thermostabilised vaccines incorporated in dissolvable microneedles using novel fabrication methods, *J. Control. Release*, 225 (2016) 192-204.
- [105] S.N. Economidou, C.P.P. Pere, A. Reid, M.J. Uddin, J.F.C. Windmill, D.A. Lamprou, D. Douroumis, 3D printed microneedle patches using stereolithography (SLA) for intradermal insulin delivery, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 102 (2019) 743-755.
- [106] M.A. Luzuriaga, D.R. Berry, J.C. Reagan, R.A. Smaldone, J.J. Gassensmith, Biodegradable 3D printed polymer microneedles for transdermal drug delivery, *Lab on a chip*, 18 (2018) 1223-1230.
- [107] E. Caffarel-Salvador, T.M. Tuan-Mahmood, J.C. McElnay, H.O. McCarthy, K. Mooney, A.D. Woolfson, R.F. Donnelly, Potential of hydrogel-forming and dissolving microneedles for use in paediatric populations, *Int. J. Pharm.*, 489 (2015) 158-169.

- [108] E.M. Migdadi, A.J. Courtenay, I.A. Tekko, M.T.C. McCrudden, M.C. Kearney, E. McAlister, H.O. McCarthy, R.F. Donnelly, Hydrogel-forming microneedles enhance transdermal delivery of metformin hydrochloride, *J. Control. Release*, 285 (2018) 142-151.
- [109] M.T. McCrudden, A.Z. Alkilani, C.M. McCrudden, E. McAlister, H.O. McCarthy, A.D. Woolfson, R.F. Donnelly, Design and physicochemical characterisation of novel dissolving polymeric microneedle arrays for transdermal delivery of high dose, low molecular weight drugs, *J. Control. Release*, 180 (2014) 71-80.
- [110] H.L. Quinn, L. Bonham, C.M. Hughes, R.F. Donnelly, Design of a Dissolving Microneedle Platform for Transdermal Delivery of a Fixed-Dose Combination of Cardiovascular Drugs, *J. Pharm. Sci.*, 104 (2015) 3490-3500.
- [111] D.P. Wermeling, S.L. Banks, D.A. Hudson, H.S. Gill, J. Gupta, M.R. Prausnitz, A.L. Stinchcomb, Microneedles permit transdermal delivery of a skin-impermeant medication to humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105 (2008) 2058-2063.
- [112] J. Nguyen, K.B. Ita, M.J. Morra, I.E. Popova, The Influence of Solid Microneedles on the Transdermal Delivery of Selected Antiepileptic Drugs, *Pharmaceutics*, 8 (2016).
- [113] P. Gonzalez-Vazquez, E. Larraneta, M.T.C. McCrudden, C. Jarrahian, A. Rein-Weston, M. Quintanar-Solares, D. Zehring, H. McCarthy, A.J. Courtenay, R.F. Donnelly, Transdermal delivery of gentamicin using dissolving microneedle arrays for potential treatment of neonatal sepsis, *J. Control. Release*, 265 (2017) 30-40.
- [114] K. Migalska, D.I. Morrow, M.J. Garland, R. Thakur, A.D. Woolfson, R.F. Donnelly, Laser-engineered dissolving microneedle arrays for transdermal macromolecular drug delivery, *Pharm. Res.*, 28 (2011) 1919-1930.
- [115] Y. Zhang, J. Wang, J. Yu, D. Wen, A.R. Kahkoska, Y. Lu, X. Zhang, J.B. Buse, Z. Gu, Bioresponsive Microneedles with a Sheath Structure for H₂ O₂ and pH Cascade-Triggered Insulin Delivery, *Small*, 14 (2018) e1704181.
- [116] Y.A. Gomaa, M.J. Garland, F. McInnes, L.K. El-Khordagui, C. Wilson, R.F. Donnelly, Laser-engineered dissolving microneedles for active transdermal delivery of nadroparin calcium, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 82 (2012) 299-307.
- [117] M.T. McCrudden, B.M. Torrisi, S. Al-Zahrani, C.M. McCrudden, M. Zaric, C.J. Scott, A. Kissenpfennig, H.O. McCarthy, R.F. Donnelly, Laser-engineered dissolving microneedle arrays for protein delivery: potential for enhanced intradermal vaccination, *J. Pharm. Pharmacol.*, 67 (2015) 409-425.
- [118] J.W. Lee, S.O. Choi, E.I. Felner, M.R. Prausnitz, Dissolving microneedle patch for transdermal delivery of human growth hormone, *Small*, 7 (2011) 531-539.
- [119] M. Pearton, V. Saller, S.A. Coulman, C. Gateley, A.V. Anstey, V. Zarnitsyn, J.C. Birchall, Microneedle delivery of plasmid DNA to living human skin: Formulation coating, skin insertion and gene expression, *J. Control. Release*, 160 (2012) 561-569.
- [120] R.H. Chong, E. Gonzalez-Gonzalez, M.F. Lara, T.J. Speaker, C.H. Contag, R.L. Kaspar, S.A. Coulman, R. Hargest, J.C. Birchall, Gene silencing following siRNA delivery to skin via coated steel microneedles: In vitro and in vivo proof-of-concept, *J. Control. Release*, 166 (2013) 211-219.

- [121] R.F. Donnelly, M.T. McCrudden, A. Zaid Alkilani, E. Larraneta, E. McAlister, A.J. Courtenay, M.C. Kearney, T.R. Singh, H.O. McCarthy, V.L. Kett, E. Caffarel-Salvador, S. Al-Zahrani, A.D. Woolfson, Hydrogel-forming microneedles prepared from "super swelling" polymers combined with lyophilised wafers for transdermal drug delivery, *PLoS One*, 9 (2014) e111547.
- [122] S. Fakhraei Lahiji, S.H. Seo, S. Kim, M. Dangol, J. Shim, C.G. Li, Y. Ma, C. Lee, G. Kang, H. Yang, K.Y. Choi, H. Jung, Transcutaneous implantation of valproic acid-encapsulated dissolving microneedles induces hair regrowth, *Biomaterials*, 167 (2018) 69-79.
- [123] H.R. Jeong, J.Y. Kim, S.N. Kim, J.H. Park, Local dermal delivery of cyclosporin A, a hydrophobic and high molecular weight drug, using dissolving microneedles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 127 (2018) 237-243.
- [124] T. Ilic, S. Savic, B. Batinic, B. Markovic, M. Schmidberger, D. Lunter, M. Savic, S. Savic, 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 (2018) 110-119.
- [125] M.N. Kelchen, N.K. Brogden, In Vitro Skin Retention and Drug Permeation through Intact and Microneedle Pretreated Skin after Application of Propranolol Loaded Microemulsions, *Pharm. Res.*, 35 (2018) 228.
- [126] G. Mojeiko, M. de Brito, G.C. Salata, L.B. Lopes, Combination of microneedles and microemulsions to increase celecoxib topical delivery for potential application in chemoprevention of breast cancer, *Int. J. Pharm.*, 560 (2019) 365-376.
- [127] Q. Zu, Y. Yu, X. Bi, R. Zhang, L. Di, Microneedle-Assisted Percutaneous Delivery of a Tetramethylpyrazine-Loaded Microemulsion, *Molecules*, 22 (2017).
- [128] J. Kennedy, E. Larraneta, M.T.C. McCrudden, C.M. McCrudden, A.J. Brady, S.J. Fallows, H.O. McCarthy, A. Kissenpfennig, R.F. Donnelly, In vivo studies investigating biodistribution of nanoparticle-encapsulated rhodamine B delivered via dissolving microneedles, *J. Control. Release*, 265 (2017) 57-65.
- [129] J. Monkare, M. Pontier, E.E.M. van Kampen, G. Du, M. Leone, S. Romeijn, M.R. Nejadnik, C. O'Mahony, B. Slutter, W. Jiskoot, J.A. Bouwstra, Development of PLGA nanoparticle loaded dissolving microneedles and comparison with hollow microneedles in intradermal vaccine delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 129 (2018) 111-121.
- [130] L.K. Vora, R.F. Donnelly, E. Larraneta, P. Gonzalez-Vazquez, R.R.S. Thakur, P.R. Vavia, Novel bilayer dissolving microneedle arrays with concentrated PLGA nano-microparticles for targeted intradermal delivery: Proof of concept, *J. Control. Release*, 265 (2017) 93-101.
- [131] Y. Zhang, Q. Liu, J. Yu, S. Yu, J. Wang, L. Qiang, Z. Gu, Locally Induced Adipose Tissue Browning by Microneedle Patch for Obesity Treatment, *ACS nano*, 11 (2017) 9223-9230.
- [132] S. Abdelghany, I.A. Tekko, L. Vora, E. Larraneta, A.D. Permana, R.F. Donnelly, Nanosuspension-Based Dissolving Microneedle Arrays for Intradermal Delivery of Curcumin, *Pharmaceutics*, 11 (2019).
- [133] L.K. Vora, P.R. Vavia, E. Larraneta, S.E.J. Bell, R.F. Donnelly, Novel nanosuspension-based dissolving microneedle arrays for transdermal delivery of a hydrophobic drug, *Journal of interdisciplinary nanomedicine*, 3 (2018) 89-101.

- [134] P.C. DeMuth, Y. Min, D.J. Irvine, P.T. Hammond, Implantable silk composite microneedles for programmable vaccine release kinetics and enhanced immunogenicity in transcutaneous immunization, *Advanced healthcare materials*, 3 (2014) 47-58.
- [135] S.R. Vucen, G. Vuleta, A.M. Crean, A.C. Moore, N. Ignjatovic, D. Uskokovic, Improved percutaneous delivery of ketoprofen using combined application of nanocarriers and silicon microneedles, *J. Pharm. Pharmacol.*, 65 (2013) 1451-1462.
- [136] T.M. Tuan-Mahmood, M.T. McCrudden, B.M. Torrisi, E. McAlister, M.J. Garland, T.R. Singh, R.F. Donnelly, Microneedles for intradermal and transdermal drug delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 50 (2013) 623-637.
- [137] S. Duarah, M. Sharma, J. Wen, Recent advances in microneedle-based drug delivery: Special emphasis on its use in paediatric population, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 136 (2019) 48-69.
- [138] J.J. Norman, M.R. Brown, N.A. Raviele, M.R. Prausnitz, E.I. Felner, Faster pharmacokinetics and increased patient acceptance of intradermal insulin delivery using a single hollow microneedle in children and adolescents with type 1 diabetes, *Pediatr. Diabetes*, 14 (2013) 459-465.
- [139] E.L. Spierings, J.L. Brandes, D.B. Kudrow, J. Weintraub, P.C. Schmidt, D.J. Kellerman, S.J. Tepper, Randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, multi-center study of the safety and efficacy of ADAM zolmitriptan for the acute treatment of migraine, *Cephalalgia*, 38 (2018) 215-224.
- [140] P.E. Daddona, J.A. Matriano, J. Mandema, Y.F. Maa, Parathyroid hormone (1-34)-coated microneedle patch system: clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics for treatment of osteoporosis, *Pharm. Res.*, 28 (2011) 159-165.
- [141] S. Güngör, M.S. Erdal, B. Aksu, New Formulation Strategies in Topical Antifungal Therapy, *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, 03 (2013) 56-65.
- [142] M. Manian, K. Madrasi, A. Chaturvedula, A.K. Banga, Investigation of the Dermal Absorption and Irritation Potential of Sertaconazole Nitrate Anhydrous Gel, *Pharmaceutics*, 8 (2016).
- [143] S.A.A. Radwan, A.N. ElMeshad, R.A. Shoukri, Microemulsion loaded hydrogel as a promising vehicle for dermal delivery of the antifungal sertaconazole: design, optimization and ex vivo evaluation, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 43 (2017) 1351-1365.
- [144] H. Harde, A.K. Agrawal, M. Katariya, D. Kale, S. Jain, Development of a topical adapalene-solid lipid nanoparticle loaded gel with enhanced efficacy and improved skin tolerability, *RSC Advances*, 5 (2015) 43917-43929.
- [145] S. Mukherjee, A. Date, V. Patravale, H.C. Korting, A. Roeder, G. Weindl, Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety, *Clin. Interv. Aging*, 1 (2006) 327-348.
- [146] S. Piskin, E. Uzunali, A review of the use of adapalene for the treatment of acne vulgaris, 3 (2007) 621-624.
- [147] J.D. Croxtall, G.L. Plosker, Sertaconazole: a review of its use in the management of superficial mycoses in dermatology and gynaecology, *Drugs*, 69 (2009) 339-359.

- [148] M.A. Pfaller, D.A. Sutton, Review of in vitro activity of sertaconazole nitrate in the treatment of superficial fungal infections, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 56 (2006) 147-152.
- [149] J. Agut, M. Moren, M. Rego, A. Sacristán, J. Ortiz, Pharmacokinetic evaluation of labelled sertaconazole after dermal application, 42 (1992) 748-751.
- [150] S.K. Mandlik, S.S. Siras, K.R. Birajdar, Optimization and characterization of sertaconazole nitrate flexisomes embedded in hydrogel for improved antifungal activity, *J. Liposome Res.*, (2017) 1-11.
- [151] V.V. Pande, N.A. Kadnor, R.N. Kadam, S.A. Upadhye, Fabrication and Characterization of Sertaconazole Nitrate Microsponge as a Topical Drug Delivery System, *Indian J. Pharm. Sci.*, 77 (2015) 675-680.
- [152] M.M. Abdellatif, I.A. Khalil, M.A.F. Khalil, Sertaconazole nitrate loaded nanovesicular systems for targeting skin fungal infection: In-vitro, ex-vivo and in-vivo evaluation, *Int. J. Pharm.*, 527 (2017) 1-11.
- [153] E.A. Bseiso, M. Nasr, O.A. Sammour, N.A. Abd El Gawad, Novel nail penetration enhancer containing vesicles "nPEVs" for treatment of onychomycosis, *Drug Deliv.*, 23 (2016) 2813-2819.
- [154] M.S. Qurt, İ. Esentürk, S. Birteksöz Tan, M.S. Erdal, A. Araman, S. Güngör, Voriconazole and sertaconazole loaded colloidal nano-carriers for enhanced skin deposition and improved topical fungal treatment, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 48 (2018) 215-222.
- [155] S. Sahoo, N.R. Pani, S.K. Sahoo, Microemulsion based topical hydrogel of sertaconazole: formulation, characterization and evaluation, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 120 (2014) 193-199.
- [156] S. Sahoo, N.R. Pani, S.K. Sahoo, Effect of microemulsion in topical sertaconazole hydrogel: in vitro and in vivo study, *Drug Deliv.*, 23 (2016) 338-345.
- [157] R.D. Boehm, J. Daniels, S. Stafslie, A. Nasir, J. Lefebvre, R.J. Narayan, Polyglycolic acid microneedles modified with inkjet-deposited antifungal coatings, *Biointerphases*, 10 (2015) 011004.
- [158] R. Sachan, P. Jaipan, J.Y. Zhang, S. Degan, D. Erdmann, J. Tedesco, L. Vanderwal, S.J. Stafslie, I. Negut, A. Visan, G. Dorcioman, G. Socol, R. Cristescu, D.B. Chrisey, R.J. Narayan, Printing amphotericin B on microneedles using matrix assisted pulsed laser evaporation, *International Journal of Bioprinting*, 3 (2017).
- [159] R.D. Boehm, P.R. Miller, W.A. Schell, J.R. Perfect, R.J. Narayan, Inkjet Printing of Amphotericin B onto Biodegradable Microneedles Using Piezoelectric Inkjet Printing, *JOM*, 65 (2013) 525-533.
- [160] P. Zan, A. Than, P.K. Duong, J. Song, C. Xu, P. Chen, Antimicrobial Microneedle Patch for Treating Deep Cutaneous Fungal Infection, *Advanced Therapeutics*, 2 (2019) 1900064.
- [161] A.K. Jain, A. Jain, N.K. Garg, A. Agarwal, A. Jain, S.A. Jain, R.K. Tyagi, R.K. Jain, H. Agrawal, G.P. Agrawal, Adapalene loaded solid lipid nanoparticles gel: an effective approach for acne treatment, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 121 (2014) 222-229.
- [162] B. Shroot, S. Michel, Pharmacology and chemistry of adapalene, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 36 (1997) S96-S103.

- [163] A.L. Zaenglein, A.L. Pathy, B.J. Schlosser, A. Alikhan, H.E. Baldwin, D.S. Berson, W.P. Bowe, E.M. Graber, J.C. Harper, S. Kang, J.E. Keri, J.J. Leyden, R.V. Reynolds, N.B. Silverberg, L.F. Stein Gold, M.M. Tollefson, J.S. Weiss, N.C. Dolan, A.A. Sagan, M. Stern, K.M. Boyer, R. Bhushan, Guidelines of care for the management of acne vulgaris, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 74 (2016) 945-973 e933.
- [164] S. Piskin, E. Uzunali, A review of the use of adapalene for the treatment of acne vulgaris, *Ther. Clin. Risk Manag.*, 3 (2007) 621-624.
- [165] B. Dreno, S. Pecastaings, S. Corvec, S. Veraldi, A. Khammari, C. Roques, Cutibacterium acnes (*Propionibacterium acnes*) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 32 Suppl 2 (2018) 5-14.
- [166] V. Kumar, A.K. Banga, Intradermal and follicular delivery of adapalene liposomes, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 42 (2016) 871-879.
- [167] A. Nast, B. Dreno, V. Bettoli, Z. Bukvic Mokos, K. Degitz, C. Dressler, A.Y. Finlay, M. Haedersdal, J. Lambert, A. Layton, H.B. Lomholt, J.L. Lopez-Estebarez, F. Ochsendorf, C. Oprica, S. Rosumeck, T. Simonart, R.N. Werner, H. Gollnick, European evidence-based (S3) guideline for the treatment of acne - update 2016 - short version, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 30 (2016) 1261-1268.
- [168] L. Tolaymat, M.V. Pellegrini, Adapalene, StatPearls, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2018.
- [169] E. Bagatin, H.S. Goncalves, M. Sato, L.M.C. Almeida, H.A. Miot, Comparable efficacy of adapalene 0.3% gel and tretinoin 0.05% cream as treatment for cutaneous photoaging, *Eur. J. Dermatol.*, 28 (2018) 343-350.
- [170] S.G. Kandekar, S. Del Rio-Sancho, M. Lapteva, Y.N. Kalia, Selective delivery of adapalene to the human hair follicle under finite dose conditions using polymeric micelle nanocarriers, *Nanoscale*, 10 (2018) 1099-1110.
- [171] R. Najafi-Taher, B. Ghaemi, A. Amani, Delivery of adapalene using a novel topical gel based on tea tree oil nano-emulsion: Permeation, antibacterial and safety assessments, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 120 (2018) 142-151.
- [172] S. Jain, D.P. Kale, R. Swami, S.S. Katiyar, Codelivery of benzoyl peroxide & adapalene using modified liposomal gel for improved acne therapy, *Nanomedicine (Lond)*, 13 (2018) 1481-1493.
- [173] M.A. Sallam, M.T. Marin Bosca, Mechanistic Analysis of Human Skin Distribution and Follicular Targeting of Adapalene-Loaded Biodegradable Nanospheres With an Insight Into Hydrogel Matrix Influence, In Vitro Skin Irritation, and In Vivo Tolerability, *J. Pharm. Sci.*, 106 (2017) 3140-3149.
- [174] A. Jain, N.K. Garg, A. Jain, P. Kesharwani, A.K. Jain, P. Nirbhavane, R.K. Tyagi, A synergistic approach of adapalene-loaded nanostructured lipid carriers, and vitamin C co-administration for treating acne, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 42 (2016) 897-905.
- [175] A. Lauterbach, C.C. Mueller-Goymann, Development, formulation, and characterization of an adapalene-loaded solid lipid microparticle dispersion for follicular penetration, *Int. J. Pharm.*, 466 (2014) 122-132.

- [176] J.M. Nadal, G. Dos Anjos Camargo, A. Novatski, W.R. Macenhan, D.T. Dias, F.M. Barboza, A. Lyra, J.R. Roik, J. Padilha de Paula, A. Somer, P.V. Farago, Adapalene-loaded poly(epsilon-caprolactone) microparticles: Physicochemical characterization and in vitro penetration by photoacoustic spectroscopy, *PLoS One*, 14 (2019) e0213625.
- [177] M. Fanun, W.S. Al-Diyn, Electrical conductivity and self diffusion-NMR studies of the system: Water/sucrose laurate/ethoxylated mono-di-glyceride/isopropylmyristate, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects*, 277 (2006) 83-89.
- [178] M. Fanun, V. Papadimitriou, A. Xenakis, Characterization of cephalexin loaded nonionic microemulsions, *J. Colloid Interface Sci.*, 361 (2011) 115-121.
- [179] J.P. Klare, H.J. Steinhoff, Spin labeling EPR, *Photosynth. Res.*, 102 (2009) 377-390.
- [180] V. Papadimitriou, S. Pispas, S. Syriou, A. Pournara, M. Zoumpanioti, T.G. Sotiroidis, A. Xenakis, Biocompatible microemulsions based on limonene: formulation, structure, and applications, *Langmuir*, 24 (2008) 3380-3386.
- [181] P. Clarys, K. Alewaeters, R. Lambrecht, A.O. Barel, Skin color measurements: comparison between three instruments: the ChromameterR, the DermaSpectrometerR and the MexameterR, *Skin Res. Technol.*, 6 (2000) 230-238.
- [182] J. du Plessis, A. Stefaniak, F. Eloff, S. John, T. Agner, T.C. Chou, R. Nixon, M. Steiner, A. Franken, I. Kudla, L. Holness, International guidelines for the in vivo assessment of skin properties in non-clinical settings: Part 2. transepidermal water loss and skin hydration, *Skin Res. Technol.*, 19 (2013) 265-278.
- [183] USP37-NF32, United States Pharmacopoeia 37 - National Formulary 32, 2014. Chapter 1724: Semisolid drug products - performance tests, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD 20852, 2014.
- [184] A. Lauterbach, C.C. Müller-Goymann, Comparison of rheological properties, follicular penetration, drug release, and permeation behavior of a novel topical drug delivery system and a conventional cream, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 88 (2014) 614-624.
- [185] A. Teichmann, U. Jacobi, M. Ossadnik, H. Richter, S. Koch, W. Sterry, J. Lademann, Differential stripping: determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles, *J. Invest. Dermatol.*, 125 (2005) 264-269.
- [186] C. Herkenne, A. Naik, Y.N. Kalia, J. Hadgraft, R.H. Guy, Pig ear skin ex vivo as a model for in vivo dermatopharmacokinetic studies in man, *Pharm. Res.*, 23 (2006) 1850-1856.
- [187] K. Moronkeji, S. Todd, I. Dawidowska, S.D. Barrett, R. Akhtar, The role of subcutaneous tissue stiffness on microneedle performance in a representative in vitro model of skin, *J. Control. Release*, 265 (2017) 102-112.
- [188] S. Heuschkel, J. Wohlrab, R.H. Neubert, Dermal and transdermal targeting of dihydroavenanthramide D using enhancer molecules and novel microemulsions, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 72 (2009) 552-560.
- [189] A. Serajuddin, Enhanced microemulsion formation in lipid-based drug delivery systems by combining mono-esters of medium-chain fatty acids with di- or tri-esters, *J. Excip. Food Chem*, 3 (2012) 23-44.

- [190] H.N. Prajapati, D.M. Dalrymple, A.T. Serajuddin, A comparative evaluation of mono-, di- and triglyceride of medium chain fatty acids by lipid/surfactant/water phase diagram, solubility determination and dispersion testing for application in pharmaceutical dosage form development, *Pharm. Res.*, 29 (2012) 285-305.
- [191] A.T.M. Serajuddin, Enhanced microemulsion formation in lipid-based drug delivery systems by combining mono-esters of medium-chain fatty acids with di- or tri-esters, *Journal of Excipients and Food Chemicals*, (2012) 29-44% V 23.
- [192] L. Djekic, M. Primorac, The influence of cosurfactants and oils on the formation of pharmaceutical microemulsions based on PEG-8 caprylic/capric glycerides, *Int. J. Pharm.*, 352 (2008) 231-239.
- [193] E. Jurado, V. Bravo, J.M. Vicaria, A. Fernandez-Arteaga, A.I. Garcia-Lopez, Triolein solubilization using highly biodegradable non-ionic surfactants, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects*, 326 (2008) 162-168.
- [194] M. Fanun, Phase behavior, transport, diffusion and structural parameters of nonionic surfactants microemulsions, *J. Mol. Liq.*, 139 (2008) 14-22.
- [195] L. Djekic, M. Primorac, J. Jockovic, Phase behaviour, microstructure and ibuprofen solubilization capacity of pseudo-ternary nonionic microemulsions, *J. Mol. Liq.*, 160 (2011) 81-87.
- [196] N. Aggarwal, S. Goindi, R. Khurana, Formulation, characterization and evaluation of an optimized microemulsion formulation of griseofulvin for topical application, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 105 (2013) 158-166.
- [197] R.G. Alany, T. Rades, S. Agatonovic-Kustrin, N.M. Davies, I.G. Tucker, Effects of alcohols and diols on the phase behaviour of quaternary systems, *Int. J. Pharm.*, 196 (2000) 141-145.
- [198] K. Cerpnjak, A. Zvonar, M. Gasperlin, F. Vrecer, Lipid-based systems as a promising approach for enhancing the bioavailability of poorly water-soluble drugs, *Acta. Pharm.*, 63 (2013) 427-445.
- [199] G. Coneac, V. Vlaia, I. Olariu, A.M. Mut, D.F. Anghel, C. Ilie, C. Popoiu, D. Lupuleasa, L. Vlaia, Development and evaluation of new microemulsion-based hydrogel formulations for topical delivery of fluconazole, *AAPS PharmSciTech*, 16 (2015) 889-904.
- [200] M. Cohen-Avrahami, A.I. Shames, M.F. Ottaviani, A. Aserin, N. Garti, On the correlation between the structure of lyotropic carriers and the delivery profiles of two common NSAIDs, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 122 (2014) 231-240.
- [201] S.K. Mehta, K. Bala, Volumetric and transport properties in microemulsions and the point of view of percolation theory, *Physical Review E*, 51 (1995) 5732-5737.
- [202] R.G. Alany, I.G. Tucker, N.M. Davies, T. Rades, Characterizing colloidal structures of pseudoternary phase diagrams formed by oil/water/amphiphile systems, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 27 (2001) 31-38.
- [203] W. Naoui, M.A. Bolzinger, B. Fenet, J. Pelletier, J.P. Valour, R. Kalfat, Y. Chevalier, Microemulsion microstructure influences the skin delivery of an hydrophilic drug, *Pharm. Res.*, 28 (2011) 1683-1695.

- [204] L. Djordjevic, M. Primorac, M. Stupar, D. Krajisnik, Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug, *Int. J. Pharm.*, 271 (2004) 11-19.
- [205] M. Fanun, Properties of microemulsions based on mixed nonionic surfactants and mixed oils, *J. Mol. Liq.*, 150 (2009) 25-32.
- [206] M. Fanun, Formulation and characterization of microemulsions based on mixed nonionic surfactants and peppermint oil, *J. Colloid Interface Sci.*, 343 (2010) 496-503.
- [207] Z. Jeirani, B. Mohamed Jan, B. Si Ali, I. Mohd Noor, C.H. See, W. Saphanuchart, Prediction of water and oil percolation thresholds of a microemulsion by modeling of dynamic viscosity using response surface methodology, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 19 (2013) 554-560.
- [208] M. Fanun, Conductivity, viscosity, NMR and diclofenac solubilization capacity studies of mixed nonionic surfactants microemulsions, *J. Mol. Liq.*, 135 (2007) 5-13.
- [209] F. Podlogar, M. Gasperlin, M. Tomsic, A. Jamnik, M.B. Rogac, Structural characterisation of water-Tween 40/Imwitor 308-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods, *Int. J. Pharm.*, 276 (2004) 115-128.
- [210] M. Fanun, Properties of microemulsions with sugar surfactants and peppermint oil, *Colloid. Polym. Sci.*, 287 (2009) 899-910.
- [211] A. Zvonar, Rozman, B., Gasperlin, M., The Influence of Microstructure on Celecoxib Release from a Pharmaceutically Applicable System: Mygliol 812[®]/Labrasol[®]/Plurol Oleique[®]/Water Mixtures, *Acta Chim Slov*, 56 (2009) 131-138.
- [212] P. Szumala, Structure of Microemulsion Formulated with Monoacylglycerols in the Presence of Polyols and Ethanol, *J Surfactants Deterg*, 18 (2015) 97-106.
- [213] A. Yaghmur, A. Aserin, I. Tiunova, N. Garti, *J. Therm. Anal. Calorim.*, 69 (2002) 163-177.
- [214] M. Fanun, S. Makharza, M. Sowwan, UV-Visible and AFM Studies of Nonionic Microemulsions, *J. Dispersion Sci. Technol.*, 31 (2010) 501-511.
- [215] M.N. Todosijevic, M.M. Savic, B.B. Batinic, B.D. Markovic, M. Gasperlin, D.V. Randelovic, M.Z. Lukic, S.D. Savic, 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 (2015) 931-941.
- [216] H. Füredi-Milhofer, A. Kamishny, J. Yano, A. Aserin, N. Garti, Crystallization of Organic Compounds in Reversed Micelles. III. Solubilization of Aspartame, *Langmuir*, 19 (2003) 5984-5990.
- [217] J. Yano, H. Füredi-Milhofer, E. Wachtel, N. Garti, Crystallization of Organic Compounds in Reversed Micelles. I. Solubilization of Amino Acids in Water-Isooctane-AOT Microemulsions, *Langmuir*, 16 (2000) 9996-10004.
- [218] J. Yao, X.T. Gu, J.P. Zhou, Q.N. Ping, Y. Lu, Distribution behavior of lipophilic drugs in the oil-in-water microemulsions, *Yao Xue Xue Bao*, 42 (2007) 768-773.

- [219] E. Kupetz, H. Bunjes, Lipid nanoparticles: drug localization is substance-specific and achievable load depends on the size and physical state of the particles, *J. Control. Release*, 189 (2014) 54-64.
- [220] S.S. Rane, B.D. Anderson, What determines drug solubility in lipid vehicles: is it predictable?, *Adv Drug Deliv Rev*, 60 (2008) 638-656.
- [221] S. Savic, C. Weber, S. Tamburic, M. Savic, C. Muller-Goymann, Topical vehicles based on natural surfactant/fatty alcohols mixed emulsifier: The influence of two polyols on the colloidal structure and in vitro/in vivo skin performance, *J. Pharm. Sci.*, 98 (2009) 2073-2090.
- [222] M. Bergh, L.P. Shao, K. Magnusson, E. Gafvert, J.L. Nilsson, A.T. Karlberg, Atmospheric oxidation of poly(oxyethylene) alcohols. Identification of ethoxylated formates as oxidation products and study of their contact allergenic activity, *J. Pharm. Sci.*, 88 (1999) 483-488.
- [223] T. Isailovic, S. Djordjevic, B. Markovic, D. Randjelovic, N. Cekic, M. Lukic, I. Pantelic, R. Daniels, S. Savic, Biocompatible Nanoemulsions for Improved Aceclofenac Skin Delivery: Formulation Approach Using Combined Mixture-Process Experimental Design, *J. Pharm. Sci.*, 105 (2016) 308-323.
- [224] V.P. Shah, A. Yacobi, F.S. Radulescu, D.S. Miron, M.E. Lane, A science based approach to topical drug classification system (TCS), *Int. J. Pharm.*, 491 (2015) 21-25.
- [225] Draft Guideline on quality and equivalence of topical products, European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), London, UK; Oct 2018, 2018.
- [226] L. Djekic, M. Primorac, S. Filipic, D. Agbaba, Investigation of surfactant/cosurfactant synergism impact on ibuprofen solubilization capacity and drug release characteristics of nonionic microemulsions, *Int. J. Pharm.*, 433 (2012) 25-33.
- [227] T. Ilic, I. Pantelic, D. Lunter, S. Djordjevic, B. Markovic, D. Rankovic, R. Daniels, S. Savic, Critical quality attributes, in vitro release and correlated in vitro skin permeation-in vivo tape stripping collective data for demonstrating therapeutic (non)equivalence of topical semisolids: A case study of "ready-to-use" vehicles, *Int. J. Pharm.*, 528 (2017) 253-267.
- [228] M. Trotta, Influence of phase transformation on indomethacin release from microemulsions, *J. Control. Release*, 60 (1999) 399-405.
- [229] Guidance document for the conduct of skin absorption studies, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 28, 1–31, Paris, France, Nov; 2004.
- [230] S. Güngör, Bergisadi, N., Effect of penetration enhancers on in vitro percutaneous penetration of nimesulide through rat skin, *Pharmazie*, 59 (2004) 39-41.
- [231] L. Roussel, Rawad, A., Gilbert, E., Pirot, F. and Haftek, M., Influence of Excipients on Two Elements of the Stratum Corneum Barrier: Intercellular Lipids and Epidermal Tight Junctions, in: N. Dragicevic, Maibach, H.I (Ed.) *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*, Springer-Verlag GmbH, Berlin, 2015, pp. 69-90.
- [232] E. Escribano, A.C. Calpena, J. Queralt, R. Obach, J. Doménech, Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 19 (2003) 203-210.

- [233] N. Dragicevic, J. Predic Atkinson, H. Maibach, Chemical Penetration Enhancers: Classification and Mode of Action, in: M. N. Dragicevic, H.I (Ed.) Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement, Springer-Verlag GmbH, Berlin, 2015, pp. 11-27.
- [234] C.H. Liu, F.Y. Chang, D.K. Hung, Terpene microemulsions for transdermal curcumin delivery: effects of terpenes and cosurfactants, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 82 (2011) 63-70.
- [235] D.S. Mahrhauser, H. Kahlig, E. Partyka-Jankowska, H. Peterlik, L. Binder, K. Kwizda, C. Valenta, Investigation of microemulsion microstructure and its impact on skin delivery of flufenamic acid, *Int. J. Pharm.*, 490 (2015) 292-297.
- [236] S.G. Raney, T.J. Franz, P.A. Lehman, R. Lionberger, M.L. Chen, Pharmacokinetics-Based Approaches for Bioequivalence Evaluation of Topical Dermatological Drug Products, *Clin. Pharmacokinet.*, 54 (2015) 1095-1106.
- [237] W.M. Lau, K.W. Ng, Finite and Infinite Dosing, in: N. Dragicevic, Maibach, H.I (Ed.) Percutaneous Penetration Enhancers Drug Penetration Into/Through the Skin: Methodology and General Considerations, Springer-Verlag2017, pp. 35-44.
- [238] R.R. Thakur, I.A. Tekko, F. Al-Shammari, A.A. Ali, H. McCarthy, R.F. Donnelly, Rapidly dissolving polymeric microneedles for minimally invasive intraocular drug delivery, *Drug delivery and translational research*, 6 (2016) 800-815.
- [239] J.Y. Kim, M.R. Han, Y.H. Kim, S.W. Shin, S.Y. Nam, J.H. Park, Tip-loaded dissolving microneedles for transdermal delivery of donepezil hydrochloride for treatment of Alzheimer's disease, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 105 (2016) 148-155.
- [240] A.R.J. Hutton, H.L. Quinn, P.J. McCague, C. Jarrahan, A. Rein-Weston, P.S. Coffey, E. Gerth-Guyette, D. Zehrunge, E. Larraneta, R.F. Donnelly, Transdermal delivery of vitamin K using dissolving microneedles for the prevention of vitamin K deficiency bleeding, *Int. J. Pharm.*, 541 (2018) 56-63.
- [241] E. Larraneta, S. Stewart, S.J. Fallows, L.L. Birkhauer, M.T. McCrudden, A.D. Woolfson, R.F. Donnelly, A facile system to evaluate in vitro drug release from dissolving microneedle arrays, *Int. J. Pharm.*, 497 (2016) 62-69.
- [242] S.P. Davis, B.J. Landis, Z.H. Adams, M.G. Allen, M.R. Prausnitz, Insertion of microneedles into skin: measurement and prediction of insertion force and needle fracture force, *J. Biomech.*, 37 (2004) 1155-1163.
- [243] M.M. Badran, J. Kuntsche, A. Fahr, Skin penetration enhancement by a microneedle device (Dermaroller[®]) in vitro: Dependency on needle size and applied formulation, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 36 (2009) 511-523.
- [244] Q.Y. Li, J.N. Zhang, B.Z. Chen, Q.L. Wang, X.D. Guo, A solid polymer microneedle patch pretreatment enhances the permeation of drug molecules into the skin, *RSC Advances*, 7 (2017) 15408-15415.
- [245] A. Omolu, M. Bailly, R.M. Day, Assessment of solid microneedle rollers to enhance transmembrane delivery of doxycycline and inhibition of MMP activity, *Drug Deliv.*, 24 (2017) 942-951.

- [246] G. Widera, J. Johnson, L. Kim, L. Libiran, K. Nyam, P.E. Daddona, M. Cormier, Effect of delivery parameters on immunization to ovalbumin following intracutaneous administration by a coated microneedle array patch system, *Vaccine*, 24 (2006) 1653-1664.
- [247] D. Duan, C. Moeckly, J. Gysbers, C. Novak, G. Prochnow, K. Siebenaler, L. Albers, K. Hansen, Enhanced Delivery of Topically-Applied Formulations Following Skin Pre-Treatment with a Hand-Applied, Plastic Microneedle Array, *Curr. Drug Del.*, 8 (2011) 557-565.
- [248] W.S. Chiu, N.A. Belsey, N.L. Garrett, J. Moger, G.J. Price, M.B. Delgado-Charro, R.H. Guy, Drug delivery into microneedle-porated nails from nanoparticle reservoirs, *J. Control. Release*, 220 (2015) 98-106.

7. PRILOZI

7.1. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine sastavni deo doktorske disertacije

Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21):

1. **Bubic Pajic N**, Nikolic I, Mitsou E, Papadimitriou V, Xenakis A, Randjelovic D, Dobricic V, Smitran A, Cekic N, Calija B, Savic S. Biocompatible microemulsions for improved dermal delivery of sertaconazole nitrate: Phase behavior study and microstructure influence on drug biopharmaceutical properties, *J. Mol. Liq.* (2018); 272: 746-758.

Radovi objavljeni u istaknutim međunarodnim časopisima (M22):

Bubić Pajić N, Ilić T, Nikolić I, Dobričić V, Pantelić I, Savić, S. Alkyl polyglucoside-based adapalene-loaded microemulsions for targeted dermal delivery: Structure, stability and comparative biopharmaceutical characterization with a conventional dosage form. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2019;54: 101245.

Radovi objavljeni u međunarodnim časopisima (M23):

Dobričić V, **Bubić Pajić N**, Marković B, Vladimirov S, Savić S, Vuleta G. Development and validation of an LC-MS/MS method for the determination of adapalene in pharmaceutical forms for skin application, *J. Serb. Chem. Soc.* (2016); 81(10): 1171-1181.

Bubic Pajic N, Todosijevic M, Vuleta G, Cekic N, Dobricic V, Vucen S, Calija B, Lukic M, Ilic T, Savic S. Alkyl polyglucoside vs. ethoxylated surfactant-based microemulsions as vehicles for two poorly water-soluble drugs: physicochemical characterization and in vivo skin performance. *Acta Pharm.* (2017); 67(4): 415-439.

Radovi objavljeni u nacionalnim časopisima (M52):

Vučen S, **Bubić Pajić N**, Savić S, Vuleta G. Mikroigle – fizički pojačivači (trans)dermalne isporuke lijekova. *Arh. Farm.* (2014); 64(4): 295-321.

Radovi saopšteni na međunarodnim naučnim skupovima štampani u celini (M33):

Bubic Pajic N, Vuleta G, Todosijevic M, Cekic N, Savic S. Decyl glucoside-based microemulsions as potential carriers for dermal delivery of adapalene. 10th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Glasgow, UK, April 4-7, 2016, USB stick, P124.

Bubić Pajić N, Todosijević M, Cekić N, Vuleta G, Savić S. Biocompatible microemulsions: surfactant-dependent structure and solubility potential for two model drugs. 11th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, Belgrade, September 22-24, 2016, Book of abstracts, PP11, 99-100.

Bubic Pajic N, Nikolic I, Dobricic V, Randjelovic D, Savic S. Sertaconazole nitrate loaded biocompatible microemulsions – influence of formulation composition/structure on in vitro drug release. 11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Granada, Spain, March 19-22, 2018, USB stick, P132.

Radovi saopšteni na međunarodnim naučnim skupovima štampani u izvodu (M34):

Bubić Pajić N, Dobričić V, Cekić N, Vuleta G, Savić S. Formulacija mikroemulzija stabilizovanih alkil poliglukozidima kao nosača za adapalen. 3rd Congress of Pharmacists of Bosnia and Herzegovina with International participation, Sarajevo, May 14-17, 2015, Pharmacia 18(1): 152.

Bubić Pajić N, Cekić N, Vuleta G, Savić S. Biodegradabilne mikroemulzije kao nosači za dermalnu isporuku antifungalnog lijeka. 2nd Congress of Pharmacists of Montenegro with International participation, Bečići, May 28-31, 2015, Book of abstracts, pp. 96-97.

Dobričić V, **Bubić Pajić N**, Marković B, Vladimirov S, Savić S, Vuleta G. Development and validation of LC-MS/MS method for the determination of adapalene in drug formulations for skin application. 21st International Symposium on Separation Sciences, Ljubljana, Slovenia, June 30-July 3, 2015, P25.

Bubic Pajic N, Nikolic I, Dobricic V, Vuleta G, Savic S. In vitro release of sertaconazole nitrate from topical formulations – comparison of two proposed methods. 1st Croatian Congress on Dermatopharmacy with International Participation, Zagreb, Croatia, 23-24 March, 2018, Book of abstracts, 60-61.

Bubić Pajić N, Nikolić I, Dobričić V, Savić S. Adapalene loaded alkyl polyglucoside based topical microemulsions – *in vitro* drug release. 12th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, Szeged, Hungary, September 19-22, 2018, Book of abstracts, 160-161.

Bubić Pajić N, Nikolić I, Dobričić V, Savić S. Biopharmaceutical properties of adapalene loaded biocompatible microemulsions. 3rd European Conference on Pharmaceutics, Bologna, Italy, March 25-26, 2019, Book of abstracts, P170.

Bubic Pajic N, Vucen S, Savic S. Dissolvable microneedles – physical enhancers for dermal delivery of an antifungal drug. VII Serbian Congress of Pharmacy with international participation, Belgrade, October 10-14, 2018 Arh. Farm, (2018); 68(3): 634-635.

Bubić Pajić N, Ilić T, Nikolić I, Vučen S, Dobričić V, Savić S. Combined application of silicon microneedles and biocompatible microemulsions for improved dermal delivery of sertaconazole nitrate. 3rd Congress of Pharmacists of Montenegro with International participation, Bečići, May 9-12, 2019, Book of abstracts, 118-119.

8. BIOGRAFIJA

8.1. Biografija autora

Nataša Bubić Pajić rođena je 20.03.1984. u Banjoj Luci. Osnovnu školu i Gimnaziju završila je u Banjoj Luci, a studije farmacije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci upisala 2003. godine. Tokom studiranja više puta je nagrađivana od strane Medicinskog fakulteta za postignute rezultate. Dobitnik je „Zlatne plakete“ Univerziteta u Banjoj Luci. Bila je stipendista Ministarstva prosvjete i kulture Republike Srpske i „Fonda dr Milan Jelić“. Diplomirala je 2009. godine sa prosečnom ocenom 9,60.

Pripravnički staž obavila je u okviru ZU „Moja apoteka“ i u bolničkoj apoteci Univerzitetskog kliničkog centra Republike Srpske, nakon čega je položila stručni ispit i stekla licencu za obavljanje delatnosti magistra farmacije. Od 2010. godine zaposlena je u zvanju asistenta na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Medicinskog fakulteta u Banjoj Luci, a od 2015. godine u zvanju višeg asistenta, gde učestvuje u izvođenju teorijske nastave i laboratorijskih vežbi, kao i u naučno-istraživačkom radu sa studentima. 2010. godine upisala je doktorske akademske studije – modul farmaceutska tehnologija na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu.

Govori engleski jezik (*Cambridge Certificate: First Certificate in English – FCE*).

Udata je i majka dvoje dece.

Autor je jednog rada objavljenog u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), jednog rada objavljenog u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), dva rada objavljena u međunarodnom časopisu (M23), tri rada objavljena u istaknutom nacionalnom časopisu (M52), dva rada u nacionalnom časopisu prve kategorije u Republici Srpskoj, pet saopštenja na međunarodnim skupovima štampanih u celini (M33) i sedamnaest saopštenja na međunarodnim skupovima štampanih u izvodu (M34).

9. IZJAVE

9.1. Izjava o autorstvu

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Наташа Бубић Пајић

Број индекса 1/10

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Хемијски и физички појачивачи дермалне испоруке слабо растворљивих лековитих супстанци: упоредна испитивања микроемулзија, чврстих и растворљивих микроигала“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 17.03.2020.

Потпис аутора



9.2. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Наташа Бубић Пајић
Број индекса 1/10
Студијски програм Фармацеутска технологија
Наслов рада **„Хемијски и физички појачивачи дермалне испоруке слабо растворљивих лековитих супстанци: упоредна испитивања микроемулзија, чврстих и растворљивих микрогала“**
Ментор проф. др Снежана Савић
 др сц. Соња Вучен

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 17.03.2020.

Потпис аутора



9.3. Izjava o korišćenju

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Хемијски и физички појачивачи дермалне испоруке слабо растворљивих лековитих супстанци: упоредна испитивања микроемулзија, чврстих и растворљивих микроигола“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном притупу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 17.03.2020.

Потпис аутора



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.