

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Vedrana I. Savić

**DERMALNA ISPORUKA TAKROLIMUSA -
UPOREDNA FORMULACIONA I PREKLINIČKA
ISTRAŽIVANJA MIKROEMULZIJA,
NANOEMULZIJA I NANOSTRUKTURIRANIH
LIPIDNIH ČESTICA KAO NAPREDNIH
NOSAČA ZA SLABO RASTVORNE LEKOVITE
SUPSTANCE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Vedrana I. Savić

**DERMALNA ISPORUKA TAKROLIMUSA -
UPOREDNA FORMULACIONA I PREKLINIČKA
ISTRAŽIVANJA MIKROEMULZIJA,
NANOEMULZIJA I NANOSTRUKTURIRANIH
LIPIDNIH ČESTICA KAO NAPREDNIH
NOSAČA ZA SLABO RASTVORNE LEKOVITE
SUPSTANCE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Vedrana I. Savić

**DERMAL DELIVERY OF TACROLIMUS -
COMPARATIVE FORMULATION AND
PRECLINICAL EVALUATION OF
MICROEMULSIONS, NANOEMULSIONS AND
NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS AS
NOVEL CARRIERS FOR POORLY WATER-
SOLUBLE DRUGS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

Mentor

Dr Snežana Savić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Članovi komisije

Dr Ivana Pantelić, docent,

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Nebojša Cekić, vanredni profesor,

Univerzitet u Nišu – Tehnološki fakultet u Leskovcu

Datum odbrane _____

Ova doktorska disertacija je rezultat naučno-istraživačkog rada na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, pri Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Njegovu realizaciju pomogli su u najširem smislu brojni saradnici i institucije kojima dugujem zahvalnost, a ovde bih se naročito zahvalila pojedincima koji su dali ključni doprinos i bez čije pomoći ovaj poduhvat ne bi bio moguć.

Najiskrenije se zahvaljujem svojoj mentorki, prof. dr Snežani Savić, na svom vremenu koje je posvetila meni, i na svakom savetu, podršci i kritici. Draga profesorka, kako je moj život krenuo drugom putanjom, glavni razlog i pokretač za privođenje doktorata kraju je bila želja da ne izneverim Vas i Vaše poverenje. Životne lekcije koje ste nam pružali biće jedna od najvrednijih i najznačajnijih stvari iz celog ovog višegodišnjeg poduhvata. Beskrajno Vam hvala na tome!

Veliku zahvalnost dugujem i svim koleginicama i kolegama sa fakulteta na koje sam uvek mogla da se oslonim i koji su neizmerni broj puta bili tu da mi pomognu. Posebno bih istakla zahvalnost Mariji Todosijević, Tanji Ilić, Ines Nikolić i Saneli Savić, koje su me podržale da probijem led, nesebično prenosile svoje znanje, pomagale oko eksperimenata, kako psihički tako i fizički, aktivno učestvovala u tumačenju rezultata, kao i predlagale rešenja za sve neočekivane probleme koji su se pojavljivali. Hvala vam od srca!

Hvala svim prijateljima koji su me tolerisali kad sam kasnila zato što mi je trebalo "još pet minuta da završim eksperiment" ili kad nisam mogla da se vidim sa njima jer sam morala da sređujem rezultate/pišem radove. Hvala na razumevanju i strpljenju, hvala na podršci. A sad očekujem da nadoknadimo sve što sam propustila!

Ogromnu zahvalnost dugujem mojoj porodici, roditeljima i sestri, koji su me podržavali kroz sve ove godine i ohrabivali u nastojanju da istrajem uprkos svim poteškoćama i izazovima. Puno puta je delovalo crno da crnje ne može biti, ali ste vi bili tu da me utešite i date snagu da nastavim dalje (ili da me sprečite da ishitreno odustanem od svega u trenucima očaja). Volim vas bezgranično.

Na kraju, neizmerno sam zahvalna "onom mom", svom najboljem drugu, životnom sapatniku i sapatniku, koji je bio i ostao uz mene kroz sve ovo, a i nadalje. Iako si mi potpuno promenio planove i neizmerno zakomplikovao ovaj poduhvat time što si me odvuкао u emigraciju, višestruko si se iskupio tokom godina. Ti i naše novo sunce ovom životu dajete smisao.

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

SAŽETAK

Takrolimus je snažan imunosupresiv koji se koristi topikalno u tretmanu atopijskog dermatitisa. Danas je na tržištu registrovan samo jedan farmaceutski oblik sa takrolimusom za primenu na koži - mast. Zbog nepoželjnih karakteristika masti (masna tekstura, teško razmazivanje, sporo upijanje, teško spiranje) i težnje da se poboljša njegova isporuka u kožu, sve je veća potreba za razvojem novih, naprednih nosača sa takrolimusom, kao što su mikroemulzije, nanoemulzije i lipidne nanočestice.

Usled njihove kompleksnosti, razvoj ovih nosača je dugotrajan i neizvestan proces. Stoga je cilj ove doktorske disertacije bio formulisanje mikroemulzija, nanoemulzija i nanostrukturiranih lipidnih čestica stabilizovanih lecitinom, kao nosača za dermalnu isporuku takrolimusa. Perspektivni nosači su podvrgnuti sveobuhvatnoj fizičko-hemijskoj karakterizaciji i studiji stabilnosti, a dermalna isporuka takrolimusa upoređena je sa referentnom mašću.

Formulaciona istraživanja omogućila su skupljanje znanja o kritičnim formulacionim i procesnim parametarima za dobijanje stabilnih nosača sa takrolimusom. U dvočasovnoj *in vitro* studiji penetracije takrolimusa u kožu uha svinje korišćenjem metode sa trakama, uočeno je da su razvijeni nosači superiorniji u poređenju sa referentnom mašću i omogućavaju bolju isporuku takrolimusa u *stratum corneum*. Takrolimus je u značajnoj meri penetrirao u folikule dlaka, što dodatno može da osigura bolju dermalnu isporuku. Ipak, rezultati 24-časovne *in vitro* studije permeacije kroz kožu uha svinje pune debljine korišćenjem Franz-ovih difuzionih ćelija ukazuju na bolju permeaciju takrolimusa iz mikroemulzije i referentne masti u poređenju sa nanostrukturiranim lipidnim česticama i nanoemulzijom, što može ukazivati i na mogućnost ispoljavanja sistemskih neželjenih efekata.

Generalno, rezultati ukazuju na veliki potencijal dobijenih nosača za dermalnu isporuku takrolimusa, što bi trebalo potvrditi odgovarajućim kliničkim eksperimentalnim postavkama.

Ključne reči: mikroemulzije, nanoemulzije, nanostrukturirane lipidne čestice, takrolimus, dermalna isporuka lekova

Naučna oblas: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska tehnologija

Dermal delivery of tacrolimus - comparative formulation and preclinical evaluation of microemulsions, nanoemulsions and nanostructured lipid carriers as novel carriers for poorly water-soluble drugs

ABSTRACT

Tacrolimus is a potent immunosuppressive macrolide which is topically used for treatment of atopic dermatitis. Today, there is only one pharmaceutical form for topical application of tacrolimus - tacrolimus ointment. Due to the undesirable characteristics of ointments (greasy texture, difficulty of applying and spreading onto the skin, difficulty to wash them off) and desirable enhancement in dermal delivery, there is an emerging need for development of novel carriers for tacrolimus, such as microemulsions, nanoemulsions and lipid nanoparticles.

Owing to their complexity, the development of these carriers can be a long-lasting and uncertain process. Therefore, the aim of this doctoral thesis was to formulate lecithin based microemulsions, nanoemulsions and nanostructured lipid carriers as novel carriers for dermal delivery of tacrolimus. The physicochemical characteristics and stability of promising carriers was assessed, and dermal delivery of tacrolimus was compared to the referent ointment.

The formulation evaluation acquired important knowledge about the critical parameters for obtaining stable carriers with tacrolimus. Results of *in vitro* penetration of tacrolimus in porcine ear skin suggested superiority of the developed carriers compared to the referent ointment. Additionally, the delivery of tacrolimus into the hair follicles was increased as well, which could provide better dermal delivery of tacrolimus. On the other hand, the results of 24-hour *in vitro* permeation study using Franz diffusion cells and full thickness porcine ear skin indicated better permeation of tacrolimus from the microemulsion and the referent ointment compared to the nanostructured lipid carrier and the nanoemulsion, which can also suggest a risk of systemic adverse effects by their usage.

Overall, the developed carriers could be suggested as promising carriers for dermal delivery of tacrolimus, which should be confirmed by appropriate clinical evaluation.

Key words: microemulsions, nanoemulsions, nanostructured lipid carriers, tacrolimus, dermal drug delivery

Scientific field: Pharmacy

Scientific subfield: Pharmaceutical technology

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	Takrolimus kao model slabo rastvorne lekovite supstance	1
1.1.1	Otkriće takrolimusa	1
1.1.2	Fizičko-hemijske osobine	1
1.1.3	Mehanizam dejstva takrolimusa	2
1.1.4	Primena takrolimusa	3
1.1.5	Farmakokinetika takrolimusa	4
1.1.6	Izazovi u razvoju novih formulacija za dermalnu isporuku takrolimusa	5
1.2	Tehnike za prevazilaženje slabe rastvorljivosti lekovitih supstanci	6
1.3	Koža kao barijera za isporuku lekovitih supstanci	8
1.3.1	Struktura kože	8
1.3.2	Putevi isporuke lekovitih supstanci u/kroz kožu	10
1.4	Strategije za poboljšanje dermalne isporuke lekova	11
1.5	Koloidne disperzije	15
1.5.1	Mikroemulzije	15
1.5.2	Nanoemulzije	17
1.5.3	Lipidne nanočestice	19
1.5.3.1	Čvrste lipidne nanočestice	19
1.5.3.2	Nanostrukturirane lipidne čestice	20
1.6	Primena mikroemulzija za dermalnu isporuku lekova	21
1.7	Primena nanoemulzija za dermalnu isporuku lekova	22
1.8	Primena lipidnih nanočestica za dermalnu isporuku lekova	23
2	CILJ ISTRAŽIVANJA	25
3	EKSPERIMENTALNI DEO	27
3.1	Materijali	27
3.2	Metode	27
3.2.1	Ispitivanje rastvorljivosti takrolimusa	28
3.2.2	Konstruisanje pseudoternarnih faznih dijagrama	28
3.2.3	Određivanje tipa mikroemulzija	29
3.2.3.1	Studije provodljivosti mikroemulzionih sistema tokom razblaživanja	29
3.2.3.2	Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) tokom hlađenja mikroemulzionih formulacija	29
3.2.4	Priprema mikroemulzija	30
3.2.5	Razvoj i priprema nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzija	30
3.2.5.1	Odabir masne faze primenom DSC analize	30
3.2.5.2	Priprema nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzija	30
3.2.5.3	Variranje formulacionih i procesnih parametara u izradi nanostrukturiranih lipidnih čestica	31

3.2.6	Fizičko-hemijska karakterizacija nosača.....	31
3.2.6.1	Analiza veličine kapi/čestica i indeks polidisperziteta	31
3.2.6.2	Merenje zeta potencijala	32
3.2.6.3	Merenje pH i provodljivosti formulacija	32
3.2.6.4	Reološka analiza	32
3.2.6.5	Efikasnost inkorporacije takrolimusa	33
3.2.6.6	Polarizaciona mikroskopija	33
3.2.6.7	Procena fizičkog stanja takrolimusa primenom DSC analize uz zagrevanje	33
3.2.6.8	Elektronska paramagnetna rezonantna spektroskopija (EPR).....	34
3.2.6.9	Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR).....	36
3.2.7	Ispitivanje stabilnosti formulacija.....	36
3.2.8	Procena bezbednosnog profila / iritacionog potencijala placebo mikroemulzionih formulacija primenom <i>in vivo</i> biofizičkih merenja kritičnih parametara stanja kože.....	37
3.2.9	<i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja takrolimusa iz formulacija korišćenjem Franz-ovih difuzionih ćelija.....	37
3.2.10	<i>In vitro</i> ispitivanje dermalne raspoloživosti / penetracije takrolimusa iz mikroemulzija u kožu uha svinje primenom metode sa trakama (engl. <i>tape stripping</i>)	38
3.2.11	<i>In vitro</i> ispitivanje dermalne raspoloživosti / penetracije takrolimusa iz nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzije u kožu uha svinje primenom diferencijalnog stripinga ³⁹	
3.2.12	<i>In vitro</i> procena permeacije takrolimusa kroz kožu uha svinje pune debljine korišćenjem Franz-ovih difuzionih ćelija	39
3.2.13	Kvantitativno određivanje takrolimusa.....	40
3.2.14	Obrada rezultata	41
4	REZULTATI I DISKUSIJA	42
4.1	Rezultati i diskusija prve faze ispitivanja.....	42
4.1.1	Ispitivanje rastvorljivosti takrolimusa.....	42
4.1.2	Konstruisanje pseudoternarnih faznih dijagrama.....	45
4.1.2.1	Ispitivanje uticaja kosurfaktanata	46
4.1.2.2	Ispitivanje uticaja masne faze	49
4.1.2.3	Kombinovani efekat uticaja kosurfaktanta i masne faze	49
4.1.3	Određivanje tipa mikroemulzija.....	50
4.1.3.1	Praćenje provodljivosti tokom razblaživanja sistema surfaktant-kosurfaktant/ulje 51	
4.1.3.2	DSC analiza mikroemulzionih formulacija tokom hlađenja	53
4.2	Rezultati i diskusija druge faze ispitivanja.....	57
4.2.1	Razvoj nanostrukturiranih lipidnih čestica - preliminarni odabir smeše čvrstog i tečnog lipida.....	57
4.2.2	Odabir formulacija nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzije.....	59
4.3	Rezultati i diskusija treće faze ispitivanja.....	61
4.3.1	Fizičko-hemijska karakterizacija i stabilnost mikroemulzija.....	61

4.3.1.1	Veličina kapi i indeks polidisperziteta.....	61
4.3.1.2	pH i provodljivost mikroemulzija.....	62
4.3.1.3	Reološke karakteristike mikroemulzija	63
4.3.1.4	Ispitivanje prisustva kristala takrolimusa u mikroemulzijama	65
4.3.1.5	EPR analiza mikroemulzionih formulacija.....	66
4.3.1.6	FTIR: ispitivanje interakcije takrolimusa sa mikroemulzijama.....	68
4.3.1.7	Stabilnost mikroemulzionih formulacija	69
4.3.1.8	Stabilnost takrolimusa u mikroemulzionim formulacijama	70
4.3.2	Fizičko-hemijska karakterizacija i stabilnost nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzija	72
4.3.2.1	Veličina čestica i indeks polidisperziteta.....	72
4.3.2.2	Određivanje zeta potencijala.....	77
4.3.2.3	Merenje pH i provodljivosti.....	77
4.3.2.4	Reološka merenja i zapažanja.....	77
4.3.2.5	Stabilnost nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzija.....	81
4.3.2.6	Selekcija ključnih parametara formulacije	83
4.3.2.7	Inkorporacija takrolimusa u nanostrukturirane lipidne čestice i nanoemulzije	83
4.4	Rezultati i diskusija četvrte faze ispitivanja	85
4.4.1	Procena bezbednosnog profila/iritacionog potencijala placebo mikroemulzionih formulacija primenom <i>in vivo</i> biofizičkih merenja kritičnih parametara stanja kože.....	85
4.5	Rezultati i diskusija pete faze ispitivanja	87
4.5.1	<i>In vitro</i> ispitivanje brzine oslobađanje takrolimusa iz formulacija korišćenjem Franz-ovih difuzionih ćelija	87
4.5.2	<i>In vitro</i> ispitivanje dermalne raspoloživosti / penetracije takrolimusa iz mikroemulzija u kožu uha svinje primenom metode sa trakama (engl. <i>tape stripping</i>)	89
4.5.3	<i>In vitro</i> procena penetracije takrolimusa iz nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzija primenom tehnike diferencijalnog stripinga.....	92
4.5.4	<i>In vitro</i> ispitivanje permeacije takrolimusa kroz kožu uha svinje pune debljine korišćenjem Franz-ovih difuzionih ćelija	95
5	ZAKLJUČAK	100
6	LITERATURA.....	104
7	PRILOZI	116
7.1	Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije	116
7.2	Biografija autora.....	118
7.3	Izjava o autorstvu	119
7.4	Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije dokorskog rada	120
7.5	Izjava o korišćenju.....	121

1 UVOD

1.1 Takrolimus kao model slabo rastvorne lekovite supstance

1.1.1 Otkriće takrolimusa

Tokom druge polovine XX veka sprovedena su brojna istraživanja u cilju otkrivanja novih imunosupresivnih supstanci prirodnog porekla. 1971. godine otkriven je ciklosporin, imunosupresiv poreklom iz gljivice *Tolypocladium inflatum* koji je odobren za humanu upotrebu 1983. godine od strane Američke agencije za hranu i lekove (eng. *Food and Drug Administration*, FDA). Par godina kasnije, 1987. godine je grupa istraživača u Japanu objavila da produkt bakterije *Streptomyces tsukubaensis*, obeležen kao FK-506, ispoljava mnogo potentniji *in vitro* i *in vivo* imunosupresivni efekat od ciklosporina (Kino i sar., 1987). Kako je pokazano da ova supstanca poseduje makrolidnu strukturu, njen naziv je promenjen u takrolimus (**Tsukuba makrolidni imunosupresiv**). 1994. godine je FDA odobrila primenu takrolimusa u cilju sprečavanja odbacivanja transplantata jetre, dok je par godina kasnije indikacijsko područje prošireno i na druge organe.

1.1.2 Fizičko-hemijske osobine

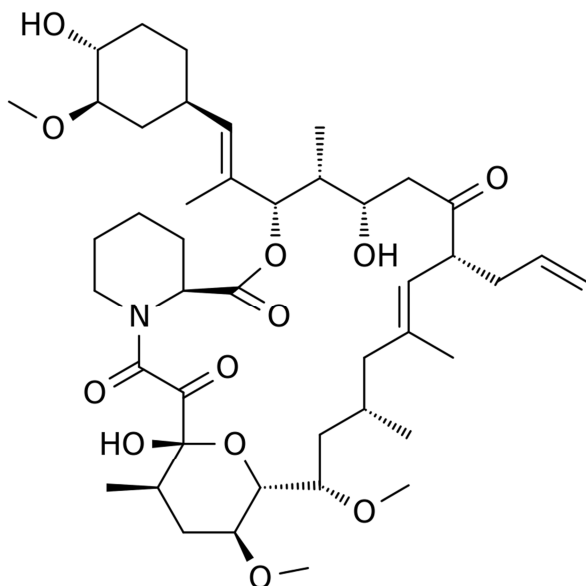
Takrolimus je kristalni prašak bele boje, rastvoran u organskim rastvaračima kao što su metanol, etanol, dimetilsulfoksid (DMSO) i dimetilformamid (DMF). Vrlo je slabo rastvorljiv u vodi (4 - 12 µg/mL, (Patel i sar., 2012)). Hemijski, takrolimus pripada grupi makrocikličnih laktona - makrolida, molarne mase 804,02 g/mol, čiji se makrolidni prsten sastoji od 23 člana (Slika 1-1). Prva monografija takrolimus monohidrata objavljena je tek 2018. godine u trećem suplementu devetog izdanja Evropske farmakopeje. Danas je na snazi deseto izdanje Evropske farmakopeje (2020), u kome je ova supstanca definisana kao:

(3S,4R,5S,8R,9E,12S,14S,15R,16S,18R,19R,26aS)-5,19-dihidroksi-3-[(1E)-1-[(1R,3R,4R)-4-hidroksi-3-metoksicikloheksil]prop-1-en-2-il]-14,16-dimetoksi-4,10,12,18-tetrametil-8-(prop-2-en-1-il)-3,4,5,6,8,11,12,13,14,15,16,17,18,19,24,25,26,26a-oktadekahidro-7H-15,19-epokspirido[2,1-c] [1,4]oksaazaciklotrikozin-1,7,20,21(23H)-tetron monohidrat

Dalje, u monografiji se navodi da je to beli ili skoro beli kristalni prašak, praktično nerastvorljiv u vodi, rastvorljiv u etanolu (96 %), praktično nerastvorljiv u heptanu. Sadrži između 97,0 % i 102,0 % ukupnog takrolimusa, takrolimus jedinjenja I i takrolimus jedinjenja II (anhidrovana supstanca).

Takrolimus je hemijski nestabilan, pogotovu u sredinama sa pH vrednošću višom od 7, pri čemu dolazi do formiranja raznih degradacionih proizvoda. Neki od identifikovanih degradacionih proizvoda takrolimusa su takrolimus dien, takrolimus-regioizomer A, 8-epitakrolimus, 4-epitakrolimus dien, takrolimus-alfahidroksilna kiselina (Peterka i sar., 2019; Skak i Hansen, 2016).

Njegova slaba rastvorljivost u vodi, velika molekulska masa i hemijska nestabilnost ključne su karakteristike koje otežavaju razvoj novih, stabilnih formulacija sa takrolimusom koje sadrže veliki udeo vode.



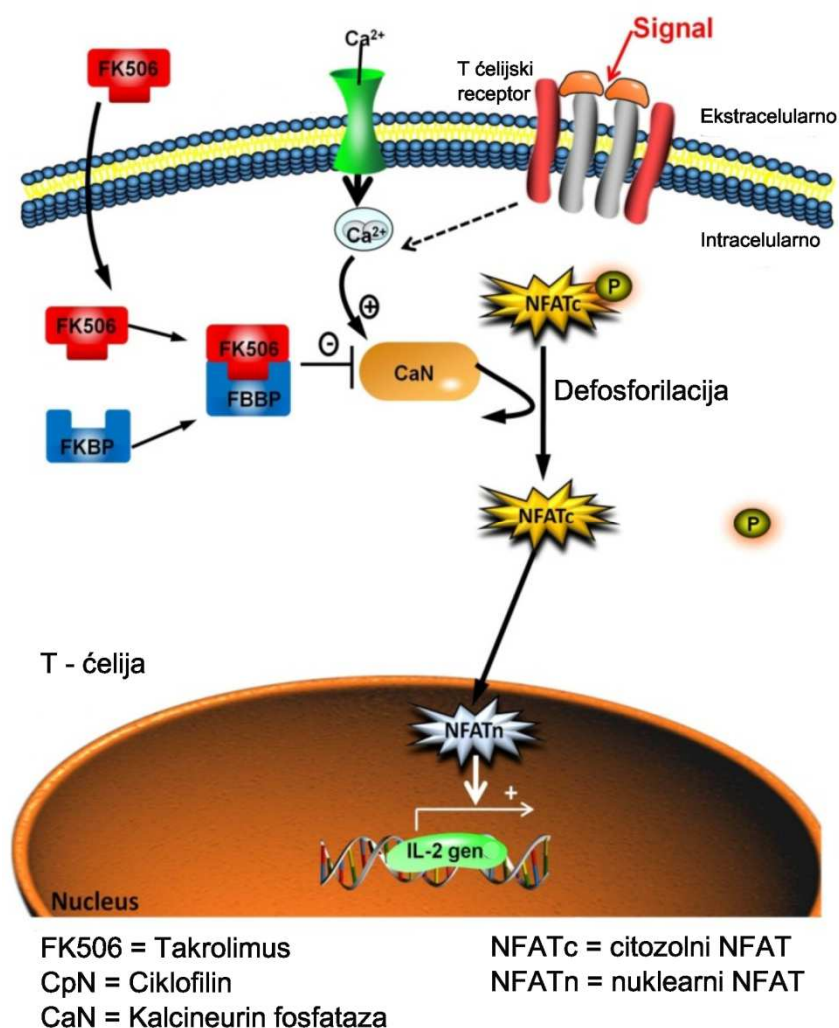
Slika 1-1 Strukturna formula takrolimusa.

1.1.3 Mehanizam dejstva takrolimusa

Takrolimus pripada grupi imunosupresiva koji inhibiraju nastajanje i efekat interleukina 2, važnog signalnog molekula u aktivaciji imunog odgovora. Normalno, usled interakcije antigena sa T-ćelijskim receptorom dolazi do povećanja intracelularne koncentracije kalcijumovih jona (Slika 1-2). Povećana koncentracija kalcijumovih jona dovodi do aktivacije kalmodulina - proteina odgovornog za signalnu transdukciju posredovanu kalcijumom. Aktivirani kalmodulin se vezuje za kalcineurin, kalcijum i kalmodulin zavisnu serin/treonin fosfatazu koja potom defosforiliše brojne transkripcione faktore iz NFAT (nuklearni faktor aktiviranih T-ćelija) familije, čime se oni aktiviraju. Aktivirani transkripcioni faktori migriraju u jedro ćelije i otpočinju transkripciju gena za interleukin 2 i njegovu sintezu (Dale i sar., 2007).

Takrolimus gradi kompleks sa FK-506 vezujućim proteinom 12 (engl. *FK-binding protein 12*, FKBP12). Ovaj kompleks se vezuje za kalcineurin i sprečava njegovu aktivaciju, što za posledicu ima odsustvo sinteze interleukina 2 i generalno suprimiranje imunog odgovora. Naime, inhibirana sinteza interleukina 2 i smanjena ekspresija receptora za interleukin 2 dovodi do smanjene proliferacije T-ćelija. Takođe je uočena smanjena indukcija i klonalna proliferacija citotoksičnih T-ćelija iz CD8+ prekursorskih T-ćelija, smanjena funkcija efektorskih T-ćelija koje su odgovorne za imuni odgovor posredovan ćelijama (engl. *cell-mediated response*), smanjeni B-ćelijski odgovor zavistan od T-ćelija (Dale i sar., 2007). Iako je dominantno smanjena proizvodnja interleukina 2, uočeno je da takrolimus dovodi i do smanjene sinteze interferona gama, i interleukina 3 i drugih citokina.

Mehanizam dejstva takrolimusa nakon topikalne aplikacije u cilju lečenja atopijskog dermatitisa nije u potpunosti razjašnjen. Inhibicijom kalcineurina takrolimus dovodi do smanjene sinteze interleukina 2, interleukina 3, interleukina 4, interleukina 5 i drugih citokina kao što su faktori stimulacije kolonija granulocita-makrofaga (GM-CSF), faktor nekroze tumora α (TNF- α) i interferona γ (IFN- γ), za koje se smatra da imaju značajnu ulogu u patogenezi atopijskog dermatitisa. Dodatno, nakon primene takrolimusa primećena je smanjena ekspresija Fc receptora na Langerhansovim ćelijama u koži, smanjeno oslobađanje proinflamatornih medijatora iz mastocita (kao što su histamin, serin proteaze, lizozomalni enzimi, citokini, itd.), kao i smanjena ekspresija receptora za interleukin 8 (Fleischer, 1999; Pascual i Fleisher, 2004).



Slika 1-2 Mehanizam dejstva takrolimusa, prilagođeno na osnovu reference Cassidy i sar., 2016.

1.1.4 Primena takrolimusa

Indikacije za sistemsku primenu takrolimusa su transplantacija organa, prevencija i terapija epizoda odbacivanja transplantata bubrega i jetre. Iako je efikasan i esencijalan u transplantaciji organa, registrovana su i brojna neželjena dejstva nakon sistemske primene, kao što su nefrotoksičnost i neurotoksičnost, hepatotoksičnost, hipertenzija, hiperglikemija, hiperlipidemija, trombocitopenija, letargija, hirzutizam, tremor, parestezija, hipertrofija desni, gastrointestinalne tegobe. Takođe je povećani rizik od pojave sekundarnih tumora i oportunističkih infekcija (Dale i sar., 2007).

Prvi registrovani proizvod za topikalnu primenu takrolimusa je Protopic® mast (0,03% i 0,1%) proizvođača Astellas Pharma. Danas su na svetskom tržištu prisutni različiti generički proizvodi, proizvedeni po ugledu na Protopic® mast, u kojoj je takrolimus rastvoren u kapljicama propilenkarbonata, koje su uniformno dispergovane u podlozi zasnovanoj na smeši vazelina, čvrstog i tečnog parafina i pčelinjeg voska (Yoshida i sar., 2004). Iako primena masti dovodi do hidratacije kože koja je poželjna u tretmanu različitih kožnih oboljenja, pokazano je da komplijansa pacijenata može biti značajno smanjena zbog neželjenih karakteristika ovakvog farmaceutskog oblika, kao što su masna tekstura, teško razmazivanje po koži (pogotovu u kosmatim regionima), sporo upijanje i teško spiranje/uklanjanje sa kože (Tan i sar., 2012). Drugi farmaceutski oblici za topikalnu primenu takrolimusa, kao što su krem, gel ili tečni preparati za primenu na koži, i dalje nisu dostupni na svetskom tržištu.

Indikacija za korišćenje takrolimus masti je tretman umerenog do teškog atopijskog dermatitisa kod odraslih koji nisu adekvatno odgovorili na konvencionalnu terapiju ili nisu podnosili konvencionalnu terapiju lekovima kao što su kortikosteroidi (Sažetak karakteristika o leku - Protopic[®] mast, 2012). Osim u akutnim stanjima, takrolimus mast može da se koristi i u terapiji održavanja, kako bi se sprečilo pogoršanje zapaljenja kože.

Kortikosteroidi generalno predstavljaju prvu liniju u lečenju atopijskog dermatitisa. Međutim, čak i njihova kratkotrajna primena dovodi do smanjenja sinteze kolagena tipa I i III, što posledično vodi ka atrofije kože (Kyllönen i sar., 2004). Osim smanjenja kolagena, pokazano je da kortikosteroidi suprimiraju sintezu glukozaminoglikana, čime se smanjuje količina vode u koži, što doprinosi istanjivanju kože. Za razliku od kortikosteroida, takrolimus ne dovodi do istanjivanja i atrofije kože, štaviše, pojedine studije ukazuju na povećanu sintezu kolagena nakon jednogodišnjeg tretmana takrolimusom (Kyllönen i sar., 2004). Ipak, kao glavni neželjeni efekat topikalne primene takrolimusa registrovan je relativno čest osećaj pečenja, pruritus i iritacija na mestu primene, koji prolazi nakon nedelju dana kontinuiranog tretmana (Furue i Takeuchi, 2009).

Pored atopijskog dermatitisa, pokazano je da je topikalna primena takrolimusa efikasana u tretmanu psorijaze na licu i intertriginoznim regijama (Brune i sar., 2007; Freeman i sar., 2003), ali ne i u tretmanu psorijaze na ostalim delovima tela zbog prisustva zadebljelih, hiperkeratoznih psorijaznih plakova, koji onemogućavaju penetraciju aktivne supstance u kožu (Malecic i Young, 2016; Zonneveld i sar., 1998). Na osnovu ovoga, uočena je potreba za formulisanjem novih, naprednih nosača koji bi mogli da poboljšaju dermalnu isporuku takrolimusa i bili prihvatljiviji za pacijente u pogledu jednostavnije aplikacije.

1.1.5 Farmakokinetika takrolimusa

Takrolimus ispoljava nisku biološku raspoloživost nakon oralne primene (oko 25 %) sa velikom inter- i intravarijabilnošću (4 - 89 %)(Venkataramanan i sar., 1995). Kod većine ispitanika dolazi do njegove brze apsorpcije nakon primene, pri čemu se maksimalna koncentracija takrolimusa u krvi postiže nakon 0,5 - 1 h. Međutim, kod pojedinih pacijenata je uočena spora, kontinuirana apsorpcija tokom dužeg vremenskog intervala, bez postizanja maksimalne koncentracije takrolimusa u krvi (Venkataramanan i sar., 1995). Hrana ima veliki uticaj na brzinu i stepen apsorpcije takrolimusa, pri čemu su oni najveći pri gladovanju, dok uzimanje takrolimusa uz masnu hranu značajno smanjuje njegovu apsorpciju. U krvi se takrolimus intenzivno vezuje za eritrocite, kao i serumske proteine (Venkataramanan i sar., 1995). Metabolizam takrolimusa se dominantno odvija u jetri, posredstvom citohroma P450 3A4, iako je uočeno da se jedna količina takrolimusa metaboliše već u tankom crevu (Lampen i sar., 1995). Identifikovano je oko 15 metabolita, pri čemu mali broj njih ispoljava imunosupresivni efekat, te se smatra da oni ne doprinose značajno kliničkom efektu. Izlučivanje metabolita vrši se dominantno putem fecesa, dok se manje od 1 % nepromenjenog takrolimusa može naći u fecesu i urinu. Poluvreme eliminacije takrolimusa je takođe varijabilno i u proseku iznosi oko 12 h (Venkataramanan i sar., 1995). Zbog niskog terapijskog indeksa i generalno vrlo varijabilne biološke raspoloživosti, u cilju adekvatnog sistemskog efekta potrebno je redovno pratiti koncentraciju takrolimusa u krvi tokom sistemске primene (Venkataramanan i sar., 1995).

S druge strane, nakon topikalne aplikacije takrolimusa, očekuje se lokalno dejstvo u koži sa minimalnom sistemskom resorpcijom (Pascual i Fleisher, 2004). Rezultati kliničkih ispitivanja nakon jednokratne i ponovljene topikalne aplikacije takrolimusa u obliku masti (0,03%, 0,1 % ili 0,3 %) dva puta dnevno tokom dve do tri nedelje kod odraslih i dece (7-16 godina) ukazuje na vrlo niske koncentracije takrolimusa u krvi (maksimalna izmerena 2,4 ng/mL, prosečna ispod 1 ng/mL) (Fleischer, 1999; Undre i sar., 2009). Dodatno, uočeno je da tokom tretmana postepeno dolazi do smanjenja sistemске apsorpcije takrolimusa usled poboljšanja stanja kože. Takrolimus se ne metaboliše u koži, a poluvreme eliminacije iz kože nakon poslednje aplikacije masti je procenjeno na oko 72h, ali je takođe uočena i velika varijabilnost među ispitanicima (Undre i sar., 2009).

1.1.6 Izazovi u razvoju novih formulacija za dermalnu isporuku takrolimusa

U cilju razvoja stabilnih, naprednih koloidnih nosača za poboljšanu dermalnu isporuku takrolimusa, vrlo je važno odabrati ekscipijense koji mogu da prevaziđu slabu rastvorljivost takrolimusa u vodi. Naime, prisustvo takrolimusa u rastvornom obliku je jedan od preduslova za ostvarivanje farmakološkog efekta (Pople i Singh, 2010). Osim toga, usled velike molekulske mase takrolimusa, njegova penetracija u kožu je vrlo ograničena. Zato je poželjno poboljšati penetraciju takrolimusa u *stratum corneum* i njegovu permeaciju do vijabilnog epidermisa i dermisa, gde se očekuje ispoljavanje njegovog dejstva (Olson i sar., 2014). To se može učiniti primenom različitih fizičkih ili hemijskih metoda, kao i primenom adekvatnih naprednih nosača. S druge strane, poželjno je da nosači omoguće akumuliranje takrolimusa u koži, ali ne i njegovu resorpciju u sistemsku cirkulaciju, jer to može dovesti do sistemskih neželjenih efekata i imunosupresije (Olson i sar., 2014).

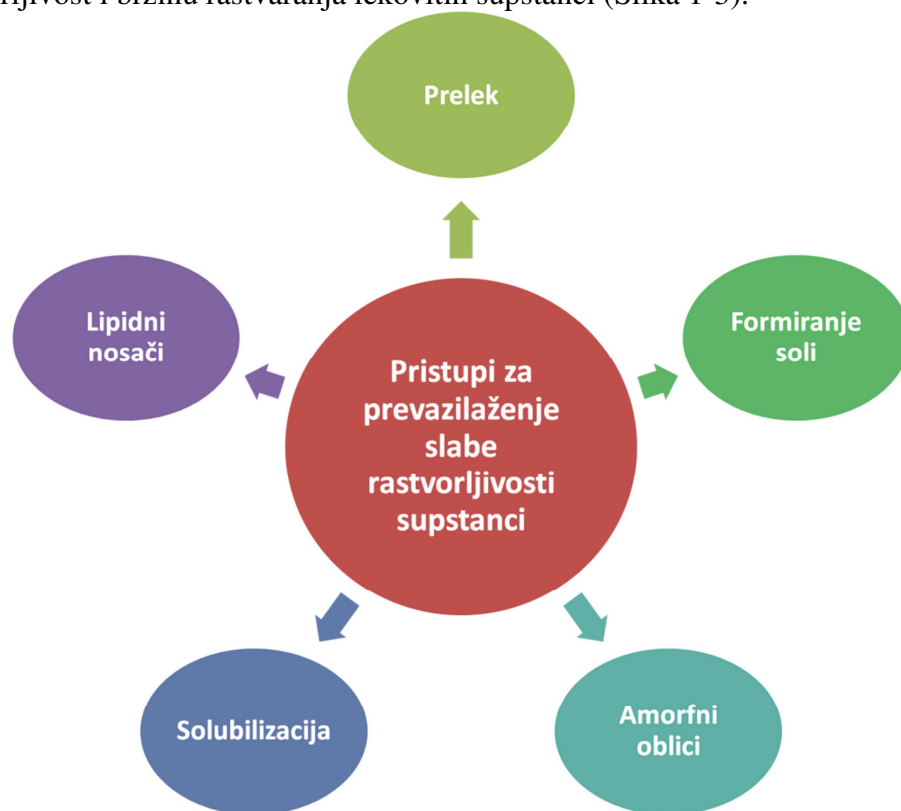
Osim ovih izazova u pogledu razvoja formulacije, postoje i drugi izazovi vezani za rad sa ovom supstancom. Naime, dugotrajno sistemsko izlaganje takrolimusu kod pacijenata sa transplantacijom organa dovelo je do povećanja incidence od razvoja malignih tumora, posebno tumora kože i to karcinoma skvamoznih ćelija. (Euvrard i sar., 2004). Postoje i određeni rezultati kohortnih studija koji ukazuju na to da čak i topikalna upotreba takrolimusa može da dovede do pojave raka kože i limfoma (Castellsague i sar., 2018). Američka agencija za hranu i lekove je u martu 2005. godine izdala javno upozorenje zdravstvenim radnicima i pacijentima o potencijalnom riziku od razvoja maligniteta usled upotrebe takrolimusa (Becker i sar., 2006). Imajući to u vidu, razvoj formulacija sa takrolimusom nosi sa sobom određenu vrstu rizika po zdravlje istraživača, posebno u kritičnim stupnjevima istraživanja, kao što su odmeravanje aktivne supstance, pravljenje formulacija i njihova karakterizacija. Zbog toga je veoma važno preduzeti mere opreza prilikom rada sa takrolimusom i koristiti odgovarajuću zaštitnu opremu.

Na kraju, imajući u vidu to da je takrolimus vrlo potentna aktivna supstanca, dostupni preparati za topikalnu primenu imaju niske koncentracije takrolimusa (0,03 % ili 0,1 %). Stoga su očekivane niske koncentracije takrolimusa na mestu dejstva, što otežava razvoj metoda za biofarmaceutsku karakterizaciju razvijenih nosača. U cilju kvantifikacije takrolimusa često je neophodno koristiti vrlo sofisticirane analitičke uređaje koji imaju dovoljno niske limite detekcije i kvantifikacije, kao i posebno prilagođavanje metoda korišćenim formulacijama.

Ovi izazovi zajedno su najverovatniji razlog zašto još uvek nema dostupnih drugih farmaceutskih oblika za topikalnu primenu takrolimusa osim prve registrovane masti sa takrolimusom. Ipak, sprovedene su različite studije koje su za cilj imale poboljšanu dermalnu isporuku takrolimusa. Između ostalih, tu spada i razvoj različitih nosača, kao što su liposomi (Erdogan i sar., 2002), polimerne micele (Lapteva i sar., 2014), polimerni nanonosai (Gabriel i sar., 2016) nanoemulzije na bazi prirodnih ulja (Sahu i sar., 2018), mikroemulzije (Goebel i sar., 2011), lipidne nanočestice (Andrade i sar., 2017; Jain i sar., 2019), nanostrukturirani supramolekularni hidrogelovi (Limon i sar., 2019), itd.

1.2 Tehnike za prevazilaženje slabe rastvorljivosti lekovitih supstanci

Prema definiciji, rastvorljivost predstavlja maksimalnu količinu supstance koja može da se rastvori u datoj zapremini određenog rastvarača pri konstantnoj temperaturi. Rastvorljivost lekovite supstance je jedan od osnovnih faktora koji utiču na brzinu rastvaranja supstance iz farmaceutskog oblika, pa time i na biološku raspoloživost leka (Sanches i Ferreira, 2019). Slaba rastvorljivost lekovitih supstanci i dalje predstavlja veliki izazov u razvoju novih lekova. Sa otkrićem i sintezom novih aktivnih supstanci, sve je više supstanci koje ispoljavaju vrlo slabu rastvorljivost u vodi. Smatra se da je čak 70 % novih kandidata za lekovite supstance zapravo praktično nerastvorljivo u vodi (Censi i Di Martino, 2015). To značajno otežava postizanje zadovoljavajuće biološke raspoloživosti i ispoljavanje željenih farmakoloških efekata ovih entiteta. Naime, rastvorljivost lekovitih supstanci u vodi identifikovana je kao kritični parametar koji je najčešće odgovoran za njihovu neadekvatnu (slabu ili varijabilnu) performansu pri isporuci lekova (Sanches i Ferreira, 2019). Imajući to u vidu, sve se više radi na razvijanju tehnika koji mogu da poboljšaju rastvorljivost i brzinu rastvaranja lekovitih supstanci (Slika 1-3).



Slika 1-3 Prikaz odabranih pristupa kojima se može prevazići slaba rastvorljivost supstanci (prilagodeno na osnovu referenci Boyd i sar., 2019; Sanches i Ferreira, 2019).

Jedna od tehnika za prevazilaženje slabe rastvorljivosti supstanci predstavlja hemijsku modifikaciju supstance, pri čemu se dobija prelek (engl. *prodrug*) - hemijski oblik koji ispoljava veću rastvorljivost, ali najčešće ne ispoljava ili ispoljava slabo farmakološko dejstvo, te se mora modifikovati/degradirati u organizmu, na ili blizu ciljanog mesta dejstva, kako bi se ispoljio željeni farmakološki efekat (Sanches i Ferreira, 2019). Prelekovci se generalno mogu podeliti u dve grupe:

- prelekovci linkovani sa nosačima, kod kojih je aktivni princip privremeno vezan kovalentnim vezama za odgovarajući nosač, pri čemu u organizmu dolazi do raskidanja ove veze;
- bioprekursori, koji nisu povezani sa nosačima, već se u organizmu aktiviraju metaboličkim modifikacijama funkcionalnih grupa.

Pojedini primeri građenja prelekova su hemijske modifikacije u cilju dobijanja estara (pogotovu estara sa polietilenglikolima, koji su veoma hidrofilni), korišćenje fosfatne grupe, bilo direktnim vezivanjem za postojeću hidroksilnu grupu ili vezivanjem preko hemijskih linkera, formiranje amida itd. (Sanches i Ferreira, 2019).

Rastvorljivost i brzina rastvaranja supstanci koje jonizuju može se značajno poboljšati korišćenjem odgovarajućih soli umesto kiselog/baznog oblika supstance. Ovaj pristup je jednostavniji u odnosu na hemijsku modifikaciju, ali dosta zavisi od pH vrednosti sredine, budući da na odgovarajućim pH vrednostima dolazi do prelaska supstance iz jonizovanog u nejonizovan oblik, i obrnuto (Boyd i sar., 2019). To posebno može da bude problem ukoliko pH vrednost pri kojoj se ispoljava maksimalna rastvorljivost supstance leži izvan oblasti fiziološke pH vrednosti, što može da dovede do precipitacije nejonizovanog oblika (Boyd i sar., 2019). Ovo posebno važi za supstance u vidu kiselina kada se nađu u stomaku (kiselina sredina), ili supstance u vidu baza kada se nađu u intestinalnom traktu (neutralna do umereno bazna sredina). Ostali nedostaci ove tehnike su to što supstanca mora imati jonizujuću grupu, kao i nedovoljno povećanje rastvorljivosti kada su u pitanju izuzetno slabo rastvorne lekovite supstance (Boyd i sar., 2019).

Korišćenje amorfnih čvrstih supstanci umesto njihovog kristalnog oblika takođe može značajno da poveća brzinu rastvaranja lekovitih supstanci. Amorfnih oblici se lakše rastvaraju od odgovarajućih kristalnih oblika budući da je u procesu rastvaranja kristalnih oblika najpre neophodno uložiti odgovarajuću energiju rastvaranja u narušavanje kristalne rešetke, dok je kod amorfnih, neuređenih sistema ovaj korak nepotreban, te je potrebna manja energija kako bi otpočelo rastvaranje (Leuner i Dressman, 2000). Problem kod amorfnih oblika je taj što su oni vrlo nestabilni i teže brzom prevođenju u stabilno, kristalno stanje. Zbog toga su razvijene amorfne čvrste disperzije, koje predstavljaju čvrstu molekularnu smešu slabo rastvornih lekovitih supstanci sa hidrofilnim nosačima, koja može da poboljša kvašenje i ubrza rastvaranje lekovitih supstanci (Vasconcelos i sar., 2016). Neke od metoda za dobijanje amorfnih čvrstih disperzija su korišćenje različitih mlinova, metoda uparavanja rastvarača (liofilizacijom, sušenjem raspršivanjem), metoda topljenja, itd. (Vasconcelos i sar., 2016). Ipak, glavni nedostatak ovog pristupa i dalje ostaje intrinzična termodinamička nestabilnost dobijenih sistema koji teže da se vrate u stabilnu, kristalnu formu.

Površinski aktivne materije (surfaktanti) su ekcipienti koji se često koriste kako bi se poboljšala rastvorljivost supstanci u vodi (Boyd i sar., 2019). Kako bi došlo do solubilizacije lekovite supstance, mora doći do nastajanja micela u kojima će se ona rastvoriti, odnosno količina surfaktanata mora biti veća od kritične micelarne koncentracije. Zapravo, ovaj pristup, slično građenju kompleksa sa ciklodekstrinima, u čijoj se unutrašnjosti može solubilizovati lekovita supstanca, dovodi do povećanja prividne rastvorljivosti supstanci u vodi (Boyd i sar., 2019).

Na kraju, još jedna od važnih tehnika za prevazilaženje slabe rastvorljivosti lekovitih supstanci podrazumeva korišćenje različitih lipidnih nosača, kao što su mikroemulzije, nanoemulzije, lipidne čestice, koji sadrže surfaktante, kosurfaktante, masnu i vodenu fazu, i mogu dobro da solubilizuju slabo rastvorljivu lekovitu supstancu unutar masne faze u smeši surfaktanata i kosurfaktanata na međufazi.

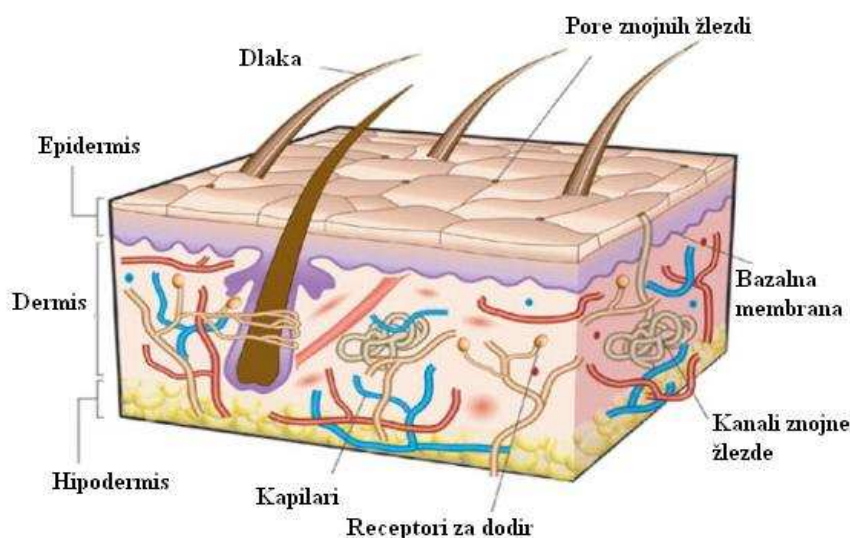
1.3 Koža kao barijera za isporuku lekovitih supstanci

1.3.1 Struktura kože

U cilju poboljšanja terapije različitih kožnih oboljenja, kao što su dermatitis, psorijaza, bakterijske, gljivične ili virusne infekcije kože, intenzivno se radi na razvoju novih nosača i primeni novih tehnologija koje bi poboljšale dermalnu isporuku lekova. Osim topikalne primene, kod koje je željeno da lekovita supstanca penetrira u kožu i tu ispolji svoje dejstvo, vrlo je aktuelan i razvoj transdermalnih sistema koji bi omogućili sistemsku isporuku različitih aktivnih supstanci nakon primene na koži. Posebno je interesantna transdermalna isporuka vakcina i drugih makromolekula, koja se intenzivno istražuje, dok na tržištu postoje različiti transdermalni flasteri za primenu hormona (estradiol, testosteron, levonorgestrel), analgetika (fentanil), nikotina, skopolamina i dr. (Prausnitz i Langer, 2008). Međutim, da bi se omogućila dermalna ili transdermalna isporuka lekova, neophodno je savladati glavnu i osnovnu ulogu kože - barijernu zaštitu od različitih egzogenih supstanci prisutnih u našem okruženju. Savladavanje kožne barijere može biti dodatno otežano izmenjenom strukturom kože usled prisutnog kožnog oboljenja, kao što je slučaj sa keratinoznim plakovima prisutnim u psorijazi (Prausnitz i sar., 2012; Prow i sar., 2011).

Ukratko, koža se sastoji iz epidermisa, dermisa i hipodermisa (Slika 1-4). Epidermis se dalje može podeliti na *stratum corneum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum* i *stratum basale* (Slika 1-5).

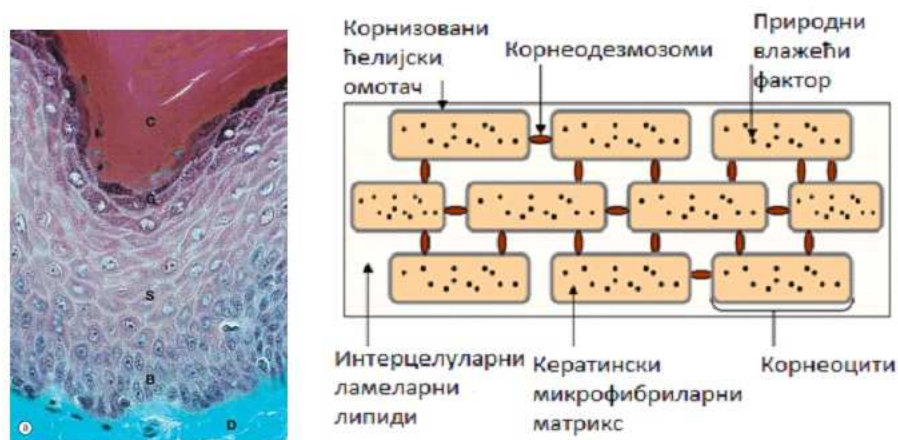
Stratum corneum predstavlja glavnu barijeru za penetraciju supstanci iz spoljašnje sredine. To je površinski, spoljašnji sloj kože debljine 10-20 μ m. Njegova tipična struktura cigala i maltera (engl. *bricks and mortar*) posebno je odgovorna za otežan prodor egzogenih supstanci u kožu, kao i sprečavanje preteranog gubitka vode iz organizma (Prausnitz i sar., 2012). Pod ciglama prvenstveno se misli na oko 20 slojeva korneocita (terminalno diferenciranih keratinocita), tj. ćelija bez jedara i organela ispunjenih umreženim citokeratinskim filamentima, koje poseduju izuzetno rigidan, kornizovani ćelijski omotač u čiji sastav ulaze različiti proteini, kao što su involucrin, lorikrin, mali proteini bogati prolinom, filagrin, idr. (Gorzelanny i sar., 2020). Korneociti su međusobno povezani korneodezmomima koji osiguravaju kohezivnost ovog sloja. Za normalnu deskvamaciju kože vrlo je važan proces degradacije korneodezmoma, u čijem procesu učestvuju različite proteaze, kao što su kalikrein-srodne peptidaze i katepsini.



Slika 1-4 Prikaz poprečnog preseka kože, preuzeto i prilagođeno prema referenci (Young i sar., 2006).

Intercelularni prostor *stratum corneum*-a ispunjen je gusto pakovanim lipidnim slojevima, takozvanim lipidnim lamelama, koji se sastoje od holesterola, slobodnih masnih kiselina i ceramida. Organizacija lipidnog sloja je od velike važnosti za barijernu ulogu koju ovaj sloj poseduje, i može se narušiti hidratacijom kože, primenom temperature ili različitih pojačivača penetracije (Gorzelanny i sar., 2020). Lipidni matriks je odgovoran kako za smanjenu penetraciju hidrofилних lekovitih supstanci, tako i za eventualno formiranje rezervoara lipofilnih lekovitih supstanci u koži. Zahvaljujući ovakvoj strukturi i lipidnom matriksu u kome su korneociti uronjeni, permeabilnost *stratum corneum*-a za vodu je hiljadu puta manja u odnosu na druge biološke membrane (Gorzelanny i sar., 2020).

Još jedna značajna komponenta koja ulazi u sastav *stratum corneum*-a je prirodni vlažeći faktor (eng. *Natural Moisturizing Factor*), koji se sastoji se od smeše aminokiselina, mlečne kiseline, uree, citrata i šećera (Wiedersberg i sar., 2008). On je neophodan za održavanje hidratacije kože, i dominantno nastaje degradacijom filagrina, ali se takođe nalazi i u znoju. Komponente prirodnog vlažećeg faktora mogu da utiču na aktivnost raznih proteaza koje su uključene u proces deskvamacije kože, kao i na sintezu lipida (Gorzelanny i sar., 2020).



Slika 1-5 LEVO: Slojevi epidermisa i deo dermisa: C – *Stratum corneum*, G – *Stratum granulosum*, S – *Stratum spinosum*, B – *Stratum basale*, D – dermis, preuzeto i prilagođeno prema referenci Young i sar., 2006 . DESNO – šematski prikaz *stratum corneum*-a, preuzeto i prilagođeno na osnovu reference Wiedersberg i sar., 2008.

Keratinociti nastaju u bazalnom sloju epidermisa - *stratum basale*, pri čemu se postepeno diferenciraju i migriraju kroz *stratum spinosum* i *stratum granulosum* do *stratum corneum*-a. *Stratum granulosum* je od posebne važnosti jer su u njemu ćelije spojene čvrstim spojnicaма (engl. *tight junctions*), koje dodatno doprinose kožnoj barijeri. Ove spojnice sastoje se od različitih transmembranskih proteina, među kojima su dominantni proteini iz porodice kladina. Poznato je da u lezijama kože pacijenata sa atopijskim dermatitisom postoji izražena nishodna regulacija sinteze proteina kladin-1, koja može biti odgovorna za narušavanje kožne barijere koja potiče od čvrstih spojnica (Gorzelanny i sar., 2020).

Osim keratinocita, vijabilni epidermis sadrži i druge ćelije, kao što su melanociti – ćelije koje proizvode melanin, pigment neophodan u zaštiti od UV zračenja, Merkelove ćelije – mehanoreceptori neophodni za percepciju teksture predmeta i laganog dodira, kao i Langerhansove ćelije i T-limfocite neophodne u aktiviranju imunog odgovora (Nguyen i Soulika, 2019).

Na bazalnoj strani *stratum basale*, kao spojnica između epidermisa i dermisa, nalazi se bazalna membrana, koju sačinjavaju različiti proteini i ugljeni hidrati, kao što su laminini i kolageni, proteoglikani i hijaluronska kiselina. U kojoj meri bazalna membrana doprinosi barijernoj ulozi kože još uvek nije potpuno razjašnjeno, ali se zna da ona doprinosi zaustavljanju prodiranja Herpes simplex virusa, kao i da je njena debljina smanjena kod pacijenata sa atopijskim dermatitisom (Gorzelanny i sar., 2020).

Ispod epidermisa nalazi se dermis, sloj kože ispunjen vezivnim tkivom, kolagenom, elastinom i ekstracelularnim matriksom izgrađenom pretežno od glikozaminoglikana (hijaluronska kiselina), glikoproteina i proteoglikana (Wong i sar., 2016). Kroz dermis se prožima kompleksna mreža krvnih i limfnih sudova, kao i nervnih završetaka. S obzirom na to da se u epidermisu ne nalaze kapilari, dermis je glavni izvor hranjivih materija i esencijalnih supstanci koje difuzijom prelaze u epidermis. U dermisu su lokalizovane i sebacealne (lojne) žlezde, znojne žlezde, folikuli dlaka, termoreceptori i mehanoreceptori. Fibroblasti su najzastupljenije ćelije i proizvode kolagen i ekstracelularni matriks, a dodatno imaju značajnu ulogu u zarastanju rana. Osim fibroblasta, u dermisu su takođe prisutne makrofage, limfociti i mast ćelije, koje imaju značajnu ulogu u imunom odgovoru (Nguyen i Soulika, 2019).

Ispod dermisa nalazi se hipodermis, najdublji sloj kože koji se dominantno sastoji od potkožnog masnog tkiva i mišića. Hipodermis je bogat fibrocitima, adipocitima, proteoglikanima i glikozaminoglikanima, kao i različitim ćelijama odgovornim za imunološki odgovor (Nguyen i Soulika, 2019). Njegova glavna funkcija je skladištenje energije u vidu masnih kiselina, kao i endokrina uloga u homeostazi glukoze i metabolizma lipida. Dodatno se hipodermis ponaša kao toplotni i mehanički izolator (Young i sar., 2006).

1.3.2 Putevi isporuke lekovitih supstanci u/kroz kožu

Bez obzira na njenu barijernu ulogu, koža predstavlja važan put primene mnogih lekova. U zavisnosti od mesta dejstva lekovite supstance, može biti očekivano/željeno da supstanca ostane na površini kože (topikalni efekat, preparati za zaštitu od sunca, antimikotici), penetrira u *stratum corneum* i dublje slojeve kože sa ciljem ostvarivanja lokalnog efekta (tretman psorijaze, dermatitisa, raka kože), ili da permeira kroz kožu i bude apsorbirana u sistemsku cirkulaciju (transdermalna isporuka, nikotinski transdermalni flasteri, hormonalni transdermalni flasteri). Generalno, isporuka lekovitih supstanci u/kroz kožu najviše zavisi od: 1) interakcije supstanci sa interćelijskim lipidnim matriksom, 2) interakcije supstanci sa keratinom u korneocitima, 3) interakcije kosolventa ili pojačivača penetracije sa lipidnim matriksom *stratum corneum*-a, koja može da dovede do reverzibilnog narušavanja kožne barijere i poboljšanja transporta supstanci u/kroz kožu (Alexander i sar., 2012).

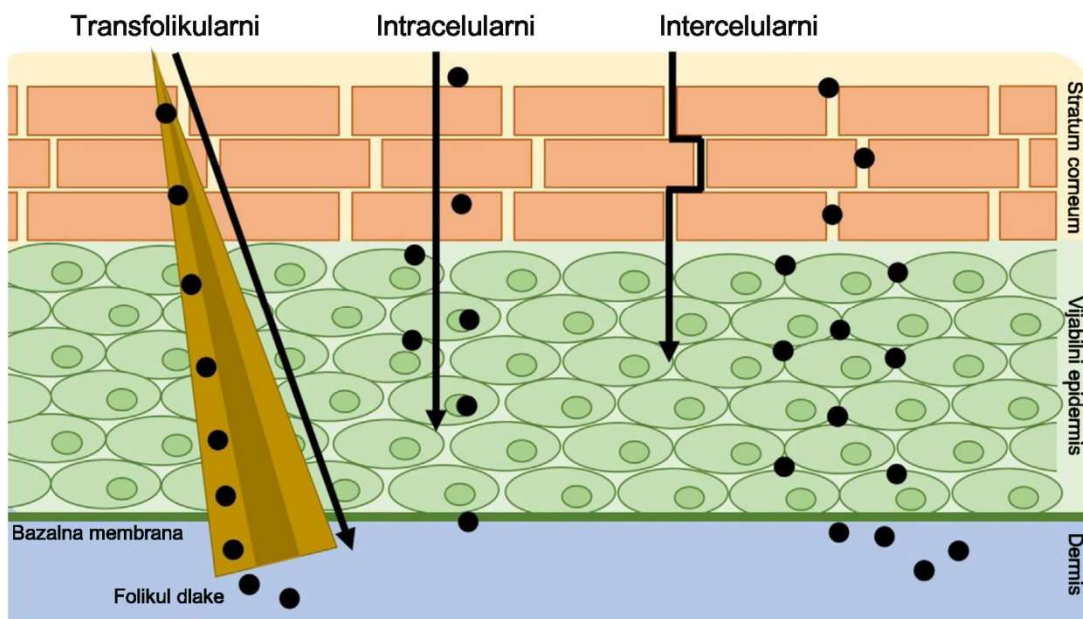
Transport lekovitih supstanci kroz *stratum corneum* se odvija pasivnom difuzijom koja je u saglasnosti sa Fikovim zakonom difuzije, prema kome je stepen apsorpcije supstance (fluks, J) kroz barijeru proporcionalan njenoj razlici u koncentraciji između barijere (Czajkowska-Kosnik i sar., 2019). Fikov zakon se može opisati sledećom formulom:

$$J = (DK_m / L) * C_v$$

pri čemu D predstavlja difuzioni koeficijent supstance u *stratum corneum*-u, K_m predstavlja particioni koeficijent između *stratum corneum*-a i nosača, L je dužina difuzionog puta, a C_v je koncentracija supstance u nosaču. Ova četiri faktora kontrolišu kinetiku perkutane apsorpcije, pri čemu u razvoju novih nosača posebno treba voditi računa o kritičnim faktorima: rastvorljivost supstance u nosaču i maksimizovanja raspodele supstance iz nosača u *stratum corneum* (Czajkowska-Kosnik i sar., 2019).

Postoje tri osnovna puta transporta supstanci kroz kožu (Slika 1-6)(Bellefroid i sar., 2019):

- 1) intercelularni, kroz međućelijski matriks *stratum corneum*-a
- 2) intracelularni/transcelularni, kroz korneocite u *stratum corneum*-u
- 3) transfolikularni/transapendagealni, kroz folikule dlake ili eventualno lojne/znojne žlezde



Slika 1-6 Putevi prolaska supstanci u/kroz kožu (prilagođeno na osnovu reference Bellefroid i sar., 2019).

Koji tip transporta će biti aktuelan najviše zavisi od lipofilnosti ispitivane supstance, kao i njene molekulske mase i rastvorljivosti. Naime, Lipinski i saradnici predložili su pravilo broja 5, na osnovu kog se može predvideti loša apsorpcija ili permeacija ukoliko supstanca ima molekulska masu veću od 500, broj donora vodoničnih veza veći od 5, broj akceptora vodoničnih veza veći od 10, i particioni koeficijent oktanol-voda ($\log P$) veći od 5 (Lipinski i sar., 2001). Generalno, male, lipofilne supstance, sa $\log P$ vrednošću oko 2 lako penetriraju u kožu intercelularnim putem, prodiru kroz kožu i bivaju apsorbovane u sistemsku cirkulaciju (Tetty-Amlalo, 2008). Iako se ranije smatralo da je transcelularni put zastupljen kod hidrofilnih supstanci, danas postoje oprečni stavovi i veliki broj histohemijskih i teorijskih dokaza ukazuju na to da većina supstanci biva transportovana intercelularnim putem, kroz lipidni matriks (Prow i sar., 2011). Imajući u vidu to da znojne žlezde i folikuli dlaka okupiraju oko 0,1 % ukupne površine kože, transfolikularni/transapendagealni put se ne smatra značajnim za permeaciju, ali u određenim slučajevima, kao što je isporuka nanočestica, ipak može biti od važnosti (Lademann i sar., 2011; Lane, 2013).

1.4 Strategije za poboljšanje dermalne isporuke lekova

Potruga za strategijama koje se mogu koristiti u poboljšanju isporuke lekovitih supstanci traje još od praistorijskih dana. Tada je bilo vrlo važno brzo tretirati rane, kožne opekotine i druga oboljenja kože, kako bi se sprečio nastanak infekcija koje su često bile fatalne. Jedan od prvih pristupa u cilju lečenja kožnih oboljenja i povreda bila je primena različitih masnih obloga preko lekovitih trava i melema (Hartmann, 2016), za koje se danas zna da dovode do okluzije kože, što hidratiše kožu i olakšava prodiranje lekovitih supstance kroz *stratum corneum*, kao glavnu kožnu barijeru.

Razvojem medicine, farmacije, tehnologije i dijagnostike, uočeni su brojni inovativni pristupi kojima se može poboljšati isporuka lekovitih supstanci. Takođe, potreba za razvojem neinvazivnih načina za primenu vakcina, proteina, peptida, oligonukleotida i gena, kao i sve veća incidenca različitih tipova raka kože, koje je poželjno lečiti topikalno u cilju smanjenja sistemskih neželjenih efekata terapije, intenzivirala je potragu za novim, poboljšanim načinima dermalne i transdermalne isporuke ovih i sličnih makromolekula. Danas postoje različite strategije kojima se može prevazići

barijerna funkcija *stratum corneum*-a i poboljšati dermalna ili transdermalna isporuka lekova. S obzirom na to da se često koriste kombinacije različitih strategija, nije lako napraviti strogu podelu između metoda koje se koriste u tu svrhu. Ipak, u zavisnosti od toga da li je potrebno upotrebiti spoljašnje izvore energije, mogu se razlikovati aktivne i pasivne metode za poboljšanje dermalne ili transdermalne isporuke lekova. S druge strane, posmatrajući mehanizme kojima se omogućava povećana propustljivost kožne barijere, ove strategije se mogu podeliti na fizičke, hemijske, biohemijske i formulacione (Morrow i sar., 2007; Rizwan i sar., 2009).

Kod aktivnih strategija neophodno je koristiti spoljašnji izvor energije, kako bi se privremeno narušila struktura *stratum corneum*-a. Tu spadaju (Rizwan i sar., 2009):

- jontoforeza - primena električne struje u cilju bolje penetracije i permeacije naelektrisanih molekula),
- elektroporacija - kratkotrajna (< 1 s) primena impulsa visokog napona (50 - 500 V), koja dovodi do privremenog i reverzibilnog formiranja vodenih kanala kroz lipidne membrane
- sonoforeza - primena ultrazvuka različitih frekvencija (20 kHz - 16 MHz) koji posredstvom kavitacije - formiranja gasovitih mehura unutar intercelularnih lipida - dovodi do disrupcije *stratum corneum*-a
- magnetoforeza - primena magnetnog polja kako bi se poboljšao difuzioni koeficijent dijamagnetičnih supstanci u kožu. Iako još nedovoljno istražena, smatra se da može biti od značaja, pogotovu u kombinaciji sa primenom magnetnih (nano)čestica (Park i sar., 2016)

Pristupi za poboljšanje penetracije lekova kroz kožu

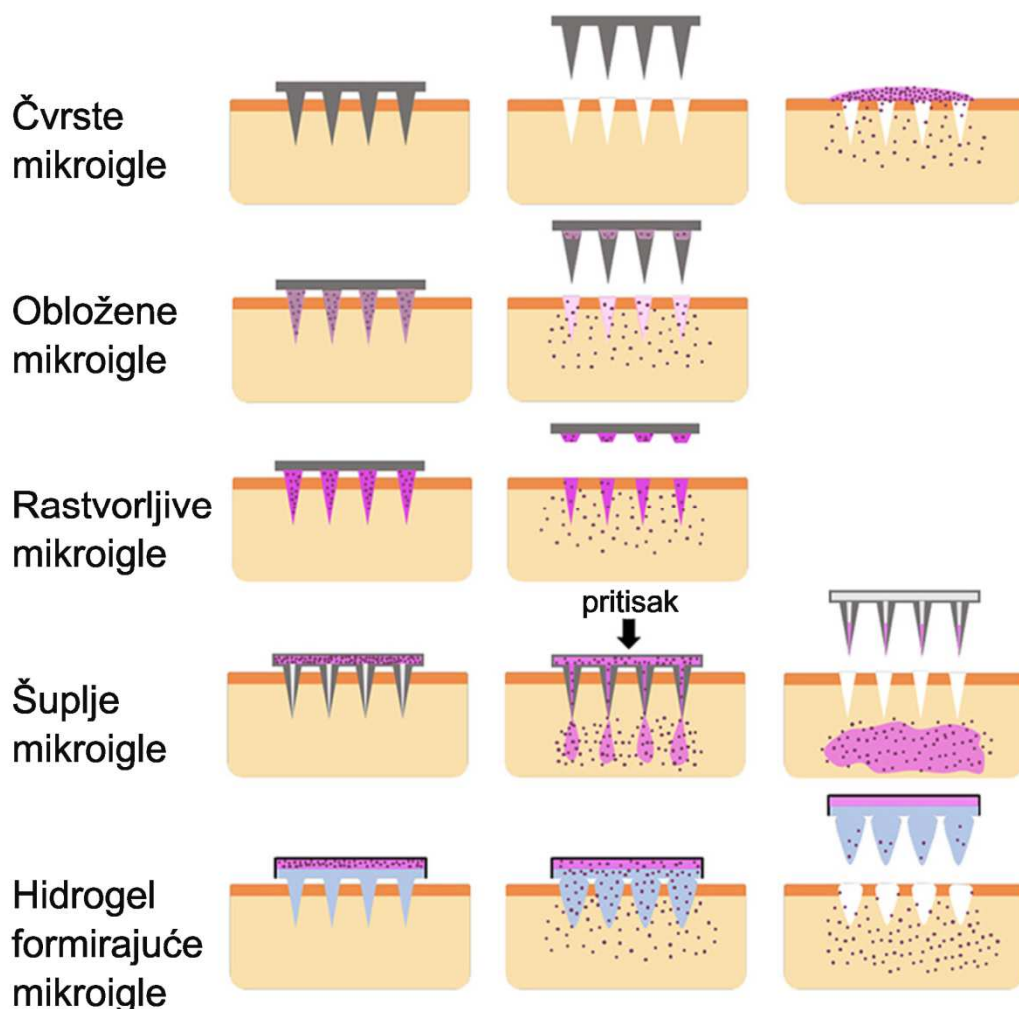
Lek-nosač interakcije / osobine supstance	Upotreba naprednih nosača	Modifikacija <i>stratum corneum</i> -a	Uklanjanje / zaobilaznje <i>stratum corneum</i> -a	Upotreba energije
<ul style="list-style-type: none"> • Termodinamička aktivnost • Jonski parovi • Eutektički sistemi • Prelek 	<ul style="list-style-type: none"> • Lipozomi i analozi • Mikroemulzije • Nanoemulzije • Lipidne nanočestice 	<ul style="list-style-type: none"> • Hidratacija • Pojačivači penetracije 	<ul style="list-style-type: none"> • Primena mikroigala • Ablacija • Folikularni transport • Primena metode sa trakama 	<ul style="list-style-type: none"> • Jontoforeza • Elektroporacija • Sonoforeza • Magnetoforeza

Slika 1-7 Različiti pristupi za poboljšanje penetracije lekova kroz kožu (prilagođeno na osnovu referenci Morrow i sar., 2007; Rizwan i sar., 2009).

Budući da primenom ovih aktivnih strategija dolazi do fizičkog narušavanja strukture kože, one se mogu takođe smatrati fizičkim strategijama za poboljšanje dermalne/transdermalne isporuke lekova. Iako su vrlo efiksne, njihova upotreba je i dalje ograničena zbog značajnih nedostataka, kao što su neophodnost posedovanja skupe opreme, invazivna primena i bolnost prilikom primene (Bellefroid i sar., 2019).

Primena mikroigala (igala mikrometarske dimenzije, dužine 150 - 2000 μm) smatra se takođe jednom od značajnih strategija, kojom se fizičkim putem formiraju reverzibilne mikrometarske pore u *stratum corneum*-u, čime se olakšava pasivna difuzija aktivnih supstanci u kožu (Bellefroid i sar., 2019). Postoje različiti tipovi mikroigala koje se mogu primenjivati u tu svrhu, kao što su čvrste mikroigle, obložene mikroigle, rastvorljive (biodegradabilne) mikroigle, šuplje mikroigle, hidrogel formirajuće mikroigle (Rzhevskiy i sar., 2018). Slika 1-8 prikazuje mehanizme oslobađanja lekovite supstance iz različitih tipova mikroigala. S obzirom na brojne prednosti korišćenja mikroigala, kao što su mogućnost isporuke velikih molekula (npr. nukleinskih kiselina), minimalna invazivnost i bezbolnost primene, jednostavna primena, relativno niski troškovi izrade, mogućnost odabira

ciljanog mesta isporuke modifikacijom dužine mikroigala, mogućnost kontrolisane isporuke lekova, itd. (Bellefroid i sar., 2019), sve je veći broj istraživačkih grupa koje se bave ovom tematikom, kao i komercijalno dostupnih sistema sa mikroiglama (Rzhevskiy i sar., 2018). Ipak, i dalje je potrebno prevazići pojedine nedostatke primene mikroigala, kao što su kapacitet inkorporacije lekovite supstance, formiranje pora u koži koje mogu trajati i više od 24 h, kao i mogućnost iritacije kože (Münch i sar., 2017).



Slika 1-8 Šematski prikaz različitih tipova mikroigala, kao i mehanizma oslobađanja lekovite supstance iz njih (preuzeto i prilagođeno iz reference Rzhevskiy i sar., 2018).

Korišćenjem hemijskih pojačivača penetracije (engl. *chemical penetration enhancers*, CPE) takođe se može omogućiti poboljšana dermalna isporuka lekovitih supstanci. Njihov efekat ogleda se u hemijskoj interakciji sa gradivnim molekulima *stratum corneum*-a (dominantno intercelularnim lipidima) i generalno kože, čime se povećava njena propustljivost i olakšava pasivna difuzija aktivnih principa (Rizwan i sar., 2009). U ovu grupu spadaju brojni alkoholi (etanol, glicerol, propilenglikol, lauril alkohol, itd.), masne kiseline (laurinska kiselina, palmitinska kiselina, oleinska kiselina, itd.), estri (etil acetat, izopropilmiristat, izopropilpalmitat, itd.), amidi (urea, dimetilacetamid, dimetilformamid, derivati pirolidona), alkoholni etri (monoetiletar dietilenglikola), etarska ulja i terpeni (D-limonen, karvon, mentol), sulfoksidi (dimetilsulfoksid, decilmetilsulfoksid), različiti anjonski, katjonski i nejonski surfaktanti, kao i fosfolipidi (Lane, 2013; Münch i sar., 2017). Poželjne karakteristike hemijskih pojačivača penetracije su farmakološka inertnost, brzo ispoljavanje efekta, brzo i potpuno ponovno uspostavljanje kožne barijere nakon uklanjanja sa kože, biokompatibilnost i netoksičnost, da ne dovodi do alergijskih reakcija ili iritacije, da ima prihvatljive organoleptičke osobine za primenu na koži, da ispoljava

jednostrano dejstvo, odnosno da omogućava penetraciju aktivnih principa u kožu, a sprečava gubljenje endogenih supstanci iz tela, da bude kompatibilan sa ekscipijensima koji se uobičajeno koriste u farmaceutskim preparatima za primenu na koži (Williams i Barry, 2004). Najveća briga pri primeni hemijskih pojačivača penetracije i dalje ostaje mogućnost iritacije kože, koju nije moguće predvideti korišćenjem *in vitro* studija (Lane, 2013).

Pod biohemijskim tehnikama za poboljšanje dermalne raspoloživosti lekova smatra se prvenstveno upotreba peptida (engl. *skin penetrating peptides*, SPPs) malih molekulskih masa (1000 - 1500 Da), koji mogu da formiraju pore u *stratum corneum*-u i olakšaju penetraciju malih i velikih molekula u kožu (Kim i sar., 2007; Kumar i sar., 2015). Budući da su i ovi peptidi relativno veliki molekuli, primećeno je da je u nekim slučajevima neophodno koristiti druge vrste penetracionih inhensera (npr. surfaktante), koji bi olakšali penetraciju samih peptida. Nakon toga se postiže sinergističko dejstvo ovih inhensera i bolja penetracija lekovitih supstanci (Kim i sar., 2007), koja se dodatno može modifikovati podešavanjem pH vrednosti, čime se može menjati naelektrisanje unutar pora peptida i olakšati penetracija naelektrisanih aktivnih principa (Kim i sar., 2008). Novija saznanja o mehanizmu poboljšanja penetracije korišćenjem peptida ukazuju na to da, za razliku od ostalih penetracionih inhensera koji dominantno interaguju sa intercelularnim lipidnim matriksom, ovi peptidi možda interaguju sa keratinom u korneocitima i na taj način pospešuju transcelularni transport aktivnih principa (Kumar i sar., 2015).

Pod formulacionim pristupom poboljšanja dermalne raspoloživosti lekovitih supstanci spada korišćenje nosača koji su supersaturisani aktivnom supstancom, čime se povećava njena termodinamička aktivnost; korišćenje jonskih parova za naelektrisane lekovite supstance, odnosno dodavanje suprotno naelektrisanih molekula čime se neutralizuje neto naelektrisanje lekovite supstance budući da jonizovani oblici ispoljavaju mnogo manju permeabilnost od nejonizovanih oblika; primena eutektičkih smeša, kod kojih se postiže smanjenja tačke topljenja lekovite supstance njenim kombinovanjem sa drugim čvrstim supstancama (Morrow i sar., 2007). Takođe, jedan od formulacionih pristupa podrazumeva modifikovanje osobina aktivne supstance, čime se ona prevodi u hemijski oblik koji je najčešće neaktivan, ali ima poželjnije fizičko-hemijske karakteristike koje olakšavaju prodiranje u kožu, gde degradacijom ili pod dejstvom enzima biva prevedena u aktivni oblik.

Na kraju, u formulacione pristupe spada i primena različitih nosača, kao što su vezikularni sistemi (konvencionalni lipozomi, visokodeformabilni lipozomi - npr. transferozomi, etozomi), mikroemulzije, nanoemulzije, nanočestice, koji mogu da poboljšaju dermalnu isporuku lekovitih supstanci. Mehanizmi kojima ovi nosači poboljšavaju isporuku lekovitih supstanci i dalje nisu u potpunosti razjašnjeni. Konvencionalni lipozomi najverovatnije ne prolaze kroz epidermis neizmenjeni, već se fuzionišu sa lipidnim matriksom *stratum corneum*-a odakle aktivne supstance mogu da difunduju u dublje slojeve kože (Sala i sar., 2018). Za razliku od njih, transfersomi, viskoelastični lipozomi, mogu da prođu kroz intercelularni lipidni matriks zahvaljujući njihovoj sposobnosti deformacije oblika i/ili strukture, nakon čega se mešaju ili rastvaraju u lipidima kože i oslobađaju lekovitu supstancu u epidermis, odakle ona može dalje da difunduje u dublje slojeve (Sala i sar., 2018). Oni se sastoje od nekoliko fosfolipidnih dvosloja sa inkorporiranom dodatnom komponentom, takozvani ivični aktivator (engl. *edge activator*, npr. natrijumholat, deoksiholat, različiti polisorbati), koja omogućava njihovu visoku deformabilnost. Etozomi, vezikule koje se sastoje od fosfolipida i velike količine etanola (20 - 45 %), takođe mogu da penetriraju kroz intercelularni lipidni matriks zahvaljujući njihovoj visokoj elastičnosti, pogotovu što velika količina etanola kao pojačivača penetracije čini ovaj sloj mnogo fluidnijim (Sala i sar., 2018).

Mikroemulzije, nanoemulzije i nanočestice su glavna tema ove doktorske disertacije, i biće detaljnije opisani u sledećim poglavljima.

1.5 Koloidne disperzije

Koloidne disperzije su sistemi koji se sastoje od najmanje dve faze - unutrašnje, dispergovane faze i spoljašnje, kontinualne faze, pri čemu je veličina čestica dispergovane faze između 1 nm i 1 μm . Za razliku od grubih suspenzija i emulzija, čestice unutrašnje faze koloidnih disperzija su suviše male da bi bile uočljive korišćenjem svetlosnog mikroskopa, ali se mogu identifikovati korišćenjem elektronskog mikroskopa. Dodatno, upravo zbog male veličine, čestice dispergovane faze se nalaze u stanju Braunovog kretanja i relativno su otporne na proces sedimentacije ili kriminga, što ih dodatno čini značajno stabilnijim od običnih, grubih suspenzija i emulzija (Remington i Allen, 2013).

Upotreba koloidnih disperzija jedan je od načina za prevazilaženje slabe rastvorljivosti lekovitih supstanci i poboljšanje dermalne isporuke lekova. Iako koloidne disperzije obuhvataju različite sisteme, kao što su miclele, vezikularni sistemi (lipozomi, niozomi, etozomi, transferozomi...), nanosuspenzije, itd., u daljem tekstu će posebna pažnja biti posvećena mikroemulzijama, nanoemulzijama i nanočesticama kao nosačima za dermalnu isporuku lekovitih supstanci.

1.5.1 Mikroemulzije

Mikroemulzije (ME) su termodinamički stabilne, transparentne, izotropne, tečne smeše ulja, vode i surfaktanata, često u kombinaciji sa kosurfaktantom (Tabela 1-1). Termin mikroemulzija uveden je od strane Schulmana i saradnika 1959. godine, koji su još početkom četrdesetih godina dvadesetog veka uočili da je moguće dobiti transparentan, jednofazni sistem koji se sastoji od ulja, vode i surfaktanata ukoliko je odnos surfaktant-ulje u tom sistemu dovoljno visok (Hoar i Schulman, 1943; Schulman i sar., 1959). S obzirom na to da naziv ovih sistema može pogrešno da ukaže na njihovu mikrometarsku, a ne nanometarsku strukturu, bilo je više bezuspešnih pokušaja promene ovog termina, te je stoga i danas zadržan u širokoj upotrebi.

Za razliku od emulzija, koje su suštinski termodinamički nestabilne i, iako mogu da pokažu izuzetnu kinetičku stabilnost, tokom vremena dolazi do razdvajanja uljane i vodene faze, mikroemulzije su termodinamički stabilni sistemi kod kojih ne dolazi do razdvajanja faza tokom skladištenja. Dalje, emulzije su obično zamućene ili mlečno bele, a mikroemulzije su transparentne ili opalescentne tečnosti. Takođe, u cilju dobijanja emulzije potrebno je uložiti dosta energije kako bi došlo do adekvatnog mešanja vodene i masne faze, dok mikroemulzije nastaju spontano, bez utroška energije (Lawrence i Rees, 2000). Zapravo, nastanak mikroemulzija može se objasniti korišćenjem Gibs-Helmholtz jednačine (Lawrence i Rees, 2000):

$$\Delta G_f = \gamma \Delta A - T \Delta S$$

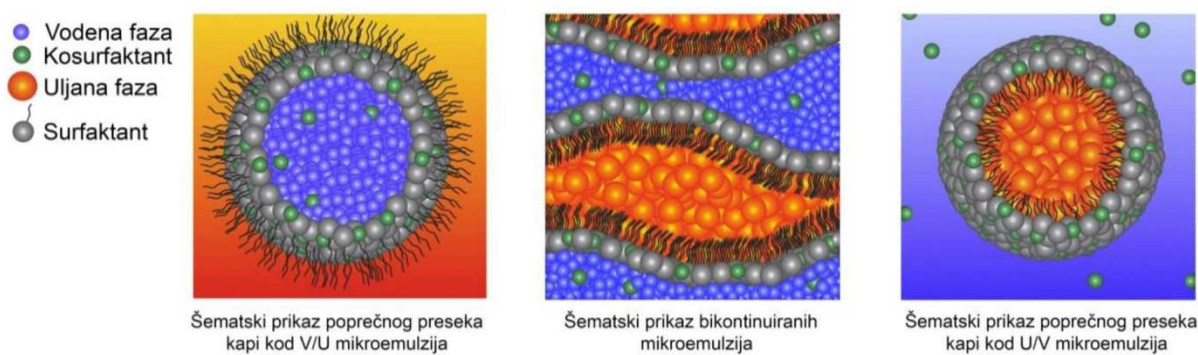
pri čemu ΔG_f predstavlja Gibsovu slobodnu energiju formiranja mikroemulzija (razlika između energije sistema kada su faze razdvojene i energije sistema nakon formiranja mikroemulzija), γ označava međupovršinski napon između uljane i vodene faze, ΔA je razlika u dodirnoj površini između faza tokom mikroemulzifikacije, T označava temperaturu, dok ΔS predstavlja promenu u entropiji sistema koja je efektivno disperziona entropija.

Usled mešanja vodene i uljane faze do nanometarskih dimenzija, dolazi do velikog povećanja dodirne površine između ovih faza (veliki porast vrednosti ΔA). Budući da je temperatura u sistemu relativno konstantna, kako bi se ovaj proces desio neophodno je da se omogući izuzetno nizak međupovršinski napon između faza (iako ova vrednost uvek ostaje pozitivna, reda veličine dela mN/m). Dodatno, usled velikog porasta u entropiji sistema (ΔS) zbog formiranja velikog broja malih kapi unutrašnje faze, spontano nastaje favorizovani sistem sa negativnom Gibsovom energijom koji je termodinamički stabilan (Lawrence i Rees, 2000). Upravo kako bi se osigurao dovoljno nizak međupovršinski napon između uljane i vodene faze, neophodno je koristiti relativno velike količine surfaktanata i kosurfaktanata.

Daljom analizom strukture ovih transparentnih, termodinamički stabilnih sistema zaključeno je da u zavisnosti od sastava i odnosa vodene i masne faze može da dođe do formiranja tri različita tipa mikroemulzija (Lawrence i Rees, 2000):

- ulje u vodi (U/V) mikroemulzije
- voda u ulju (V/U) mikroemulzije
- bikontinuirane mikroemulzije.

Karakteristično za sve ove tipove mikroemulzija je prisustvo monosloja surfaktanta na međupovršinskoj fazi ulje-voda. Ukoliko je u sistemu prisutan veći udeo vodene faze dolazi do formiranja U/V mikroemulzije, pri čemu su kapi ulja uniformno dispergovane u kontinualnoj, vodenoj fazi (Lawrence i Rees, 2000). Nasuprot tome, u prisustvu većeg udela uljane faze dolazi do formiranja V/U mikroemulzije u kojoj su vodene kapi dispergovane u masnoj, spoljašnjoj fazi. Sistemi koji sadrže približno iste količine uljane i masne faze pogodni su za formiranje bikontinuiranih mikroemulzija, kod kojih se uljani i vodeni segmenti međusobno smenjuju, a razdvojeni su fluidnim međupovršinskim filmom surfaktanta (Slika 1-9).



Slika 1-9 Šematski prikaz V/U, bikontinuiranih i U/V mikroemulzija (preuzeto od Todosijević, 2017)

Mikroemulzije poseduju visoku sposobnost solubilizacije lekovitih supstanci, ali takođe mogu poboljšati penetraciju kako hidrofилnih, tako i lipofilnih aktivnih supstanci u kožu usled interakcije sa lipidnim matriksom stratum korneum (Heuschkel i sar., 2008). Ipak, primena mikroemulzija u farmaceutskim preparatima je ograničena uglavnom zbog visokog sadržaja surfaktanata i kosurfaktanata koji mogu da dovedu do iritacije kože. Stoga, uzimajući u obzir pozitivne i negativne karakteristike mikroemulzija, važno je raditi na razvoju mikroemulzija korišćenjem biokompatibilnih, bezbednih i neiritirajućih surfaktanata, kao što je lecitin.

Lecitin je jedan od najčešće korišćenih, dobro podnošenih, prirodnih, netoksičnih, biokompatibilnih i sigurnih ekscipijenasa. Međutim, njegova izrazita hidrofobnost usled prisustva dva dugačka lanca ugljovodonika, snažne lipofobnosti usled prisustva hidriranih zwitterionskih polarnih grupa i snažne tendencije stvaranja lamelarne tečne kristalne faze otežavaju razvoj formulacija. Kako bi se formulisale mikroemulzije na bazi lecitina neophodno je uključiti i kosurfaktante koji se mogu inkorporirati u međupovršinski film i smanjiti njegovu rigidnost, čime se olakšava formiranje svih tipova mikroemulzija (Gosenca i sar., 2013; Hoppel i sar., 2014).

Tabela 1-1 Uporedne karakteristike mikroemulzija, nanoemulzija, čvrstih lipidnih nanočestica i nanostrukturiranih lipidnih čestica (prilagođeno na osnovu referenci Klang i Valenta, 2011; Lawrence i Rees, 2000; Müller i sar., 2002).

	Mikroemulzije	Nanoemulzije	Čvrste lipidne nanočestice	Nanostrukturirane lipidne čestice
Veličina	< 100 nm	< (100 nm) < 1000 nm	< 1000 nm	< 1000 nm
Turbiditet	Transparentne do translucetne	Translucetne ili mlečno bele	Translucetne ili mlečno bele	Translucetne ili mlečno bele
Spontano nastajanje	Da	Ne	Ne	Ne
Stabilnost	Termodinamički stabilne	Kinetički stabilne	Kinetički stabilne	Kinetički stabilne
Masna faza	Ulje	Ulje	Čvrst lipid	Smeša čvrstog i tečnog lipida
Količina surfaktanta	Relativno visoka, često neophodni kosurfaktanti	Umerena do niska	Umerena do niska	Umerena do niska
Mogućnost razblaživanja	Često narušava strukturu	Bez promene	Bez promene	Bez promene

1.5.2 Nanoemulzije

Nanoemulzije (NE) su termodinamički nestabilne koloidne disperzije nanometarskih dimenzija u kojima je jedna ili više tečnih faza dispergovana u drugoj tečnoj fazi sa kojom se ne mešaju (Klang i Valenta, 2011). U skladu sa definicijom nanomaterijala od strane međunarodne organizacije za standardizaciju (engl. *International Standardization Organisation*, ISO), prema kojoj su nanomaterijali svi materijali koji imaju spoljašnju dimenziju, unutrašnju strukturu ili površinsku strukturu u rasponu od 1 do 100 nm, termin nanoemulzije je u početku bio korišćen za izotropne, translucetne koloidne disperzije kod kojih je veličina kapi unutrašnje faze manja od 100 nm (Mason i sar., 2007). Međutim, vremenom je ovaj termin sve više počeo da se koristi i za mlečno bele, metastabilne emulzije kod kojih je veličina kapi unutrašnje faze manja od 1000 nm, a najčešće manja od 500 nm (Aboofazeli, 2010; Klang i Valenta, 2011).

Slično kao i kod (makro)emulzija, u zavisnosti od udela masne faze, vodene faze i surfaktanata, hemijske strukture ulja i surfaktanata, kao i uslova tokom izrade, mogu se razlikovati U/V nanoemulzije, kod kojih su kapi masne faze okružene surfaktantima i dispergovane u vodenoj fazi, V/U nanoemulzije, kod kojih su kapi vodene faze okružene slojem surfaktanta i dispergovane u masnoj fazi (Klang i Valenta, 2011). Normalno, faza koja je prisutna u većem udelu teži da postane spoljašnja, kontinuirana faza. Dodatno, korišćenje hidrofilnih surfaktanata favorizuje nastanak U/V nanoemulzija, dok liposolubilni surfaktanti teže formiranju V/U nanoemulzija. Imajući u vidu da polarni region surfaktanata predstavlja bolju barijeru za koalescenciju od ugljovodoničnog, lipofilnog regiona, moguće je napraviti U/V nanoemulzije sa relativno visokim udelom masne faze, dok kod V/U nanoemulzija brže dolazi do inverzije faza usled povećanja udela vodene faze (Singh i sar., 2017). Dodatno, moguće je napraviti i multiple tipove nanoemulzija u kojima je unutrašnja vodena faza dispergovana u uljanoj fazi koja je dispergovana u kontinuiranoj vodenoj fazi, kao na primer V/U/V nanoemulzije (Schwarz i sar., 2012), dok su U/V/U nanoemulzije vrlo retke.

Za razliku od mikroemulzija koje su termodinamički stabilne, nanoemulzije su kinetički stabilizovane korišćenjem surfaktanata, polimera ili drugih stabilišućih agenasa. Kinetičkom stabilizacijom ovih sistema moguće je poboljšati njihovu stabilnost, ali ipak tokom dugotrajnog skladištenja nanoemulzija dolazi do narušavanja njihove strukture i razdvajanja masne i vodene faze (Klang i Valenta, 2011). Najčešći vid nestabilnosti koji se javlja kod nanoemulzija je Ostvaldovo sazrevanje, usled koga dolazi do spajanja sitnih kapi unutrašnje faze u krupnije kapi. Osim Ostvaldovog sazrevanja, kod nanoemulzija može doći i do flokulacije i koalescencije, usled kolizije kapi unutrašnje faze, kao i kriminga (raslojavanja), uslovljenog gravitacijom. Ipak, imajući u vidu da do kolizije kapi u nanoemulzijama dolazi prvenstveno usled Braunovog kretanja, jer gravitaciona komponenta mnogo manje utiče na submikronske kapi, ovi procesi se odvijaju mnogo sporije nego kod (makro)emulzija (Nazarzadeh i sar., 2013). Glavni razlog svih ovih tipova nestabilnosti je težnja sistema da smanji dodirnu površinu između faza, kako bi se smanjila ukupna slobodna energija u sistemu. Krajnji rezultat ovih promena jeste potpuno razdvajanje, odnosno separacija faza.

Postoje različite metode za proizvodnju nanoemulzija. Na osnovu količine energije koju je potrebno uložiti u njihovu proizvodnju, ove metode se mogu podeliti na visokoenergetske i niskoenergetske metode. Pod visokoenergetskim metodama za izradu nanoemulzija spadaju homogenizacija pod visokim pritiskom (uz ili bez zagrevanja), mikrofluidizacija i ultrasonifikacija. U svim ovim metodama se koriste uređaji koji konzumiraju veliku količinu energije kako bi napravili disruptivnu silu kojom se postiže smanjenje veličine kapi (Safaya i Rotliwala, 2020). Homogenizatori pod visokim pritiskom su najviše korišćeni u industrijskim postrojenjima, i kod njih se smanjenje kapi pre-emulzije vrši propuštanjem kroz ventile kod kojih postoje disruptivne sile kao što su turbulencija, smicanje i kavitacija. Iako je količina surfaktanata koja je neophodna primenom ovih metoda obično niža, troškovi konzumacije energije kao i mogućnost degradacije termolabilnih supstanci tokom izrade predstavljaju glavne nedostatke ovih metoda (Safaya i Rotliwala, 2020). S druge strane, niskoenergetske metode za izradu nanoemulzija zasnivaju se na fizičkohemijskim svojstvima sistema i ne zahtevaju upotrebu energije i skupih uređaja. Tu spadaju (Safaya i Rotliwala, 2020):

- spontani emulgujući metod, koji se zasniva na brzom prelasku komponenata koje se mešaju sa vodom (rastvarači, surfaktanti, kosurfaktanti) iz organske u vodenu fazu, pri čemu dolazi do značajne turbulencije na površini između faza, usled čega se povećava međufazna površina, što rezultuje spontanom nastankom nanometarskih kapi.

- fazno-inverzni komponentni metod (engl. *Phase inversion composition*, PIC), zasniva se na dobijanju nanoemulzija usled inverzije faza uslovljenih promenom sastava sistema. Zapravo, postepenom dodavanju vode smeši ulja i surfaktanta, najpre nastaje V/U emulzija, a potom, usled dodavanja vode preko takozvane tačke inverzije, dolazi do nastanka U/V nanoemulzija.

- fazno-inverzni temperaturni metod, (engl. *Phase inversion temperature*, PIT), zasniva se na dobijanju nanoemulzija usled inverzije faza uslovljenih promenom temperature sistema. Naime, surfaktant, masna i vodena faza se mešaju i postepeno zagrevaju do temperature inverzije faza, nakon čega se sistem naglo hladi, pri čemu dolazi do nastanka nanoemulzija. Posebno stabilne nanoemulzije mogu da se dobiju korišćenjem nejonskih surfaktanata čija se geometrija menja sa promenom temperature.

- metod razblaživanja mikroemulzija, kod koga se prethodno pripremljena U/V mikroemulzija naglo razblažuje velikom količinom vode, usled čega se smanjuje koncentracija surfaktanata odgovornih za termodinamičku stabilnost i može doći do nastanka nanoemulzija.

- emulzifikacija D faze, najmanje korišćeni metod koji podrazumeva mešanje surfaktanta, ulja, poliola i male količine vode, nakon čega se u sistem uvodi još vode i dolazi do formiranja U/V nanoemulzija.

1.5.3 Lipidne nanočestice

1.5.3.1 Čvrste lipidne nanočestice

Početak devedesetih godina XX veka, u cilju dobijanja novih nosača koji mogu da zaštite lekovitu supstancu od hemijske degradacije, kao i da omoguće veću fleksibilnost u moduliranju/kontrolisanju njenog oslobađanja iz nosača, a da se pritom izrađuju korišćenjem tolerabilnih ekscipijenasa i tehnika koje se lako mogu unaprediti sa laboratorijskog na industrijski nivo, razvijene su čvrste lipidne nanočestice (engl. *Solid lipid nanoparticles*, SLN (Müller i sar., 2002)). Naime, SLN su dobijene inovativnom zamenom tečnog lipida (ulja) u nanoemulzijama čvrstim lipidom, to jest lipidom koji je u čvrstom agregatnom stanju na sobnoj temperaturi i telesnoj temperaturi. Veličina ovih čestica može biti između 40 nm i 1000 nm (Pardeike i sar., 2009).

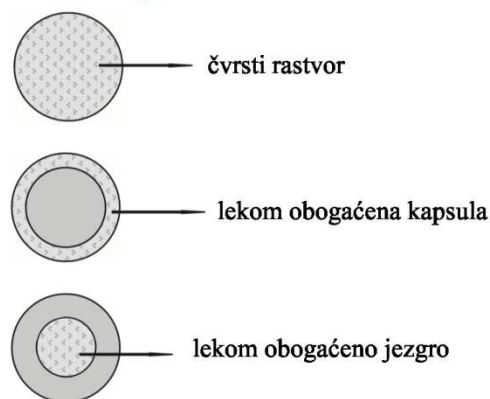
Danas postoje različite tehnike za izradu SLN kao što su: homogenizacija pod visokim pritiskom, ultrasonifikacija, mikroemulziona tehnika, tehnika primene superkričnog fluida, metoda evaporacije rastvarača, višestruki emulzioni metod, itd. (Das i Chaudhury, 2010; Ezzati Nazhad Dolatabadi i sar.; Mishra i sar., 2018). Ipak, tehnika izrade SLN korišćenjem homogenizatora pod visokim pritiskom smatra se najzastupljenijom. Homogenizacija pod visokim pritiskom može se sprovesti uz zagrevanje ili bez zagrevanja. U oba slučaja, aktivni princip se najpre mora rastvoriti ili dispergovati u otopljenom čvrstom lipidu. Dobijenoj smeši se kod homogenizacije pod visokim pritiskom uz zagrevanje dodaje zagrejeni vodeni rastvor surfaktanata uz intenzivno mešanje. Dobijena preemulzija se potom homogenizuje primenom visokog pritiska (obično 500 bara) tokom nekoliko ciklusa homogenizacije, a potom se dobijena nanoemulzija ohladi do sobne temperature, pri čemu dolazi do formiranja čvrstih lipidnih nanočestica. Budući da je vreme izlaganja povišenoj temperaturi relativno kratko, ova tehnika se može primeniti i prilikom izrade SLN sa aktivnim principima koje su umereno osetljive na zagrevanje (Müller i sar., 2002).

Tehnika homogenizacije pod visokim pritiskom bez zagrevanja zasniva se na sličnom principu, s tom razlikom što se otopljena smeša lipida i aktivnih principa najpre ohladi, a zatim se, nakon očvršćavanja, čvrsta masa usitnjava kako bi se dobile lipidne mikročestice. Ove čvrste mikročestice se disperguju u hladnom rastvoru surfaktanata, a potom se dobijena suspenzija homogenizuje pod visokim pritiskom pri čemu se mikročestice usitnjavaju do nivoa nanočestica. Ova tehnika pogodnija je prilikom izrade čvrstih lipidnih nanočestica sa termolabilnim aktivnim supstancama, kao i hidrofilnim aktivnim supstancama koji u slučaju povišene temperature mogu intenzivnije difundovati iz nanočestica u spoljašnju, vodenu fazu (Uner i Yener, 2007). Korišćenjem liofilizacije ili tehnike sušenja raspršivanjem moguće je vodene disperzije SLN prevesti u praškove, čime se dodatno može poboljšati stabilnost ovih nosača.

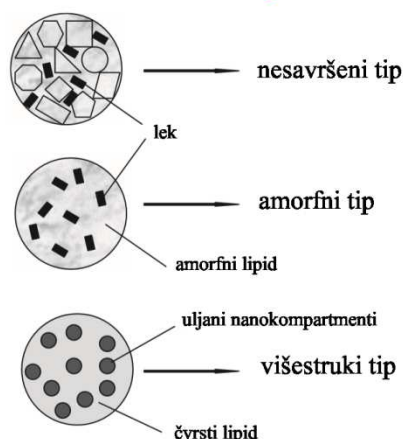
Stepen inkorporacije lekovite supstance u čvrste lipidne nanočestice zavisi od rastvorljivosti lekovite supstance u otopljenom lipidu, stepena mešanja rastopljene lekovite supstance sa rastopljenim lipidom, hemijske i fizičke strukture čvrstog lipidnog matriksa, kao i polimorfnog stanja lipidnog matriksa (Müller i sar., 2002). Lokalizacija lekovite supstance u SLN se može opisati sledećim modelima (Slika 1-10):

- model čvrstog rastvora, u kome je lekovita supstanca potpuno rastvorena u čvrstom lipidnom matriksu (molekulska disperzija)
- lekom obogaćena kapsula, kod koje je lekovita supstanca pretežno zastupljena u spoljašnjem omotaču nanočestice
- lekom obogaćeno jezgro, kod kojeg je lekovita supstanca skoncentrisana u jezgru nanočestice.

Čvrste lipidne nanočestice



Nanostrukturirani lipidni nosači



Slika 1-10 Modeli inkorporiranja lekovite supstance u čvrste lipidne nanočestice (levo) i tipovi nanostrukturiranih lipidnih čestica (desno), Preuzeto i prelagodeno na osnovu reference Uner i Yener, 2007.

Glavni nedostaci čvrstih lipidnih nanočestica su nizak kapacitet inkorporiranja lekovite supstance, kao i ekspulzija aktivne supstance tokom skladištenja. Naime, tokom skladištenja prve generacije SLN dolazi do postepene transformacije kristalne rešetke čvrstog lipida iz modifikacije sa većim energetske sadržajem (α i β') u modifikaciju sa nižim energetske sadržajem (β), koja je kompaktnija i ima smanjen broj nesavršenosti u kristalnoj rešetci (Müller i sar., 2002). Usled ove transformacije dolazi do ekspulzije lekovite supstance, koja je često inkorporirana upravo u poljima nesavršenosti kristalne rešetke.

1.5.3.2 Nanostrukturirane lipidne čestice

Nanostrukturirane lipidne čestice, odnosno nanostrukturirani lipidni nosači (engl. *Nanostructured lipid carriers*, NLC) pripadaju drugoj generaciji čvrstih lipidnih nanočestica, koja je razvijena u cilju prevazilaženja problema povezanih sa prvom generacijom SLN. Naime, lipidna faza SLN sastoji se samo od čvrstih lipida, dok lipidna faza NLC sadrži mešavinu čvrstih i tečnih lipida u različitim odnosima, koja je čvrsta na telesnoj i sobnoj temperaturi.

Dodavanjem tečnog lipida čvrstom lipidu, nakon hlađenja dolazi do inkorporiranja tečnog lipida u kristalnu rešetku čvrste smeše, što povećava broj regiona sa nesavršenom kristalnom rešetkom, u kojima veća količina aktivne supstance može da se inkorporira, pri čemu je rizik od ekspulzije supstance tokom skladištenja umanjen (Beloqui i sar., 2016; Montenegro i sar., 2016; Müller i sar., 2002).

Postoje tri tipa NLC (Slika 1-10) (Müller i sar., 2002):

- nesavršeni tip, koji se sastoji od strukturno različitih lipida (gliceridi koji u svojoj strukturi sadrže veoma različite masne kiseline), pri čemu se, usled prisustva male količine tečnog lipida, javljaju regioni nesavršenosti unutar kristalne strukture nanočestica;
- amorfni tip, kod kog se lipidni matriks nalazi u čvrstom, ali amorfnom stanju, ne u kristalnom stanju;
- višestruki (multipli) tip, u kome čvrsti lipidni matriks sadrži nanokompartimente koji su ispunjeni tečnim lipidom.

Višestruki tip nanostrukturiranih lipidnih nanočestica je posebno zanimljiv budući da se dobija kada se koriste veće količine tečnog lipida nego uobičajeno, kao i zato što značajno može da olakša inkorporiranje lekovite supstance i smanji njenu ekspulziju, ukoliko se kao tečan lipid odabere ekscipijens u kome se lekovita suspanca dobro rastvara.

1.6 Primena mikroemulzija za dermalnu isporuku lekova

Mikroemulzije su intenzivno istraživane u pogledu dermalne i transdermalne isporuke lekovitih supstanci. Imajući u vidu to da je za njihovu izradu često neophodno korišćenje relativno velikih količina surfaktanata i kosurfaktanata, koji su obično i pojačivači penetracije, nije začuđujuće to što veliki broj radova ukazuje na poboljšanu penetraciju i permeaciju lekovitih supstanci njihovom primenom. Ipak, izgleda kao da poboljšanje penetracije i permeacije nije u direktnoj korelaciji sa količinom surfaktanata u mikroemulzijama, s obzirom na to da postoje studije koje ukazuju na to da povećanje koncentracije surfaktanata ne dovodi uvek do povećanja brzine penetracije i permeacije (Heuschkel i sar., 2008).

Iako detaljni mehanizami isporuke lekovitih supstanci primenom mikroemulzija još uvek nisu razjašnjeni, smatra se da postoji više faktora koji zajednički doprinose tome da se mikroemulzije smatraju veoma obećavajućim nosačima za dermalnu i transdermalnu isporuku lekova (Lopes, 2014). Najpre, od velike važnosti je visoki kapacitet za solubilizaciju kako lipofilnih, tako i hidrofилnih lekovitih supstanci, pogotovu ukoliko ona ispoljava slabu rastvorljivost. Održavanje lekovite supstance u rastvornom obliku omogućava bolju penetraciju, a i neophodno je za ispoljavanje farmakološkog efekta. Takođe, povećanjem koncentracije lekovite supstance u nosaču povećava se koncentracioni gradijent iz nosača ka koži, što je glavna pokretačka sila za proces difuzije (Heuschkel i sar., 2008). Ipak, rezultati pojedinih studija ukazuju na to da rastvorljivost lekovitih supstanci u uljima koja su odabrana za izradu mikroemulzija nije uvek u korelaciji sa dobijenim vrednostima permeacionog fluksa, odnosno, mikroemulzija sa uljanom fazom koja pokazuje najveću rastvorljivost lekovite supstance nije nužno ispoljila i najveći permeacioni fluks (Zhang i Michniak-Kohn, 2011).

Dalje, kao što je ranije pomenuto, prisutni surfaktanti, kosurfaktanti i uljana faza mogu da interaguju sa lipidnim matriksom *stratum corneum*-a i učine ga fluidnijim i propustljivijim za penetraciju supstanci (Ita, 2016). Osim toga, komponente mikroemulzija koje su penetrirale u kožu mogu da osiguraju povećanu rastvorljivost lekovitih supstanci u koži, pri čemu se povećava particioni koeficijent lekovite supstance između kože i nosača (Lopes, 2014). Pokazano je i to da povećanje masenog udela uljane faze, pri održavanju konstantnog masenog udela vodene faze, takođe dovodi do poboljšanog permeacionog potencijala mikroemulzija (Zhang i Michniak-Kohn, 2011).

Takođe, imajući u vidu unutrašnju strukturu mikroemulzija (pogotovu malu dimenziju kapi unutrašnje faze kod U/V i V/U mikroemulzija), može se zaključiti to da one imaju veliku aktivnu površinu koja omogućava bolju difuziju lekovitih supstanci (Lopes, 2014). Dodatno, mikroemulzije mogu da povećaju hidrataciju kože, što takođe doprinosi poboljšanoj penetraciji (Hathout i sar., 2010). Pokazano je da unutrašnja mikrostruktura ovih sistema može u različitoj meri da utiče na dermalnu isporuku, pri čemu su U/V mikroemulzije ispoljile veću količinu aktivne supstance u dermisu u poređenju i sa bikontinuiranim i sa V/U mikroemulzijama (Zhang i Michniak-Kohn, 2011; Zhang i Michniak-Kohn, 2018). Ovo je objašnjeno relativno većim sadržajem vode, a uticaj mikrostrukture imao je sličan, ali još izraženiji efekat na poboljšanu transdermalnu isporuku aktivne supstance (Zhang i Michniak-Kohn, 2018).

Na kraju, nakon primene mikroemulzija na koži može da dođe do fazne tranzicije i nastajanja supersaturisanih sistema, koji imaju veliku termodinamičku aktivnost, čime se dodatno poboljšava penetracija lekovitih supstanci (Hathout i Elshafeey, 2012).

Kombinacija ovih mehanizama najverovatnije je odgovorna za generalno poboljšanu penetraciju i permeaciju hidrofилnih i lipofilnih supstanci u kožu. Brojna istraživanja novijih datuma takođe su demonstrirala značaj mikroemulzija u dermalnoj/transdermalnoj isporuci različitih supstanci kao što su aceklofenak (Todosijević i sar., 2015), aciklovir (Kaur i sar., 2017), klotrimazol (Zhang i Michniak-Kohn, 2018), lidokain (Wang i sar., 2019), finasterid (Mohammad Soleymani i Salimi, 2019), fosfolipaza A2 u alergen specifičnoj imunoterapiji (Kiselmann i sar., 2018), 5-fluorouracil (Kumar i Sinha, 2015), terkonazol (Talaat i sar., 2019), itd.

1.7 Primena nanoemulzija za dermalnu isporuku lekova

Iako su nanoemulzije značajni nosači za parenteralnu isporuku lekovitih supstanci, različita istraživanja bavila su se ispitivanjem korišćenja nanoemulzija u dermalnoj i transdermalnoj isporuci lekovitih supstanci, pri čemu su nanoemulzije bile superiornije u poređenju sa konvencionalnim farmaceutskim oblicima. Iako detaljni mehanizmi ove poboljšane isporuke još uvek nisu razjašnjeni, smatra se da nanoemulzije ipak ne mogu da penetriraju i permeiraju kroz kožu intaktne, već na različite načine omogućavaju prolazak lekovite supstance (Klang i sar., 2015).

Nanoemulzije u svojoj strukturi sadrže surfaktante i kosurfaktante koji mogu da se ponašaju kao pojačivači penetracije i da se inkorporiraju u lipidni matriks *stratum corneum*-a čineći ga fluidnijim i propustljivijim za penetraciju supstanci. Osim toga, ovi ekscipijensi mogu da poboljšaju rastvorljivost lekovite supstance u *stratum corneum*-u, čime se povećava particioni koeficijent između nosača i koža, i na taj način dodatno omogućava poboljšana dermalna isporuka (Abd i sar., 2016).

S druge strane, poboljšana penetracija može biti uzrokovana i povećanom okluzijom kože. Naime, Zhou i saradnici (2010) pokazali su da je primena nanoemulzija dovela do poboljšane hidratacije kože. Imajući u vidu i to da nanoemulzije poseduju veoma malu veličinu kapi unutrašnje faze i time veliku aktivnu površinu, nakon njihovog nanošenja dolazi do intenzivne adhezije kapi nanoemulzija za kožu i formiranja gustog lipidnog filma. Ovaj efekat dodatno se pojačava usled isparavanja vodene faze iz formulacija. Nastali lipidni film dovodi do okluzije kože, čime se povećava hidratacija kože i olakšava penetracija aktivnih supstanci.

Takođe, naelektrisanje kapi unutrašnje faze može imati značajan uticaj na poboljšanu penetraciju lekovite supstance iz ovih nosača. Zapravo, primećeno je da nanoemulzije koje imaju pozitivne vrednosti zeta potencijala mogu da dovedu do bolje dermalne isporuke lekovite supstance od nanoemulzija sa negativnom vrednošću zeta potencijala. Verovatni uzrok ovome je interakcija pozitivno naelektrisanih kapi nanoemulzija sa negativno naelektrisanim proteinima u korneocitima (Baspinar i Borchert, 2012).

Dalje, bolja penetracija lekovite supstance u kožu može biti posledica intenzivnije isporuke ovih nosača u folikule dlake, gde može doći do njihove akumulacije i postepene difuzije u dublje slojeve kože (Klang i sar., 2015). Naime, Abd i saradnici (2018) ispitivali su učešće transfolikularnog transporta u poboljšanoj isporuci kafeina, kao hidrofилne lekovite supstance. Oni su najpre razvili metod prema kome mogu selektivno da otvaraju i blokiraju folikule dlaka, čime je moguće steći uvid u ukupnu permeaciju lekovitih supstanci kada su folikuli dlaka otvoreni, odnosno uvid u permeaciju lekovite supstance do koje dolazi isključivo intercelularnim i intracelularnim putem, kada su folikuli dlaka blokirani. Rezultati njihovog ispitivanja ukazuju na veliki doprinos transfolikularnog puta u permeaciji kofeina kroz kožu kada su folikuli dlaka otvoreni, pri čemu je upotreba nanoemulzija značajno povećala doprinos transfolikularnog puta u poređenju sa kontrolnim vodenim rastvorom kofeina. Ipak, budući da je količina kofeina zadržana u *stratum corneum*-u značajno veća od količine prisutne u folikulima dlaka, zaključeno je da je penetracija kroz *stratum corneum* dominantan put isporuke ove model lekovite supstance. Svakako, nanoemulzije su značajno poboljšale i penetraciju kofeina kroz *stratum corneum* i njegovu transfolikularnu isporuku. Ista grupa istraživača uočila je veću količinu minoksidila u folikulima dlake kada je korišćena nanoemulzija sa oleinskom kiselinom, dok je nanoemulzija sa eukaliptolom ispoljila veće zadržavanje minoksidila u *stratum corneum*-u (Abd i sar., 2018b), što je dovedeno u vezu sa rastvorljivošću minoksidila u ovim nosačima i interakciji nosača sa sebumom u folikulima dlaka. Ovo dodatno ukazuje na značaj sastava formulacije kada je u pitanju penetracija lekovitih supstanci iz koloidnih nosača.

Neki od primera lekovitih supstanci za koje je takođe pokazana poboljšana dermalna/transdermalna isporuka primenom nanoemulzija su: aceklofenak (Isailović i sar., 2016), meloksikam, (Khurana i sar., 2013), ropinirol (Azeem i sar., 2009), 8-metoksipsoralen (Oliveira i sar., 2018), progesteron (Klang i sar., 2010), fluvastatin (Kaur i Ajitha, 2019), klotrimazol (Soriano-Ruiz i sar., 2019), itd.

1.8 Primena lipidnih nanočestica za dermalnu isporuku lekova

Višegodišnja istraživanja sprovedena su sa ciljem prepoznavanja mehanizama dejstva kojima lipidne nanočestice mogu da poboljšaju dermalnu isporuku lekovitih supstanci, ali i dalje ne postoji konsenzus u naučnoj zajednici oko toga da li i u kojoj meri su lipidne nanočestice sposobne da prodru do vijabilnog epidermisa (Patzelt i sar., 2017). Iako je uočeno da određena količina lipidnih nanočestica može da prodre do dermisa u slučaju kada je integritet kožne barijere narušen, nakon topikalne primene ovih čestica na zdravoj koži uočeno je njihovo prisustvo samo u gornjim delovima *stratum corneum*-a, ali ne i u ostatku epidermisa i dermisa (Rancan i sar., 2012).

Slično tome, Jensen i saradnici (2011) istraživali su mogućnost primene čvrstih lipidnih nanočestica u dermalnoj isporuci betametazon-17-valerata korišćenjem intaktne kože uha svinje ili kože uha svinje kod koje je integritet kožne barijere narušen uklanjanjem slojeva *stratum corneum*-a metodom sa trakama. Njihovi rezultati ukazuju na to da su kod oba tipa kože lipidi iz nosača dominantno ostali na površini kože ili u *stratum corneum*-u, dok je količina aktivne supstance u oba tipa kože nakon tretmana nanočesticama bila značajno veća u poređenju sa referentnom mašću. Dalje, uočeno je to da su nanočestice omogućile formiranje rezervoara aktivne supstance, i to dominantno u *stratum corneum*-u, verovatno usled velike aktivne površine i izražene sposobnosti adhezije za kožu. Dodatno, ispostavilo se da je polarnost korišćenih lipida u izradi nanočestica (distearat, tripalmitat, cetilpalmitat) uticao kako na veličinu čestica i efikasnost inkorporacije lekovite supstance, tako i na količinu aktivne supstance u koži, pri čemu je upotreba distearata, u kome se betametazon-17-valerat najbolje rastvara, dovela do najvećeg zadržavanja aktivne supstance u *stratum corneum*-u i epidermisu, dok je niža koncentracija supstance permeirala u akceptorski medijum.

Jedan od glavnih razloga zbog kojih čvrste lipidne nanočestice dovode do poboljšane dermalne isporuke lekovitih supstanci jeste njihova mala veličina, zbog koje, nakon dermalne primene, dolazi do njihove adhezije za lipidni film *stratum corneum*-a, čime se postiže intenzivna okluzija kože (Montenegro i sar., 2016). Okluzija kože sprečava gubitak vode i posledično dovodi do povećane hidratacije kože, koja je jedan od važnih faktora prilikom dermalne isporuke lekova. Međutim, pokazano je da lipidni nosači u različitoj meri mogu da dovedu do okluzije kože, pri čemu je u *in vitro* studijama određivanja okluzionog faktora i u *in vivo* studijama ispitivanja hidratacije kože uočeno to da do najveće okluzije i posledično najveće hidratacije kože dovodi primena čvrstih lipidnih nanočestica, zatim nanostrukturiranih lipidnih čestica, a najmanje upotreba nanoemulzija (Montenegro i sar., 2017). Takođe, uočeno je da sastav nanostrukturiranih lipidnih čestica dosta može da utiče na okluziju, pri čemu je povećani sadržaj tečnog lipida u čvrstom lipidnom matriksu doveo do smanjene okluzije kože, što za posledicu može imati smanjenu dermalnu isporuku lekova (Teeranachaiidekul i sar., 2008). Slično tome, veličina čestica takođe doprinosi povećanoj okluziji, pri čemu smanjenje veličine čestica dovodi do povećanja okluzije kože (Zhao i sar., 2016).

Vrlo je važno naglasiti i to da se folikularni put isporuke lekovitih supstanci smatra sve više značajnim kada je u pitanju primena lipidnih nanočestica (Lademann i sar., 2007). Naime, Patzelt i saradnici (2017) su istakli da nanočestice mogu biti vrlo korisne u dermalnoj isporuci lekova ukoliko mogu da isporuče lekovitu supstancu u određeno vreme i na određeno mesto unutar folikula dlake, odakle ona može da se oslobodi iz nosača i penetrira u okolno tkivo. Dodatno je pokazano da fiziološko pokretanje dlaka koja se dešava *in vivo*, u značajnoj meri poboljšava transfolikularnu isporuku lipidnih nanočestica (Radtke i sar., 2017).

Još jedan važan aspekt dermalne isporuke lekova primenom lipidnih nanočestica je i mogućnost njihove kontrolisane/produžene isporuke usled prisustva čvrstog lipidnog matriksa. U *in vitro* studijama permeacije kroz humani *stratum corneum* i epidermis, kao i *in vivo* studijama na miševima, primena nanostrukturiranih lipidnih čestica omogućila je formiranje rezervoara benzokaina i lidokaina u koži, kao i produženo anestetičko dejstvo (Puglia i sar., 2011).

Prednost korišćenja lipidnih nanočestica u poređenju sa mikroemulzijama i nanoemulzijama može biti targetovana dermalna isporuka lekovitih supstanci, odnosno smanjenje sistemskih

neželjenih efekata usled resorpcije aktivne supstance. Naime, formulisanje čvrstih lipidnih čestica sa izotretinoinom nije dovelo do povećanja u količini aktivne supstance koja je zadržana u koži nakon osmočasovne studije permeacije, ali je, u poređenju sa referentnom tinkturom, dobijena značajno manja količina aktivne supstance u akceptorskom medijumu, što ukazuje na ciljanu isporuku supstance u koži primenom lipidnih nanočestica (Liu i sar., 2007).

Lipidne nanočestice su se pokazale efikasnim u dermalnoj isporuci brojnih aktivnih supstanci, kao što su aciklovir (Charoenputtakun i sar., 2015), amfotericin B (Butani i sar., 2016), ciklosporin i kalcipotriol (Arora i sar., 2017), doksorubicin (Tupal i sar., 2016), metronidazol (Shinde i sar., 2019), kvercetin i resveratrol (Imran i sar., 2020), spironolakton (Shamma i Aburahma, 2014), rekombinantni humani epidermalni faktor rasta (Gainza i sar., 2015), itd.

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Istraživanja sprovedena u ovoj doktorskoj disertaciji su kao opšti cilj imala formulacioni dizajn i pretklinički razvoj naprednih nanonosača stabilizovanih lecitinom, surfaktantom koji je zbog svoje biokompatibilnosti, biodegradabilnosti i generalno bezbednosti izuzetno atraktivan ekscipijens za razvoj dermalnih formulacija. Imajući u vidu veliku brojnost i strukturnu raznovrsnost nosača nano-dimenzije i/ili nano-strukture, fokus istraživanja stavljen je na optimizaciju, sveobuhvatnu fizičko-hemijsku i biofarmaceutsku karakterizaciju U/V mikroemulzija, bikontinuiranih mikroemulzija, U/V nanoemulzija i nanostrukturiranih lipidnih čestica za dermalnu isporuku takrolimusa. Dodatno, cilj ove doktorske disertacije je i međusobno poređenje ovih strukturno različitih nanonosača, kao i procena efikasnosti dermalne isporuke takrolimusa iz ovih naprednih nosača i iz referentne masti, kao jedinog farmaceutskog oblika sa takrolimusom koji je prisutan na svetskom tržištu.

Prva faza istraživanja je za cilj imala detaljni pregled literature, kao i preliminarne eksperimente u cilju odabira adekvatnih ekscipijenasa pogodnih za razvoj mikroemulzija zasnovanih na soja lecitinu kao biokompatibilnom i biodegradabilnom surfaktantu. Iako su određeni podaci o formulacijama mikroemulzija zasnovanih na lecitinu dostupni u literaturi, uočena je potreba za sprovođenjem komparativnog ispitivanja koje bi pružilo detaljniji uvid u mogućnost nastajanja mikroemulzija zasnovanih na lecitinu korišćenjem etanola, izopropanola ili propilenglikola kao alternativnih kosurfaktanata iz grupe kratkolančanih alkohola i masnim fazama/uljima koja sadrže ugljovodonične lance srednje dužine (propilenglikol monokaprilat ili kaprilno-kaprinski triglicerid). Stoga je ključni cilj ove faze ispitivanja bio konstrukcija pseudoternarnih faznih dijagrama ulje/lecitin-kosurfaktant/vodena faza koji grafički prikazuju regione u kojima dolazi do formiranja mikroemulzija, kao i procena efekta navedenih kosurfaktanata i ulja na mogućnost formiranja različitih tipova mikroemulzija, kao i mikroemulzija sa što većim sadržajem vode.

Druga faza istraživanja za cilj je imala, najpre, odabir odgovarajućih ekscipijenasa, a potom optimizaciju i razvoj nanostrukturiranih lipidnih čestica korišćenjem soja lecitina kao surfaktanta, glicerilpalmitostearata (Precirol® ATO 5) kao čvrstog lipida i propilenglikol monokaprilata (Capryol® 90) kao tečnog lipida, upotrebom homogenizacije pod visokim pritiskom, uz zagrevanje. Naime, suštinski cilj ove faze ispitivanja je bio identifikacija kritičnih formulacionih i procesnih varijabli koje ispoljavaju kritični efekat na fizičko-hemijske karakteristike i preliminarnu stabilnost dobijenih formulacija. Dodatno, važni cilj ove faze ispitivanja bio je provera mogućnosti formiranja nanoemulzija zamenom smeše čvrstog i tečnog lipida, prisutne kod nanostrukturiranih čestica, samo tečnim lipidom (uljem), a korišćenjem istih ili sličnih eksperimentalnih uslova kao u izradi nanostrukturiranih lipidnih čestica.

Cilj treće faze istraživanja bio je detaljna fizičko-hemijska karakterizacija odabranih U/V mikroemulzija, bikontinuiranih mikroemulzija, U/V nanoemulzija i nanostrukturiranih lipidnih čestica, njihovo međusobno poređenje i ispitivanje stabilnosti tokom skladištenja. Mikroemulzione formulacije podvrgnute su sveobuhvatnoj strukturnoj karakterizaciji (studije provodljivosti, merenje pH, viskoziteta, primena ftonske korelacione spektroskopije, diferencijalne skenirajuće kalorimetrije, elektronske paramagnetne rezonance), dok su nanoemulzije i nanostrukturirane lipidne čestice okarakterisane u pogledu veličine čestica i raspodele veličine čestica, zeta potencijala, pH, provodljivosti, viskoziteta, i procene efikasnosti inkorporiranja takrolimusa kao model lekovite supstance.

Imajući u vidu to da mikroemulzije sadrže relativno velike količine surfaktanata i kosurfaktanata u poređenju sa nanostrukturiranim lipidnim česticama i nanoemulzijama, cilj četvrte faze ispitivanja je bio proceniti bezbednosni profil/iritacioni potencijal razvijenih U/V mikroemulzija i bikontinuiranih mikroemulzija bez inkorporirane lekovite supstance u *in vivo* studijama na humanim dobrovoljcima. Iako su sve razvijene formulacije u osnovi napravljene korišćenjem biokompatibilnih i bezbednih ekscipijenasa, njihovo kombinovanje, pogotovu u

visokom masenom odnosu, predstavlja određeni rizik od iritacije kože. Stoga, cilj ove faze bio je da se utvrdi preliminarna, teorijska bezbednost ovih formulacija, ili da se eventualno iz daljih ispitivanja isključe sve mikroemulzione formulacije kod kojih bude uočen određeni iritacioni potencijal nakon 24-časovnog tretmana kože zdravih dobrovoljaca, kako bi se u daljim ispitivanjima stavio fokus na formulacije koje su se u preliminarnim studijama pokazale kao bezbedne i neiritabilne.

Cilj poslednje, pete faze, ispitivanja jeste detaljna i sistematična procena dermalne raspoloživosti takrolimusa iz odabranih mikroemulzija, nanoemulzija i nanostrukturiranih lipidnih čestica primenom različitih *in vitro* i *ex vivo* biofarmaceutskih metoda koje su prilagođene specifičnim nanonosacima (*in vitro* liberacija kroz sintetske membrane, *in vitro* studija permeacije kroz kožu uha svinje pune debljine, *in vitro* *tape stripping* i diferencijalni *tape stripping*). Dodatno, cilj ove faze ispitivanja je međusobno poređenje ovih naprednih, strukturno različitih nanonosaca u pogledu isporuke takrolimusa u kožu/kroz kožu i njihova komparacija sa konvencionalnom mašću (Protopic® 0,1 %) kao jedinim farmaceutskim oblikom/preparatom prisutnim na svetskom tržištu za topikalnu primenu takrolimusa. Imajući u vidu to da su vijabilni epidermis i dermis željena mesta dejstva takrolimusa nakon topikalne aplikacije, procena permeacije takrolimusa kroz kožu pune debljine može ukazati na mogući rizik od sistemske resorpcije i posledičnog ispoljavanja neželjenih sistemskih efekata.

3 EKSPERIMENTALNI DEO

3.1 Materijali

Kao model supstanca sa slabom rastvorljivošću, u izradi ove doktorske disertacije korišćen je takrolimus (98 %, Chemicals Inc, Guelph, Canada). Protopic[®] mast, 0,1 % (Astellas Ireland Co. Ltd) odabran je kao referentni preparat za poređenje dermalne raspoloživosti takrolimusa iz razvijenih nanonosača.

U cilju stabilizacije razvijenih nosača primenjivani su lecitin poreklom iz soje (Lipoid S75, fosfolipidi iz soje koji sadrže 70 % fosfatidilholina, Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Nemačka), etoksilovani polisorbit 80 (Sigma–Aldrich Lab. GmbH Nemačka) kao i kratkolančani alkoholi: etanol (ZorkaPharm, Šabac, Srbija), 2-propanol (izopropanol, Fagron, Capelleaan den IJssel, Holandija), propilenglikol (Fagron, Trikala, Greece).

Propilenglikol monokaprilat, tip II (Capryol[®] 90, Gattefosse, Lion, Francuska) i kaprilno kaprinski gliceridi - trigliceridi srednje dužine lanca (Saboderm TCC, Sabo S.p.A., Levate, Italija) korišćeni su kao tečna masna faza/ulje, dok su glicerilpalmitostearat (Precirol[®] ATO 5, Gattefosse, Lion, Francuska), gliceriltrimiristat i gliceriltristearat (Dynasan 114 i Dynasan 118, IOI Oleo GmbH, Hamburg, Nemačka) odabrani kao čvrsti lipidi za izradu nanostrukturiranih lipidnih čestica. Butilovani hidroksitoluen (BHT, Sigma–Aldrich Lab. GmbH Nemačka) primenjivan je kao antioksidans u nanoemulzijama i nanostrukturiranim lipidnim česticama.

Kao spin probe sa nesparenim elektronom, koje su primenjivane u elektron paramagnetnoj rezonantnoj spektroskopiji pri karakterizaciji mikroemulzionih formulacija, korišćene su 5-doksil stearinska kiselina (5-DSA) i 12-doksil stearinska kiselina (12-DSA) proizvođača Sigma-Aldrich, Nemačka.

Visokoprečišćena voda korišćena u svim ispitivanjima dobijena je upotrebom GenPure aparature (TKA Wasseranfertigungs-systeme GmbH, Neiderelbert, Nemačka). Sve ostale hemikalije i reagensi upotrebljeni u eksperimentalnom radu bili su farmakopejskog (Ph. Eur) ili hromatografskog (HPLC) kvaliteta i korišćeni su bez daljeg prečišćavanja.

3.2 Metode

U prvoj fazi istraživanja je sprovedena analiza različitih ekscipijenasa (ulja i kosurfaktanata) u pogledu mogućnosti adekvatne solubilizacije takrolimusa i formiranja mikroemulzija korišćenjem lecitina kao biokompatibilnog, biodegradabilnog i bezbednog surfaktanta. Naime, glavni predmet ove faze istraživanja bila je procena faznog ponašanja pseudoternarnih sistema ulje/lecitin-kosurfaktant/visokoprečišćena voda i mogućnost dobijanja mikroemulzionih oblasti korišćenjem izabranih masnih faza i kosurfaktanata, kao i uticaj ovih ekscipijenasa na formiranje mikroemulzija. Dodatno, sprovedene su studije kojima se može utvrditi tip nastalih mikroemulzija u regionima od interesa na pseudoternarnim faznim dijagramima.

Druga faza istraživanja posvećena je razvoju nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzija kao naprednih koloidnih nosača za takrolimus. Kako bi se odabrali adekvatni ekscipijensi u cilju dobijanja nanostrukturiranih lipidnih nosača koji su stabilni i koji mogu da inkorporiraju model lekovitu supstancu, sprovedene su preliminarne studije odabira čvrstog i tečnog lipida, kao i njihovog međusobnog odnosa. Preliminarne formulacije pripremljene su korišćenjem metode homogenizacije pod visokim pritiskom, uz zagrevanje. Odabrani su odgovarajući formulacioni i procesni parametri koji će biti varirani u cilju procene njihovog efekta na fizičko-hemijske karakteristike i stabilnost nanostrukturiranih lipidnih nosača.

Treća faza ispitivanja obuhvata opsežnu fizičko-hemijsku karakterizaciju odabranih mikroemulzija, nanoemulzija i nanostrukturiranih lipidnih čestica i sprovođenje studija stabilnosti kako bi se identifikovale ključne razlike između razvijenih formulacija. Dodatno je procenjena mogućnost inkorporiranja model lekovite supstance, kao i njen uticaj na osobine samih nosača.

U četvrtoj fazi ispitivanja sprovedena je preliminarna *in vivo* procena bezbednosnog profila / iritacionog potencijala mikroemulzija na humanim dobrovoljcima, budući da one, usled prisusva velike količine surfaktanta i kosurfaktanata, poseduju najveći rizik za iritaciju kože. Kako je takrolimus vrlo potentan imunosupresiv, na ovom nivou istraživanja nije opravdano izlagati humane dobrovoljce dejstvu ovako potentne aktivne supstance. Stoga je *in vivo* procena iritacionog potencijala sprovedena korišćenjem placebo mikroemulzija (formulacija bez inkorporirane lekovite supstance), uz saglasnost lokalnog Etičkog komiteta.

Fokus pete faze ispitivanja jeste upotreba različitih metoda za biofarmaceutsku karakterizaciju razvijenih nosača, kojima se može proceniti dermalna isporuka takrolimusa. Takođe, kako bi se procenila efikasnost dermalne isporuke model lekovite supstance, razvijeni nosači poređeni su međusobno, kao i sa referentnom mašću (Protopic® 0,1%) kao jedinim farmaceutskim oblikom takrolimusa koji je dostupan na tržištu. U cilju ispitivanja kinetike brzine oslobađanja takrolimusa iz formulacija, sprovedeno je *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance iz formulacija korišćenjem Franz-ovih difuzionih ćelija i sintetske membrane kao barijere između donorskog i akceptorskog medijuma. Dalje, kako bi se procenila dermalna isporuka lekovite supstance u kožu uha svinje, korišćene su dve komplemetarne metode: *in vitro* metoda sa trakama ili *in vitro* diferencijalni striping na *ex vivo* modelu uha svinje, kao i *in vitro* permeacija takrolimusa kroz kožu uha svinje pune debljine na Franz-ovim difuzionim ćelijama. Iako su epidermis i dermis glavna mesta dejstva topikalno primenjenog takrolimusa, permeacione studije mogu, pored procene dermalne isporuke takrolimusa, omogućiti uvid u količinu lekovite supstance koja bi potencijalno bila apsorbovana u cirkulaciju i time povećala rizik od sistemskih neželjenih efekata.

Sve korišćene metode detaljno su prikazane u poglavljima koja slede.

3.2.1 Ispitivanje rastvorljivosti takrolimusa

U cilju odabira ekscipijenasas koji bi potencijalno omogućili zadovoljavajuće rastvaranje takrolimusa u krajnjim formulacijama (0,1 %), najpre je odrađen pregled literaturnih podataka o rastvorljivosti takrolimusa u različitim masnim fazama, surfaktantima i vodenim fazama, a potom je eksperimentalno ispitana rastvorljivost takrolimusa u ekscipijensima od interesa za koje nisu pronađeni literaturni podaci, kao što su masne faze Capryol® 90 i Saboderm TCC, smeše surfaktanta i kosurfaktanta lecitin i etanol (1: 1), lecitin i izopropanol (1: 1), kao i smeši vode i propilenglikola (1:1).

Ispitivanje rastvorljivosti takrolimusa rađeno je u triplikatu korišćenjem "*shake flask*" metoda (Patel i sar., 2013). Takrolimus u višku je dodat ekscipijensima/smešama ekscipijenasas od interesa. Uzorci su mešani na vorteksu tokom 24 sata pri temperaturi od $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Nakon toga su uzorci centrifugirani korišćenjem MiniSpin® plus centrifuge (Eppendorf, Nemačka) tokom 10 min na 10.000 obrtaja u minuti. Potom je supernatant filtriran kroz membranski filter veličine pora $0,22 \mu\text{m}$ i koncentracija takrolimusa u odgovarajućim razblaženjima je analizirana korišćenjem metode tečne hromatografije - tandem masene spektrometrije (LC-MS / MS) opisane u poglavlju 3.2.13.

3.2.2 Konstruisanje pseudoternarnih faznih dijagrama

Kako bi se procenilo fazno ponašanje pseudoternarnih faznih dijagrama ulje/surfaktant-kosurfaktant/vodena faza sa ciljem identifikacije mikroemulzionih oblasti, konstruisani su pseudoternarni fazni dijagrami primenom metode titracije vodenom fazom (Todosijević i sar., 2014). Naime, najpre su napravljene smeše surfaktanta (lecitina) i kosurfaktanta (etanola, izopropanola ili propilenglikola) u masenom odnosu 1:1 rastvaranjem lecitina u odgovarajućem kosurfaktantu mešanjem na magnetnoj mešalici na sobnoj temperaturi. Potom je smeša surfaktant-kosurfaktant mešana sa odabranim uljem (propilenglikol monokaprilatom - Capryol® 90 ili kaprilno-kaprinским trigliceridima - Saboderm TCC) u masenim odnosima 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9. Svako od napravljenih smeša postepeno je dodavano po $10 \mu\text{L}$ visokoprečišćene vode, uz intenzivno mešanje uzorka na vorteksu (Vortex mixer ZX Classic, Vicor) nakon svakog

dodavanja. Novonastali sistemi su vizuelno procenjivani i svi uzorci koji su bili tečni, homogeni, transparentni, izotropni i stabilni označeni su kao mikroemulzije.

Dodatno, sistemi Capryol[®] 90/lecitin-etanol i Capryol[®] 90/lecitin-izopropanol titrirani su smešom visokoprečišćene vode i propilenglikola (1:1), kao sekundarnog kosurfaktanta u cilju ispitivanja mogućnosti dobijanja visoko dilutabilnih mikroemulzija i eventualne procene promena u strukturi mikroemulzija pri korišćenju dva kosurfaktanta.

Granice mikroemulzionih oblasti na pseudoternarnim faznim dijagramima su definisane na osnovu najvećeg procenta vodene faze koja je ugrađena u transparentne, izotropne, tečne sisteme, kod kojih bi, usled daljeg dodavanja vode došlo do pojave opalescencije, zamućenja ili nastanka vrlo viskoznih sistema/gela. Granični uzorci su ponovo analizirani nakon 7 dana skladištenja na sobnoj temperaturi kako bi se osigurala ravnoteža u sistemu i utvrdila njihova stabilnost. Dodavanje vode vršeno je i nakon pojave opalescencije/zamućenja/gela u sistemu, u cilju identifikovanja eventualno prisutnih sekundarnih mikroemulzionih oblasti na faznim dijagramima.

3.2.3 Određivanje tipa mikroemulzija

Postepenim dodatkom vodene faze smeši surfaktanta-kosurfaktanta i ulja može doći do promene u unutrašnjoj strukturi mikroemulzija. U regionima sa malim udelom vodene faze može se očekivati nastanak U/V mikroemulzija, koje postepenim dodavanjem vodene faze mogu preći najpre u bikontinuirane, a potom i u V/U mikroemulzije (Klossek i sar., 2013). Budući da su svi tipovi mikroemulzija transparentne, izotropne tečnosti navedene promene u unutrašnjoj strukturi se vizuelno ne mogu uočiti. Zbog toga je neophodno odraditi dodatna ispitivanja, kao što su merenje provodljivosti ili primena diferencijalne skenirajuće kalorimetrije koje indirektno mogu ukazati na unutrašnju strukturu sistema.

3.2.3.1 *Studije provodljivosti mikroemulzionih sistema tokom razblaživanja*

Promene u unutrašnjoj strukturi mikroemulzija mogu se indirektno pratiti merenjem provodljivosti, odnosno promene u provodljivosti spoljašnje, kontinuirane faze. U tu svrhu je najpre potrebno odabrati liniju razblaženja na faznom dijagramu koja omogućavaju formiranje mikroemulzija sa što većim udelom vode, a potom se smeši surfaktant-kosurfaktant/ulje postepeno dodaje vodena faza, nakon čega se prati provodljivost novonastalih mikroemulzija (Klossek i sar., 2013).

Merenja provodljivosti duž odabranih linija razblaženja su izvršena korišćenjem CDM 23 konduktometra (Radiometar, Kopenhagen, Danska) pri temperaturi od $20 \pm 2^\circ\text{C}$, bez dodatka elektrolita s obzirom na to da elektroliti mogu uticati na strukturu mikroemulzija i dovesti do destabilizacije ovih sistema.

3.2.3.2 *Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) tokom hlađenja mikroemulzionih formulacija*

Pored praćenja provodljivosti spoljašnje faze mikroemulzija usled kontinuiranog razblaživanja vodenom fazom, unutrašnja struktura mikroemulzija se može dodatno proceniti primenom DSC tehnike. Naime, termalnom analizom uzoraka mikroemulzija tokom hlađenja može se dobiti uvid u termalno ponašanje vode, odnosno prisustvo vode koja je slobodna ili vezana u sistemu (Podlogar i sar., 2004; Todosijević i sar., 2014).

Odabrani uzorci mikroemulzija i smeše surfaktant-kosurfaktant/ulje su precizno odmereni u aluminijumsku posudu koja je hermetički zatvorena. Prazna aluminijumska posuda je korišćena kao referentni uzorak. Posude su hlađene u rasponu od 25°C do -60°C pri brzini hlađenja od $5^\circ\text{C}/\text{min}$ i konstantnom protoku azota od 50 mL/min koristeći Mettler Toledo DSC 1, STARe sistem (Mettler Toledo AG, Analytical, Švajcarska).

3.2.4 Priprema mikroemulzija

Odabrane mikroemulzije sa pseudoternarnih faznih dijagrama pripremljene su tako što je najpre lecitin rastvoren u odgovarajućoj količini kosurfaktanta (etanola ili izopropanola), potom je dodata uljana faza (Capryol[®] 90) i sistem je mešan tokom 10 minuta na magnetnoj mešalici. Na kraju je dodata odgovarajuća količina vodene faze (visokoprečišćene vode ili smeše visokoprečišćene vode i propilenglikola, 1:1), te su uzorci mešani na magnetnoj mešalici još 5 minuta.

Inkorporacija model lekovite supstance (takrolimusa) u količini od 0,1 % vršena je nakon izrade mikroemulzija uz kontinuirano mešanje tokom 12h, kako bi se osiguralo potpuno rastvaranje takrolimusa.

3.2.5 Razvoj i priprema nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzija

3.2.5.1 Odabir masne faze primenom DSC analize

Kako bi se odabrala čvrsta masna faza za izradu nanostrukturiranih lipidnih čestica, sprovedeno je ispitivanje mogućnosti mešanja propilenglikol monokaprilata (tečnog lipida/ulja) sa sledećim čvrstim lipidima: gliceriltrimiristat - Dynasan[®] 114, gliceriltristearat - Dynasan[®] 118, glicerilpalmitostearat - Precirol[®] ATO 5. U cilju inkorporacije dovoljne količine tečnog lipida koja bi osigurala rastvaranje takrolimusa, napravljene su smeše čvrstog i tečnog lipida u masenom odnosu 6:4, 5:5 i 4:6 mešanjem na magnetnoj mešalici (350 o/min) tokom 30 minuta pri temperaturi od 85°C, koje su potom ostavljene da se ohlade na sobnoj temperaturi. Nakon 24 h vizuelno je procenjena konzistencija dobijenih smeša u cilju uočavanja potencijalnog izdvajanja kapi tečnog lipida, koje bi ukazalo na neadekvatnu mešljivost odabranog čvrstog i tečnog lipida (Cirri i sar., 2018).

Potom, kako bi se detaljnije analizirala promena čvrstog lipidnog matriksa, kao i odabrao optimalni maseni odnos čvrstog i tečnog lipida, odrađeno je ispitivanje promene tačke topljenja odabranih smeša korišćenjem DSC analize (Cirri i sar., 2018). Uzorci smeša Precirol[®] ATO 5 i Capryol[®] 90 (od 9: 1 do 2:8) postepeno su zagrevani sa 20°C na 180°C pri brzini zagrevanja od 10°C/min, koristeći Mettler Toledo DSC 1, STARe sistem (Mettler Toledo AG, Analytical, Švajcarska). Merenja su vršena pod stalnim protokom azota od 50 mL/min.

3.2.5.2 Priprema nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzija

Disperzije nanostrukturiranih lipidnih čestica izrađene su korišćenjem metode homogenizacije pod visokim pritiskom, uz zagrevanje (Kovacevic i sar., 2011). Sve korišćene posude tokom izrade formulacija bile su prekrivene aluminijumskom folijom, kako bi se umanjio uticaj evaporacije vode iz sistema. Najpre su paralelno pripremljene vodena i masna faza; vodena faza, koja se sastoji iz visokoprečišćene vode i hidrofилnog surfaktanta (polisorbat 80), zagrejana je na temperaturi od 85°C uz kontinuirano mešanje. Masnoj fazi, koja se sastojala od odabrane smeše čvrstog i tečnog lipida, dodati su lecitin i butilhidroksitoluen, te je ova smeša zagrejana na temperaturi od 80°C uz kontinuirano mešanje na magnetnoj mešalici. Kada su dostignute odgovarajuće temperature, i celokupna količina lecitina bila rastvorena u masnoj fazi, vodena faza je dodata masnoj fazi, te je izrađena preemulzija intenzivnim mešanjem na rotor-stator homogenizatoru (Ultra-Turrax[®] T25 digital, IKA[®] Werke GmbH & Co. KG, Nemačka), pri brzini od 10 000 o/min u trajanju od 1 min, uz kontinuirano zagrevanje.

Pripremljena preemulzija odmah je podvrgnuta homogenizaciji pod visokim pritiskom, u uređaju EmulsiFlex-C3 (Avestin Inc., Kanada). Kako ne bi došlo do kristalizacije čvrstog lipida tokom homogenizacije, uređaj je prethodno zagrejan propuštanjem visokoprečišćene vode temperature od oko 85°C u trajanju od najmanje sat vremena. Dodatno, deo uređaja u kome se vrši homogenizacija, zagrevan je tokom celog procesa izrade formulacija na temperaturi od 70°C, višoj temperaturi od temperature topljenja čvrstog lipida. Preemulzija je propušćana kroz zagrejani homogenizator diskontinuiranim postupkom, pri pritisku od 800 bar, tokom pet ciklusa

homogenizacije. Dobijene formulacije pakovane su odmah nakon izrade u staklene bočice sa gumenim zatvaračima i aluminijumskim krimp-kapicama, koje osiguravaju dugotrajno skladištenje. Uzorci su ostavljeni da se postepeno ohlade do sobne temperature, pri čemu u nanostrukturiranim lipidnim česticama dolazi do očvršćavanja lipidnog matriksa i formiranja nanočestica. Pojedini procesni parametri koji su varirani pri izradi nanostrukturiranih lipidnih nosača prikazani su u sledećem poglavlju.

S obzirom na to da nanoemulzije ne sadrže čvrst lipid u svojoj formulaciji, teoretski bi bilo moguće izraditi nanoemulzije korišćenjem hladne homogenizacije pod visokim pritiskom, odnosno bez zagrevanja. Međutim, odlučeno je da se nanoemulzije izrade istim postupkom kao i nanostrukturirani lipidni nosači, kako bi se ove formulacije što bolje uporedile međusobno.

Za razliku od mikroemulzija, kod kojih je moguće inkorporirati lekovitu supstancu u unapred pripremljene formulacije, nanostrukturirani lipidni nosači i nanoemulzije zahtevaju inkorporiranje lekovite supstance tokom samog procesa izrade ovih nosača. Stoga su formulacije sa lekovitom supstancom izrađene tako što je takrolimus (0,1 %) rastvoren u masnoj fazi pre njenog mešanja sa vodenom fazom i nastanka preemulzije.

3.2.5.3 *Variranje formulacionih i procesnih parametara u izradi nanostrukturiranih lipidnih čestica*

Kako bi se procenio uticaj različitih formulacionih i procesnih parametara na mogućnost nastanka nanostrukturiranih lipidnih čestica, njihove fizičko-hemijske karakteristike i stabilnosti, pripremljene su različite formulacije u kojima su varirani sledeći formulacioni parametri:

- odnos čvrstog i tečnog lipida u masnoj fazi (6:4, 5:5, 4:6)
- količina ukupne lipidne faze (5 %, 10 %, 15 %)
- ukupna količina surfaktanata u masenom odnosu 1:1 (1 %, 2%, 4%)
- primena samo jednog surfaktanta - lecitina ili polisorbata 80 (1 %).

Dodatno, nakon odabira optimalne formulacije, varirani su sledeći procesni parametri u cilju procene njihovog uticaja:

- broj ciklusa homogenizacije (5 ili 10 ciklusa)
- primenjeni pritisak tokom homogenizacije (500 ili 800 bara)
- temperatura hlađenja nakon homogenizacije (postepeno hlađenje formulacije na sobnoj temperaturi ili brzo hlađenje formulacije u ledenom kupatilu).

3.2.6 **Fizičko-hemijska karakterizacija nosača**

3.2.6.1 *Analiza veličine kapi/čestica i indeks polidisperziteta*

U cilju merenja srednje veličina kapi/čestica (hidrodinamički prosečan prečnik) i raspodela veličine kapi/čestica (indeks polidisperziteta) korišćena je tehnika fotonske korelacione spektroskopije (engl. *Photon Correlation Spectroscopy*, PCS). Osnovni principi PCS tehnike zasnivaju se na merenju stepena fluktuacije intenziteta rasute svetlosti usled Braunovog kretanja kapi/čestica nanometarskih dimenzija u uzorku (Shekunov i sar., 2007). Dobijeni rezultati se softverskim putem prevode u veličinu kapi/čestica korišćenjem Stokes-Einstein jednačine.

Odabrane formulacije U/V mikroemulzija, nanoemulzija i nanostrukturiranih lipidnih čestica su analizirane korišćenjem uređaja Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Velika Britanija) pri temperaturi od 20°C, pod uglom rasipanja svetlosti od 90°, primenom HE-Ne lasera (633nm). Usled odsustva kapljичne strukture u bikontinuiranim formulacijama, ove formulacije nisu analizirane. Kako se struktura mikroemulzija narušava nakon razblaživanja, mikroemulziona formulacije nisu razblaživane pre merenja, dok su nanoemulzije i nanostrukturirane lipidne čestice razblažene visokoprečišćenom vodom 1:100 v/v pre merenja, kako bi se smanjila interakcija kapi/čestica, kao i uticaj gustine i viskoziteta samih formulacija na određivanje veličine kapi/čestica (Klang i Valenta, 2011).

Budući da su rezultati PCS analize izuzetno pouzdani pri određivanju veličine čestica u opsegu od par nanometara do par mikrometara, u cilju ispitivanja mogućeg nastajanja većih kapi/čestica i njihovih agregata kod termodinamički nestabilnih sistema, kao što su nanoemulzije i nanostrukturirani lipidni nosači, korišćena je tehnika statičkog rasipanja svetlosti, poznatija kao laserska difrakcija (LD) (Shekunov i sar., 2007). Osnovni princip LD tehnike zasniva se na tome da usled osvetljavanja čestica dolazi do difrakcije svetlosti i formiranja difrakcionih prstenova, čiji se intenzitet i rastojanje može meriti. Osim difrakcije svetlosti, nakon osvetljavanja čestica dolazi još i do refleksije, prelamanja i apsorpcije svetlosti, što celu analizu čini komplikovanijom. Kako bi se svi ovi fenomeni uzeli u obzir, softver za obradu podataka koristi odgovarajuće jednačine zasnovane na Mie teoriji ili Fraunhoferovoj aproksimaciji, koje omogućavaju prevođenje vrednosti rasejane svetlosti u prečnike analiziranih čestica (Shekunov i sar., 2007).

S obzirom na to da su mikroemulzije termodinamički stabilni sistemi, kao i to da bi prisustvo kapi u ovim sistemima dovelo do pojave opalescencije ili zamućenja uzorka, LD tehnikom su analizirane samo formulacije nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzija. U tu svrhu korišćen je instrument Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd.), a formulacije su analizirane mesec dana nakon izrade. Rezultati su prikazani u vidu prečnika $d(0,1)$, $d(0,5)$ i $d(0,9)$, koji ukazuju na to da 10 %, 50 % i 90 % kapi/čestica ima manji prečnik od izmerene vrednosti, respektivno. Dodatno, izračunati su i zapreminski srednji prečnik $D[4,3]$, površinski srednji prečnik $D[3,2]$ i širina raspodele (span).

3.2.6.2 *Merenje zeta potencijala*

Zeta potencijal je ključni pokazatelj stabilnosti koloidne disperzije. Viša apsolutna vrednost zeta potencijala ukazuje na bolju stabilnost formulacija usled elektrostatičkog odbijanja između čestica (Han i sar., 2008). Posebno je važno meriti zeta potencijal termodinamički nestabilnih nosača, kao što su nanoemulzije i nanostrukturirani lipidni nosači, dok je određivanje zeta potencijala kod mikroemulzija nepotrebno s obzirom na to da su one termodinamički stabilni sistemi, kao i zbog toga što sadrže visoke količine surfaktanata i kosurfaktanta. Takođe, kako bi se dobili pouzdani rezultati, potrebno je razblažiti uzorke pre merenja, što u slučaju mikroemulzija nije moguće uraditi bez rizika od promene ili narušavanja strukture mikroemulzija.

Zeta potencijal odabranih nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzija je određen merenjem elektroforetske pokretljivosti čestica/kapi u električnom polju koristeći Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Velika Britanija). Visokoprečišćena voda sa konstantnom provodljivošću korišćena je za razblaživanje formulacija pre merenja (1: 100 v/v).

3.2.6.3 *Merenje pH i provodljivosti formulacija*

Imajući u vidu planiranu dermalnu primenu formulacija, kao i činjenicu da je takrolimus sklon razgradnji u medijumima pH vrednosti više od 7 (Skak i Hansen 2016), važno je razmotriti pH vrednosti razvijenih formulacija. Pored toga, značajne promene vrednosti pH i provodljivosti tokom skladištenja mogu ukazivati na nestabilnost ovih nosača. pH vrednosti formulacija su izmerene na temperaturi $20 \pm 2^\circ\text{C}$ korišćenjem pH metra HI 9321 (Hanna Instruments Inc., Ann Arbor, Michigan) direktnim uranjanjem staklene elektrode u uzorke. Merenje provodljivosti izvršeno je na $20 \pm 2^\circ\text{C}$ korišćenjem CDM 23 konduktometar (Radiometar, Kopenhagen, Danska) bez dodavanja elektrolita. Prisustvo negativno naelektrisanih fosfolipida i različitih nečistoća u lecitinu obezbedili su naelektrisanje neophodno za merenje provodljivosti.

3.2.6.4 *Reološka analiza*

Reološka svojstva mikroemulzija, nanoemulzija i nanostrukturiranih lipidnih čestica određena su korišćenjem reometra DV-III ULTRA Programmable Rheometer, opremljenog softverom Rheocalc v.4.3 (Brookfield Engineering Laboratories, Middlesboro USA), korišćenjem mernog sistema tipa konus i ploča (engl. *cone and plate*). Svi eksperimenti su izvedeni na 20°C sa brzinom smicanja u opsegu od $375\text{--}1850\text{ s}^{-1}$ i obrnuto. Za poređenje viskoziteta formulacija korišćene su vrednosti prividnog viskoziteta dobijene pri brzini smicanja od 375 s^{-1} .

3.2.6.5 *Efikasnost inkorporacije takrolimusa*

Imajući u vidu to da je jedan od čestih problema u razvoju lipidnih nanočestica zapravo mali kapacitet inkorporacije lekovite supstance, kao i ekspulzija lekovite supstance iz lipidnog matriksa tokom skladištenja (Beloqui i sar., 2016), od velikog značaja je bilo ispitati efikasnost inkorporacije takrolimusa u nanostrukturiranim lipidnim nosačima. Dodatno, paralelno je ispitana i efikasnost inkorporacije takrolimusa u nanoemulzijama, dok kod mikroemulzija to nije neophodno raditi s obzirom na to da one imaju veliki solubilizacioni kapacitet zbog prisustva velike količine surfaktanta i kosurfaktanta.

U cilju određivanja efikasnosti inkorporacije lekovite supstance posebno je razvijen sledeći protokol. Kako bi se odvojila lipidna od vodene faze, najpre je bilo neophodno dodati so (natrijum-hlorid) da bi se narušio zeta potencijal u formulacijama i došlo do destabilizacije koloidnog sistema. Formulacije sa inkorporiranim takrolimusom (PCLP 4:6 TAC i CLP 10 TAC) su mešane sa natrijum-hloridom na vorteksu tokom 30 minuta pri brzini 100 o/min, a potom su uzorci ostavljeni na sobnoj temperaturi preko noći. Sledećeg dana su uzorci ponovo mešani na vorteksu tokom 30 min, a potom centrifugirani na 14500 o/min u trajanju od 1h korišćenjem MiniSpin® plus centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Nakon centrifugiranja, vizuelno je ispitano eventualno prisustvo kristala nerastvorenog takrolimusa ili soli na dnu ependorfica, dok je količina takrolimusa prisutna u vodenoj fazi određena odgovarajućom UPLC-MS/MS metodom opisanom u poglavlju 3.2.13. Efikasnost inkapsulacije (engl. *entrapment efficiency*, EE) je izračunata korišćenjem sledeće jednačine (Date i sar., 2011):

$$EE (\%) = (M_i - M_f) / M_i \times 100 \%$$

pri čemu M_i predstavlja inicijalnu masu lekovite supstance korišćene u izradi formulacija, a M_f je masa slobodnog takrolimusa, koji je rastvoren u vodenoj fazi i/ili prisutan u vidu taloga na dnu ependorfice. Pouzdanost ovog protokola testirana je takozvanom "spiking" tehnikom, odnosno obogaćivanjem placebo formulacija poznatim količinama lekovite supstance.

3.2.6.6 *Polarizaciona mikroskopija*

Polarizaciona mikroskopija korišćena je kako bi se proverilo postojanje anizotropnih sistema prilikom konstruisanja pseudoternarnih faznih dijagrama u razvoju mikroemulzija. Imajući u vidu to da su mikroemulzije transparentne i izotropne tečnosti, svi uzorci koji su pokazivali anizotropiju pod polarizacionim mikroskopom su označeni kao ne-mikroemulzije i nisu uključeni u mikroemulzione regione na pseudoternarnim faznim dijagramima.

Dodatno, polarizaciona mikroskopija je vrlo korisna tehnika kojom se relativno jednostavno može proceniti prisustvo kristala takrolimusa nakon njegove inkorporacije u odabrane formulacije. Stoga, sve formulacije sa lekovitom supstancom i odgovarajuće placebo formulacije analizirane su upotrebom Motic digitalnog mikroskopa DMB3-223ASC i Motic Images Plus v.2.0 softvera (Motic GmbH, Vetzlar, Nemačka) nakon mesec dana čuvanja na sobnoj temperaturi.

3.2.6.7 *Procena fizičkog stanja takrolimusa primenom DSC analize uz zagrevanje*

Kao metoda komplementarna sa tehnikom polarizacione mikroskopije, a u cilju provere prisustva nerastvorenih kristala takrolimusa, formulacije mikroemulzija, nanoemulzija i nanostrukturiranih lipidnih čestica sa lekovitom supstancom analizirane su korišćenjem DSC analize uz zagrevanje. Uzorci sa takrolimusom i odgovarajuće placebo formulacije zagrevane su od 10°C do 200°C sa brzinom grejanja od 10°C/min, kako bi se proverilo prisustvo pika koji potiče od topljenja kristala takrolimusa (Patel i sar., 2013). Merenja su izvedena sa približno 8 mg formulacija, pod stalnim protokom azota od 50 mL/min.

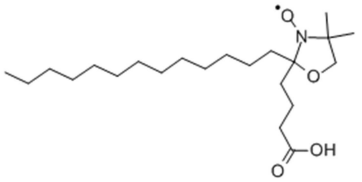
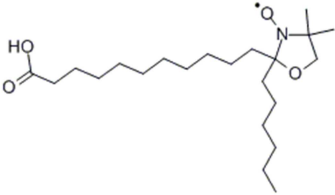
3.2.6.8 *Elektronska paramagnetna rezonantna spektroskopija (EPR)*

EPR tehnika, takođe poznata i kao spektroskopija rezonancije elektronskog spina je spektroskopska tehnika kojom se mogu ispitivati supstance koje poseduju paramagnetni centar, to jest najmanje jedan nespareni elektron u svojoj strukturi. Princip metode sličan je nuklearnoj magnetnoj rezonanciji, sa tom razlikom što je meta pobuđivanja i detekcije u nuklearnoj magnetnoj rezonanciji nukleus atoma, dok se u EPR pobuđuje, meri i karakteriše nespareni elektron i njegovo neposredno okruženje (Pan i Nilges, 2014). Naime, elektroni su naelektrisane čestice koje poseduju intrinzični angularni moment (takozvani elektronski spin) i ponašaju se kao magneti ukoliko nisu spareni. U jakom, permanentnom magnetnom polju vektor elektronskog spina se orijentiše paralelno ili antiparalelno sa vektorom magnetnog polja permanentnog magneta. Paralelno orijentisani elektroni se potom pobuđuju elektromagnetnim talasima iz mikrotalasnog dela spektra, nakon čega se prati i meri intenzitet njihove umiruće struje (eng. *decay current*), koja nastaje usled njihove reorijentacije unutar nametnutog magnetnog polja. Poznavanjem frekvencije posmatranog elektrona i promene u njegovom EPR spektru može se steći uvid u njegovo neposredno hemijsko okruženje.

Kako bi se ispitala fluidnost međupovršinskog filma u odabranim mikroemulzijama, kao i ispitala lokalizacija takrolimusa u mikroemulzijama korišćena je EPR tehnika . Budući da komponente koje ulaze u sastav mikroemulzija ne poseduju paramagnetne centre, tj. nesparene elektrone, neophodno je koristiti eksterne, dobro poznate spin probe sa nesparenim elektronom: 5-doksil stearinska kiselina (5-DSA) i 12-doksil stearinske kiselina (12-DSA). Ove spin probe imaju ambifilne osobine, polarnu glavu sa karboksilnom grupom (-COOH) i nepolarni ugljovodonični rep, i usled toga se inkorporiraju u međupovršinski film između vodene i masne faze. Imajući u vidu različitu lokalizaciju nesparenog elektrona u njihovim strukturama, pri čemu se nespareni elektron u 5-DSA nalazi bliže polarnoj glavi, dok je kod 12-DSA nespareni elektron lokalizovan dublje u nepolarnom ugljovodoničnom lancu (Tabela 3-1), moguće je steći uvid u dinamiku i fluidnost međupovršinskog filma na različitim dubinama (Avramiotis i sar., 2007; Fanun i sar., 2011).

U cilju dobijanja željene koncentracije spin proba u mikroemulzijama, najpre su napravljeni osnovni rastvori spin proba (5-DSA i 12-DSA) u etanolu koncentracije 7,8 mmol/L. Zatim je po 15 μ L rastvora dodato u epruvete nakon čega je izvršena evaporacija etanola primenom komprimovanog vazduha. Nakon evaporacije, u svaku epruvetu je dodato po 1 mL uzorka mikroemulzije. Uzorci su intenzivno mešani na vorteksu i ostavljeni tokom noći u vodenom kupatilu na 25°C. Finalna koncentracija spin proba u svakom uzorku je bila 0,12 mmol/L.

Tabela 3-1 Prikaz spin proba sa nesparenim elektronima koje su korišćene u EPR eksperimentima.

5-doksil stearinska kiselina	
12-doksil stearinska kiselina	

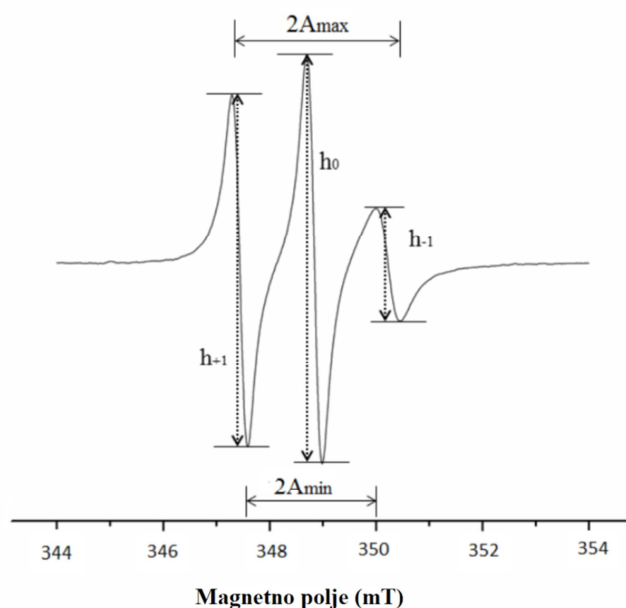
EPR spektri su snimljeni na konstantnoj sobnoj temperaturi (25°C), koristeći Bruker EMX EPR spektrometar koji radi sa mikrotalasnim zračenjem X-trake (mikrotalasne frekvencije u opsegu 8-13 GHz, tipična frekvencija 9,5 GHz). Uzorci su postavljeni u specijalno dizajniranu ravnu ćeliju (WG-813-Q Wilmad, Buena, NJ). Korišćena su sledeća podešavanja instrumenta: centralno polje 0,349 T, opseg skeniranja 0,01 T, prijemnik $5,64 \times 10^3$, vremenska konstanta 5,12 ms, modulacija amplitude 0,4 mT i frekvencija 9,78 GHz. Prikupljanje i analiza podataka obavljena je korišćenjem Bruker WinEPR programa, a eksperimentalni rezultati su analizirani i izraženi kao rotaciono vreme korelacije (τ_R), parametar uređenosti (S) i konstanta hiperfinog cepanja (α'_o).

3.2.6.8.1 Izračunavanje vremena rotacione korelacije, τ_R .

Vreme rotacione korelacije (τ_R) spin proba izračunato je iz EPR spektara koristeći sledeću jednačinu (Kommareddi i sar., 1994):

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

pri čemu h_{+1} , h_o i h_{-1} označavaju amplitude triju hiperfinih linija na EPR spektru, a ΔH_o je širina centralne linije (Slika 3-1). Ova jednačina primenljiva je u regionima brzog pokretanja ($10^{-11} < \tau_R < 3 \times 10^{-9}$ s). Za regione usporenog pokretanja ($\tau_R > 3 \times 10^{-9}$ s) vreme rotacione korelacije izračunava se korišćenjem kompjuterskih simulacija pretpostavljajući prosečna vremena rotacione korelacije. Variranje τ_R vrednosti spin proba ukazuje na njenu ograničenu pokretljivost usled specifičnih interakcija sa neposrednim okruženjem.



Slika 3-1 Šematski prikaz EPR spektra nitroksidnih spin proba sa nesparenim elektronom.

3.2.6.8.2 Izračunavanje parametra uređenosti S.

Parametar uređenosti S daje uvid u orijentaciju spin probe u supramolekularnom okruženju i varira od 0 do 1, pri čemu vrednost $S = 1$ ukazuje na to da se spin proba nalazi u potpuno uređenom stanju, dok vrednost $S = 0$ oslikava potpuno neuređeno, randomizovano stanje. Parametar uređenosti S je definisan sledećom jednačinom (Papadimitriou i sar., 2008):

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

pri čemu A_{\parallel} polovina rastojanja od spoljašnjeg maksimuma hiperfinog cepanja, $2A_{\max}$ (Slika 3-1), a A_{\perp} se računa na osnovu sledećih jednačina:

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

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

gde je A_{\min} jednak polovini rastojanja od unutrašnjeg minimuma hiperfinog cepanja (Slika 3-1). A_{XX} , A_{YY} i A_{ZZ} su pojedinačne kristalne vrednosti spin probe koje iznose 0,63, 0,58 i 3,36 mT, i indikativne su za doksilne derivate.

Odnos (α_o/α'_o) predstavlja korekciju polarnosti, pri čemu je:

$$\alpha_o = (A_{XX} + A_{YY} + A_{ZZ})/3$$

a α'_o je izotropna konstanta hiperfinog cepanja za spin probu u membrani i definisana je kao:

$$\alpha'_o = (A_{\parallel} + 2A_{\perp})/3$$

α'_o senzitivni indikator polarnosti i njegova vrednost se povećava kada nitroksidni paramagnetični prsten interaguje sa polarnijim okruženjem.

3.2.6.9 *Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)*

Infracrvena spektroskopija je tehnika kojom se mere apsorptivna svojstva jedinjenja u infracrvenom delu elektromagnetnog spektra (700 nm - 1 mm). Različite hemijske grupe apsorbuju različite delove infracrvenog spektra što čini ovu metodu jako pogodnom za sticanje osnovnog uvida u strukturu ispitivanog molekula na jednostavan i pristupačan način. Ova metoda je od naročitog značaja za ispitivanje materijala, koloida i kvaliteta relativno uniformnih hemijskih smeša. Prisustvo velikog broja različitih funkcionalnih grupa iz različitih molekula značajno otežava tumačenje infracrvenih spektara. Kako bi se olakšao proces obrade signala i proširila aplikativna vrednost infracrvene spektrometrije, razvijena je infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom, pri čemu se korišćenjem posebnih softvera vrši matematička obrada podataka u cilju dobijanja spektara (Berthomieu i Hienerwadel, 2009).

FTIR tehnika korišćena je kako bi se procenile hemijske interakcije između takrolimusa i drugih sastojaka u mikroemulzijama, s obzirom na to da one sadrže veliku količinu surfaktanta i kosurfaktanta u poređenju sa ostalim nanonosaićima. FTIR spektri snimljeni su korišćenjem BOMEM Hartmann & Braun MB-serije FTIR spektrofotometra (ABB Bomem Inc. Kvebek, Kanada). Uzorci takrolimusa pripremljeni su metodom pastila sa kalijum bromidom, dok su uzorci mikroemulzionih formulacija sa ili bez takrolimusa pripremljeni tako što je 10 μL formulacije postavljeno na ploču KRS-5, a potom upareno u vakumu. FTIR spektri svih uzoraka snimljeni su u opsegu talasnog broja između 4000 i 400 cm^{-1} , korišćenjem 10 skeniranja po spektru, sa rezolucijom 1 cm^{-1} .

3.2.7 *Ispitivanje stabilnosti formulacija*

Fizička i hemijska stabilnost (veličina čestica, indeks polidisperziteta, zeta potencijal, pH, provodljivost) placebo formulacija koje su čuvane na sobnoj temperaturi ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) zaštićena od svetlosti, procenjivana je tokom godinu dana za mikroemulzije, odnosno šest meseci za nanostrukturirane lipidne čestice i nanoemulzije. Pored toga, sve formulacije su vizuelno analizirane tokom ispitivanja stabilnosti, čime je praćena znaćajna promena u boji, viskozitetu, pojava vidljivih struktura (agregata, mikrobiološke kontaminacije) i /ili odvajanje faza.

Dodatno, s obzirom na to da je takrolimus relativno nestabilna aktivna supstanca sklona degradaciji, sprovedeno je kvantitativno određivanje njegovog sadržaja u mikroemulzionim formulacijama u periodu od godinu dana. S druge strane, imajući u vidu to da je ekspulzija lekovite supstance jedan od glavnih nedostataka lipidnih nanoćestica, kao što su nanostrukturirani lipidni nosaići, procenjivana je efikasnost inkapsulacije takrolimusa u ovoj formulaciji nakon skladištenja u trajanju od šest meseci.

3.2.8 Procena bezbednosnog profila / iritacionog potencijala placebo mikroemulzionih formulacija primenom *in vivo* biofizičkih merenja kritičnih parametara stanja kože

Iako su svi razvijeni nanonosai formulisani korišćenjem bezbednih, biokompatibilnih ekscipijenasa, imajući u vidu relativno veliku količinu surfaktanta i kosurfaktanata prisutnih u mikroemulzijama od posebnog je značaja proceniti njihov bezbednosni profil, odnosno ispitati iritacioni potencijal ovih formulacija. U tu svrhu sprovedene su *in vivo* studije na humanim dobrovoljcima ženskog pola primenom objektivne procene kritičnih parametara stanja kože instrumentalnim/biofizičkim merenjima (Isailović i sar., 2016). S obzirom na to da je takrolimus vrlo potentna aktivna supstanca i snažan imunosupresiv, u ovom stadijumu preliminarnih ispitivanja nije opravdano koristiti formulacije sa takrolimusom za procenu bezbednosnog profila samih nosača. Stoga je ispitivanje vršeno korišćenjem isključivo placebo formulacija, bez lekovite supstance.

Studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, i odobrena je od strane lokalnog Etičkog komiteta za biomedicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet. U ovoj studiji učestvovalo je 9 dobrovoljaca ženskog pola, starosti 24 ± 3 godine, bez kožnih oboljenja i bez istorije alergijskih reakcija. Pre početka studije sve ispitanice su obavestene o toku i cilju studije, kao i potencijalnim neželjenim efektima i dale su pisanu saglasnost za učestvovanje u studiji. Ispitanice su obavestene da ne treba da koriste nikakve kozmetičke ili farmaceutske preparate na ispitivanim mestima 24 h pre početka i tokom trajanja studije. Takođe, ispitanicama nije bilo dozvoljeno konzumiranje nikotina i kofeina (kafa, čaj, energetskih napitaka) 3 h pre merenja parametara kože.

Neposredno pre početka studije, ispitanice su boravili najmanje 30 min u prostoriji u kojoj je vršeno merenje biofizičkih parametara, kako bi se koža adaptirala na kontrolisane atmosferske uslove (temperaturu i vlažnost) u prostoriji. Potom su test-mesta na volarnoj strani podlaktice, dimenzije 2 cm x 2 cm, obeležena korišćenjem specijalno dizajniranih kartonskih šablona. Zatim su izmerene bazalne vrednosti biofizičkih parametara koji će biti praćeni tokom ispitivanja: eritema indeks (EI), transepidermalni gubitak vode (TEGV) i hidratacije *stratum corneum*-a (SCH), korišćenjem sledećih uređaja: Mexameter[®] MX 18, Corneometer[®] CM 825 i Tewameter[®] TM 210, proizvođača Courage + Khazaka Electronic GmbH, Keln, Nemačka.

Nakon merenja bazalnih vrednosti, tri test-mesta na levoj ruci i dva test-mesta na desnoj ruci tretirana su sa po 20 μ L placebo mikroemulzija (ECV 35, ECPG 70, ICV 35, ICV 60, ICPG 70). Uzorci su pažljivo razmazani po celoj površini test-mesta, nakon čega su tretirana mesta prekrivena okluzijom od Parafilm[®]-a (Pechiney Plastic Packaging, Inc., Menasha, Wisconsin, SAD), preko koga je postavljen samolepljivi, hipoalergijski flaster za fiksiranje (Sensifix[®], Galenika a.d., Beograd, Srbija). Po jedno test-mesto na svakoj ruci, oko 3 cm udaljeno od zgloba šake ostavljeno je kao netretirana kontrola, i to netretirana kontrola pod okluzijom (NCO) na levoj ruci i netretirana kontrola bez okluzije (NC) na desnoj ruci.

Okluzija sa test-mesta je uklonjena 24 h nakon aplikacije formulacija, a 1 h nakon uklanjanja okluzije ponovo su izmereni praćeni biofizički parametri. Sva merenja su sprovedena u skladu sa objavljenim smernicama i studijama (Clarys i sar., 2000; Plessis i sar., 2013).

3.2.9 *In vitro* ispitivanje oslobađanja takrolimusa iz formulacija korišćenjem Franz-ovih difuzionih ćelija

Studije oslobađanja lekovite supstance iz odabranih formulacija sprovedene su *in vitro*, primenom Franz-ovih difuzionih ćelija (Gauer Glas, D-Püttlingen, Nemačka) sa dostupnom površinom za difuziju leka od 2,01 cm² i zapreminom akceptorskog dela ćelije 12 mL (Ilic i sar., 2018). Odabrane formulacije sa inkorporiranim takrolimusom (bikontinuirane mikroemulzije ECV 35 i ICV 35, U/V mikroemulzija ICV 60, nanostrukturirane lipidne čestice PCLP 4: 6, nanoemulzija CLP 10) i referentna mast (Protopic[®] 0,1%) u količini ekvivalentnoj 1 mg takrolimusa postavljene su na prethodno aktiviranu dijaliznu membranu (veličina pora 2,4 nm, molekularni "cut-off" 12000)

u donorskom kompartmentu, pazeći da ne dođe do uklapanja vazduha, koji može uticati na difuziju lekovite supstance kroz membranu u akceptorski medijum. Membrane su pre ispitivanja aktivirane potapanjem u akceptorski medijum tokom 12 h, kako bi se uklonio prisutan vazduh unutar pora.

Kao akceptorski medijum korišćena je smeša vode i metanola (60:40 v/v) kako bi se obezbedilo održanje takozvanih "sink" uslova za takrolimus, odnosno kako rastvaranje takrolimusa u akceptorskom medijumu ne bi bilo ograničavajući faktor za njegovu difuziju. Akceptorski medijum je kontinuirano mešan tokom celog eksperimenta na 500 obrtaja/min. Takođe, temperatura vodenog kupatila u kome su komore bile potopljene tokom eksperimenta, održavana je na $32^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Oslobađanje je praćeno tokom 24 h, a nakon 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 9 h i 24 h od aplikacije formulacija uzorkovano je po 500 μL akceptorskog medijuma, pri čemu je ista količina novog, temperiranog medijuma vraćena u akceptorsku ćeliju kako bi se održali "sink" uslovi.

Koncentracija oslobođenog takrolimusa u akceptorskom medijumu je određena korišćenjem UPLC-MS/MS metode opisane u poglavlju 3.2.13. Rezultati su prikazani kao kumulativna količina takrolimusa koja je difundovala kroz sintetsku membranu u akceptorski medijum, izražena kao procenat u odnosu na ukupnu količinu takrolimusa koji je nanet u donorskoj komori na početku ispitivanja.

Profili *in vitro* oslobađanja interpretirani su korišćenjem različitih matematičkih modele koji opisuju kinetiku oslobađanja lekovitih supstanci, kao što su model kinetike nultog reda, model kinetike prvog reda, Higuchi model, Korsmeyer–Peppas model, Hixson Crowell model (Bruschi, 2015). Model koji najbolje opisuje kinetiku oslobađanja takrolimusa iz razvijenih formulacija izabran je na osnovu najviše vrednosti koeficijenta determinacije (R^2).

3.2.10 *In vitro* ispitivanje dermalne raspoloživosti / penetracije takrolimusa iz mikroemulzija u kožu uha svinje primenom metode sa trakama (engl. *tape stripping*)

Imajući u vidu to da su brzina i stepen raspodele lekovite supstance u *stratum corneum-u* u korelaciji sa koncentracijom lekovite supstance u dubljim slojevima kože (Raney i sar., 2015), primenom metode sa trakama na *ex vivo* modelu kože uha svinje dobijeni su penetracioni profili takrolimusa iz razvijenih nosača i referentne masti, i ukupna količina takrolimusa u uklonjenom *stratum corneum-u*, na osnovu kojih se može proceniti njegova dermalna raspoloživost.

Sveže uši svinja nabavljene su iz lokalne mesare neposredno nakon žrtvovanja životinja, i čuvane su u zamrzivaču na -20°C do sprovođenja eksperimenata. Na dan eksperimenta, uši su odmrznute na sobnoj temperaturi i makazama su odstranjene dlake sa dorzalne (spoljašnje) strane ušne školjke. Odgovarajuća test-mesta (2 cm x 2 cm) na dorzalnoj strani ušne školjke, bez vidljivih oštećenja ili pigmentacije, označena su permanentnim markerom korišćenjem odgovarajućih kartonskih šablona. Na test-mestima meren je transepidermalni gubitak vode, kako bi se procenio integritet kožne barijere i adekvatnost kože za sprovođenje ispitivanja nakon odmrzavanja. Kada je ovaj parametar dostigao vrednost $\sim 15 \text{ g/m}^2/\text{h}$, uši svinja su pričvršćene za stiroporsku ploču, nakon čega su test-mesta tretirana mikroemulzionim formulacijama (ECV 35, ICV 35 ili ICV 60 sa 0,1 % inkorporiranim takrolimusom) ili referentnom mašću (Protopic[®] 0,1%) u količini koja sadrži 50 $\mu\text{g/cm}^2$ takrolimusa (beskonačna, *infini*t doza).

Nakon dva sata od tretmana, višak formulacija sa test-mesta je uklonjen korišćenjem pamučnih tufera. Potom je 12-15 D-squame[®] adhezivnih traka (CuDerm, Dallas, SAD) površine 3,8 cm^2 sukcesivno naneto i uklonjeno sa svakog tretiranog mesta, čime su dobijeni slojevi *stratum corneum-a*. Svaka naneta traka bila je podvrgnuta konstantnom pritisku korišćenjem specijalno dizajniranog rolera mase 300 g, kako bi se smanjila varijacija koja potiče od postojanja bora i brazda na površini kože (Lademann i sar., 2009). Masa adhezivnih traka je merena na analitičkoj vagi Sartorius BP210D (Sartorius, Nemačka) pre i posle uklanjanja *stratum corneum-a*, kako bi se dobili podaci o količini uklonjenih korneocita. Dodatno, kako bi se procenila ukupna debljina *stratum corneum-a*, ista količina adhezivnih traka je uklonjena sa kontrolnih, netretiranih mesta, pri

čemu je meren transepidermalni gubitak vode pre nanošenja prve trake i nakon uklanjanja 4., 8., 12. i 15. trake.

Ekstrakcija takrolimusa iz uklonjenih traka vršena je primenom sledećeg protokola. Svaka traka ubačena je u epruvetu u kojoj je dodato 4 mL 70 % (v/v) etanola. Epruvete su podvrgnute dejstvu ultrazvuka na ultrazvučnom kupatilu tokom 15 min, nakon čega je sadržaj epruveta centrifugiran na 4000 obrtaja/min tokom 5 minuta (Centrifuga MPW-56, MPW Med. Instruments, Varšava, Poljska) i supernatant je filtriran kroz 0,22 μ m najlonski filter. Epruvete sa uzorcima su dobro zatvorene i čuvane u frižideru do sprovođenja kvantitativne analize korišćenjem UHPLC-MS/MS metode opisane u poglavlju 3.2.13. Adekvatnost postupka ekstrakcije procenjena je opterećivanjem placebo uzoraka *stratum corneum*-a poznatim količinama takrolimusa rastvorenog u metanolu. Nakon isparavanja rastvarača, takrolimus je ekstrahovan gore opisanim postupkom, i dobijena je zadovoljavajuća *recovery* vrednost od $92,06 \pm 5,93\%$ (n = 8).

3.2.11 *In vitro* ispitivanje dermalne raspoloživosti / penetracije takrolimusa iz nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzije u kožu uha svinje primenom diferencijalnog stripinga

Diferencijalni striping je metoda kojom se detaljnije može proceniti dermalna raspoloživost ispitivanih lekovitih supstanci kombinovanom primenom metode sa trakama, koja se koristi u cilju uklanjanja slojeva *stratum corneum*-a, i naknadnom površinskom cijanoakrilatnom biopsijom kože, kojom se može steći uvid u količinu lekovite supstance koja je penetrirala u folikule dlaka (Ilic i sar., 2018). S obzirom na to da se adekvatna dermalna raspoloživost lekovite supstance iz lipidnih nanočestica može osigurati ukoliko one omoguće penetraciju lekovite supstance na željenom mestu u folikulima dlaka (Patzelt i sar., 2017), metoda diferencijalnog stripinga korišćena je kako bi se procenila dermalna raspoloživost takrolimusa iz nanostrukturiranog lipidnog nosača PCLP 4:6. Dodatno, u cilju poređenja rezultata, diferencijalni striping je sproveden i nakon tretmana nenoemulzijom CLP 10 i referentnom mašću (Protopic[®] 0,1 %).

Priprema kože uha svinje, kao i uklanjanje slojeva *stratum corneum*-a adhezivnim trakama opisani su u poglavlju 3.2.9. Po uklanjanju 15. adhezivne trake, na tretiranim mestima naneta je po jedna kap cijanoakrilatnog lepka (UHU GmbH & Co. KG, Bril, Nemačka) preko koje je postavljena adhezivna traka. Lepak je ostavljen da polimerizuje tokom 10 min, nakon čega je adhezivna traka sa lepkom uklonjena, a postupak ponovljen još jedan put. Obe adhezivne trake su ubačene u epruvetu u kojoj je dodato 4 mL acetonitrila. Takrolimus je ekstrahovan korišćenjem ultrazvučnog kupatila u trajanju od 15 minuta, sadržaj epruveta je centrifugiran na 10 000 obrtaja/min (MiniSpin[®] plus, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) tokom 30 min, nakon čega je supernatant filtriran kroz 0,22 μ m najlonski filter. Određivanje takrolimusa sprovedeno je korišćenjem UHPLC-MS/MS metode opisane u poglavlju 3.2.13.

3.2.12 *In vitro* procena permeacije takrolimusa kroz kožu uha svinje pune debljine korišćenjem Franz-ovih difuzionih ćelija

Kako bi se dobile informacije o brzini i stepenu permeacije takrolimusa kroz kožu, sprovedene su *in vitro* studije permeacije takrolimusa iz odabranih nanonosača i referentnog preparata korišćenjem Franz-ovih difuzionih ćelija (Gauer Glas, D-Püttlingen, Nemačka). Dodatno, ovim ispitivanjem može se proceniti potencijal formulacija da ispolje sistemske neželjene efekte usled permeacije lekovite supstance kroz sve slojeve kože i njene resorpcije u sistemsku cirkulaciju (OECD, 2004; SCCS, 2010; Sheshala i sar., 2019).

Kao membrana između donorskog i akceptorskog medijuma korišćena je koža uha svinje pune debljine. Naime, sveže uši svinja nabavljene su iz lokalne mesare neposredno nakon žrtvovanja životinja, i čuvane su u zamrzivaču na - 20°C do sprovođenja eksperimenata, ne duže od mesec dana. Na dan eksperimenta, uši su odmrznute na sobnoj temperaturi i koža pune debljine je pažljivo uklonjena sa spoljašnjeg dela ušne školjke. Višak dlaka na koži pažljivo je skraćen

makazama, a onda su posebnim alatom uzorkovani isečci kože u obliku diska prečnika 2,5 cm. Ovi isečci postavljeni su na Franz-ove difuzione ćelije čiji su akceptorski kompartmenti prethodno napunjeni akceptorskim medijumom (25 % rastvor etanola u fiziološkom rastvoru koji je puferisan fosfatnim puferom, pH 7,4, zagrejanom na 32°C), pri čemu je površina kože bila okrenuta ka donorskom kompartmentu. Akceptorski delovi difuzionih ćelija uronjeni su u vodeno kupatilo, čija je temperatura održavana na 32°C, i uzorci kože su ostavljeni da se temperiraju tokom 30 minuta. Sadržaj akceptorskog medijuma konstantno je mešan tokom celog eksperimenta na magnetnoj mešalici pri brzini od 500 obrtaja/min. Nakon temperiranja kože, 1 g formulacije ili referentne masti, koji odgovara 1 mg takrolimusa (beskonačna, infinit doza), nanet je na kožu u donorskom kompartmentu, površine 2,01 cm². Donorski kompartment je potom prekriven Parafilm[®]-om, kako bi se sprečilo intenzivno isparavanje vode iz formulacija. Ispitivanje je sprovedeno tokom 24 h, pri čemu su uzorci akceptorskog medijuma (500 µL) uzorkovani nakon 3 h, 6 h, 20 h, 22 h i 24 h od nanošenja formulacija. Nakon svakog uzorkovanja, akceptorski kompartment je dopunjen istom količinom svežeg medijuma, temperiranog na 32°C. Količina takrolimusa u uzorcima određena je primenom UPLC-MS/MS metode opisane u poglavlju 3.2.13. Brzina permeacije takrolimusa određena je iz nagiba linearnog dela grafika zavisnosti kumulativne količine takrolimusa koja je permeirala kroz jedinicu površine membrane (ng/cm²) od vremena uzorkovanja akceptorskog medijuma (h). Kumulativne količine takrolimusa u svakom vremenskom intervalu korigovane su tako da uključuju količinu takrolimusa uklonjenu prethodnim uzorkovanjem.

Nakon 24 h ispitivanja permeacije takrolimusa, koža uha svinje je skinuta sa Franz-ovih difuzionih ćelija, višak formulacije je pažljivo uklonjen pamučnim tuferima, a koža je usitnjena makazama i ubačena u epruvetu. U cilju ekstrakcije takrolimusa, u epruvetu je dodato 4 mL metanola, epruvete su dobro zatvorene i postavljene na orbitalni mešač KS 260 basic (IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemačka). Sadržaj epruvete je mešan tokom 24 h pri brzini 250 obrtaja/min, a onda centrifugiran na 4000 obrtaja/min tokom 30 min (centrifuga MPW-56, MPW Med. Instrumenti, Varšava, Poljska). Efikasnost metode korišćene za ekstrakciju takrolimusa ispitana je opterećivanjem placebo uzoraka kože poznatim količinama takrolimusa (200 ng i 2000 ng), pri čemu je dobijena zadovoljavajuća *recovery* vrednost (99,25 ± 9,13 %, n = 6).

3.2.13 Kvantitativno određivanje takrolimusa

Imajući u vidu to da je količina takrolimusa u ispitivanim formulacijama i referentnom preparatu relativno niska (0,1 %), mogu se očekivati niske koncentracije takrolimusa u studijama ispitivanja penetracije i permeacije. Stoga je bilo neophodno razviti i verifikovati odgovarajuću analitičku metodu koja može zadovoljiti potrebe ove studije. U tu svrhu, kao osnova za modifikaciju, korišćena je metoda koju su Goebel i saradnici razvili (2009).

Ukratko, kvantitativno određivanje takrolimusa vršeno je primenom ultra visokoeffikasne tečne hromatografije u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (UPLC-MS/MS) na uređaju Scientific Accela 1000 UPLC sistem kuplovan sa Thermo Scientific TSQ Quantum Access MAX tripl kvadripol masenim spektrometrom (Thermo Fisher Scientific, San Jose, California). Za razdvajanje takrolimusa korišćena je kolona XTerra[®] MS C18 (2,1 × 150 mm, 3,5 µm; Waters Corporation), uz grejanje na 50°C, pri izokratskom protoku mobilne faze (0,25 mL/min) koju čine 0,1 % mravlje kiseline u smeši acetonitrila i vode (65:35, v/v). Detekcija takrolimusa vršena je masenim detektorom, korišćenjem elektronsprej jonizacije u selektivnom modu (engl. *selected reaction monitoring mode*), praćenjem jonskog prelaza *m/z* 826→616.

U cilju verifikacije metode, ispitana je linearnost u opsegu koncentracija između 5 ng/mL i 1000 ng/mL i dobijen je zadovoljavajući koeficijent korelacije (*r*) 0,9989, sa limitom detekcije od 2 ng/mL i limitom kvantifikacije od 5 ng/mL. Dodatno, testirana je preciznost metode, višestrukom analizom četiri različita standardna rastvora takrolimusa (5 ng/mL, 250 ng/mL, 500 ng/mL i 1000 ng/mL). Rezultati verifikacije ukazuju na to da je metoda pouzdana za analizu takrolimusa u datom opsegu koncentracija.

3.2.14 Obrada rezultata

Svi podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD) ili standardna greška (SE). U cilju generisanja grafika i procene linearnosti/matematičkih modelovanja, korišćen je program Origin 9.0 (OriginLab Corporation, Northampton, SAD). Statistička obrada podataka je sprovedena korišćenjem softvera IBM SPSS[®] Statistics 21 (IBM, Njujork, SAD). Normalna distribucija podataka je testirana korišćenjem Shapiro–Wilk testa. U zavisnosti od prirode podataka, broja poređenih grupa i homogenosti varijansi, statistička značajnost ($p < 0,05$) je testirana korišćenjem Studentovog t-testa, jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc analizom, ili Welch i Brown-Forsythe testa sa Games-Howell post hoc analizom. Za podatke koji odstupaju od normalne distribucije, korišćeni su Mann–Whitney U-test ili Kruskal-Wallis test.

4 REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati ove studije obuhvataju nekoliko grupa eksperimenata koji su za cilj imali da utvrde mogućnost formiranja mikroemulzija, nanoemulzija i nanostrukturiranih lipidnih nosača korišćenjem lecitina kao surfaktanta uz dodatak odgovarajućih kosurfaktanata, detaljnu fizčko-hemijsku karakterizaciju odabranih nosača, procenu mogućnosti inkorporacije takrolimusa kao i stepen penetracije i permeacije takrolimusa iz ovih, strukturno različitih nosača, u kožu. U ovom poglavlju će takođe biti prikazana diskusija dobijenih rezultata u svetlu dostupne međunarodne literature, kao i našeg iskustva u radu sa ovim sistemima.

4.1 Rezultati i diskusija prve faze ispitivanja

4.1.1 Ispitivanje rastvorljivosti takrolimusa

Najveći praktični izazov u razvoju dermalnih formulacija sa takrolimusom je njegova vrlo slaba rastvorljivost u vodi (4 - 12 $\mu\text{g/mL}$ (Patel i sar., 2012)). Imajući to u vidu, kao i to da je prisustvo rastvorene lekovite supstance jedan od glavnih preduslova za ostvarivanje farmakološkog efekta takrolimusa u koži, u okviru priprema za eksperiment prikupljeni su podaci iz literature o rastvorljivosti takrolimusa u različitim ekscipijensima (Tabela 4-1). Dodatno, odrađeno je ispitivanje rastvorljivosti takrolimusa u ekscipijensima planiranim za razvoj novih nosača za koje nisu pronađeni literaturni podaci (Tabela 4-2).

Naši rezultati ukazuju na to da se tečna masna faza Capryol[®] 90 ističe po tome što značajno bolje rastvara takrolimus od ostalih ispitivanih masnih faza koji se uobičajeno koriste za pripremu mikroemulzija, nanoemulzija i lipidnih nanočestica. Capryol[®] 90 je izuzetno atraktivna masna faza budući da poseduje amfifilne osobine, koje bi potencijalno mogle olakšati razvoj željenih nosača. Rastvorljivost takrolimusa najveća je u smeši lecitina i etanola, kao i smeši lecitina i izopropanola, što nije iznenađujuće s obzirom na njegovu dobru rastvorljivost u kratkolančanim alkoholima. Dodatak propilenglikola vodenoj fazi omogućilo je bolje rastvaranje takrolimusa.

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima sličnih studija i rastvorljivost takrolimusa je unutar očekivanih parametara (Borhade i sar., 2009; Patel i sar., 2013; Yamanaka i sar., 2014). Dodatno, ovi rezultati su od značaja za dalji tok studije jer ukazuju na mogućnost postizanja željenih terapijskih koncentracija takrolimusa u nosačima (0,03 - 0,1 % m/m).

Tabela 4-1 Literaturni pregled rastvorljivosti takrolimusa (Borhade i sar., 2009; Patel i sar., 2013; Yamanaka i sar., 2014).

Komercijalni naziv	Hemijski sastav	Rastvorljivost
Masna faza		
2-oktildodekanol	2-Oktil-1-dodekanol	0,6 % w/w
Cetilkaprilat	Heksadeciloktanoat	0,1 % w/w
Deciloleat	Decil-9-oktadecenoat	0,1 % w/w
Dietilsebacat	Dietil dekanodioat	5,0 % w/w
Diizopropiladipat	Di-(1-Metiletil) heksandioat	6,0 % w/w
Etil-oleat	Etil 9-oktadecenoat	8,51 ± 1,69 mg/g
Heksillaurat	Heksildodekanoat	0,2 % w/w
Isopropilpalmitat	1-Metiletil heksadekanoat	0,2 % w/w
Izopropilmiristat	1-Metiletil tetradekanoat	0,75 ± 0,86 mg/g
Lauroglycol FCC	Propilenglikol monolaurat, tip 1, sadržaj monoestara > 45 %	28,76 mg/mL
Lipoid MCT	Srednjelančani trigliceridi	2,16 ± 1,11 mg/g
Maisine 35-1	Glicerilmonolinoleat	7,19 mg/mL
Miglyol 812	Kaprilno/kaprinski trigliceridi	2,10 ± 0,56 mg/g
Oleilalkohol	Cis-9-octadecen-1-ol	2,7 % w/w
Oleiloleat	9-oktadecenil-9-oktadecenoat	<0,05 % w/w
Kikirikijevo ulje	Dugolančani trigliceridi	0,76 mg/mL
Sojino ulje	Dugolančani trigliceridi	1,39 ± 0,59 mg/g
Ulje semena pamuka	Dugolančani trigliceridi	1,49 mg/mL
Surfaktanti i kosurfaktanti		
Cremophore RH	Polietilenglikol-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje	20,38 mg/mL
Gelucine 50/13	Stearoil polioksigliceridi	5,35 mg/mL
Glikofurol	Tetrahidrofurfuril alkohol polietilenglikol etar	22,48 ± 1,02 mg/g
Labrafil M2130	Lauroil polioksil-6 gliceridi	6,34 mg/mL
Labrasol	Polietilenglikol-8	9,63 ± 0,82 mg/g

	kaprilno/kaprinski gliceridi	
	Polietilen-propilenglikol	
Lutrol F 68 (10% rastvor)	kopolimer	13,45 ± 1,21 mg/g
MYS-40 (10% rastvor)	Polioksil 40 stearat	11,35 ± 0,96 mg/g
	Fosfatidilholin rastvoren u nosaču zasnovanom na kaprilno/kaprinskim trigliceridima, alkoholu, glicerilstearatu, oleinskoj kiselini i askorbil palmitatu	
Phosal 53 MCT		4,1 mg/mL
	Fosfatidilholin rastvoren u alkoholu, ulju šafranike, glicerilstearatu, kokosovom ulju i askorbil palmitatu	
Phosal 75 SA		6,25 mg/mL
Polietilenglikol 200	Polietilenglikol 200	35,66 ± 3,79 mg/g
Polietilenglikol 300	Polietilenglikol 300	32,89 ± 4,39 mg/g
Polietilenglikol 400	Polietilenglikol 400	39,52 ± 4,64 mg/g
Propilenglikol	Propan-1,2-diol	37,88 ± 4,21 mg/g
	Polietilenglikol-660-12	
Solutol HS 15	hidroksistearat	9,60 ± 0,89 mg/g
	Polioksietilen-20-sorbitan	
Tween 20	monolaurat	12,76 ± 1,04 mg/g
	Polioksietilen-20-sorbitan	
Tween 80	monooleat	14,45 ± 2,19 mg/g
Vodena faza		
5 % rastvor glukoze	-	5,90 ± 2,53 µg/mL
Fiziološki rastvor	0,9 % rastvor natrijumhlorida	5,20 ± 4,46 µg/mL
Fosfatni pufer pH 7,4	-	7,17 ± 2,32 µg/mL

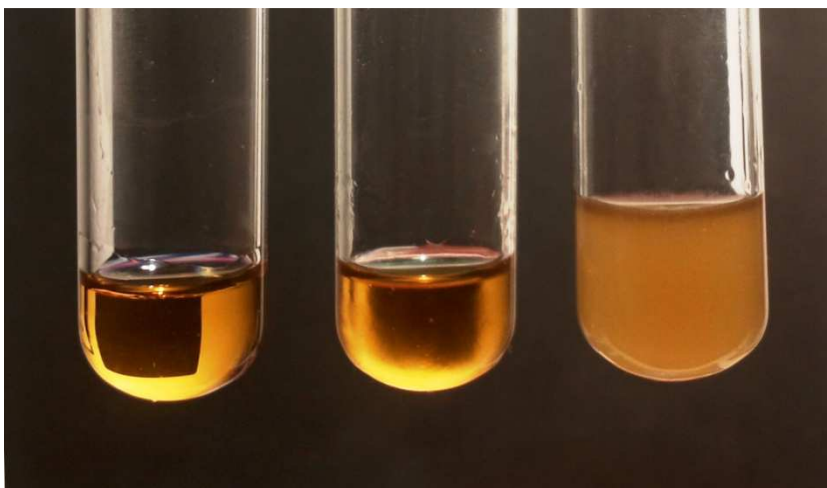
Tabela 4-2 Rezultati eksperimentalnog određivanja rastvorljivosti takrolimusa u odabranim ekscipijensima.

Ekscipijens	Rastvorljivost (mg/mL)
Etanol:Lecitin (1:1)	107,41 ± 7,17
Izopropanol: Lecitin (1:1)	169,97 ± 13,30
Voda:propilenglikol (1:1)	0,17 ± 0,02
Saboderm TCC (kaprilno-kaprinski trigliceridi)	3,70 ± 0,18
Capryol [®] 90 (propilenglikol monokaprilat)	63,49 ± 6,08

4.1.2 Konstruisanje pseudoternarnih faznih dijagrama

Jedan od glavnih fokusa ove faze istraživanja bio je konstruisanje pseudoternarnih faznih dijagrama korišćenjem lecitina kao bezbednog, biokompatibilnog i biodegradabilnog surfaktanta sa ciljem definisanja nastanka mikroemulzionih oblasti u prisustvu različitih masenih udela korišćenih ekscipijenasa. Pseudoternarni fazni dijagrami su grafičko predstavljanje nastajanja odgovarajućih sistema kao što su mikroemulzije u zavisnosti od različitog masenog ili zapreminskog udela masne faze, vodene faze i surfaktanta, pri čemu je maksimalni udeo svake od ovih faza prikazan kao ugao jednakostraničnog trougla (Lawrence i Rees, 2000). Kako bi se dobile stabilne mikroemulzije korišćenjem lecitina često je neophodno dodavanje kosurfaktanata, koji se mogu inkorporirati u međupovršinski film, čime se postiže smanjenje njegove rigidnosti i omogućava nastanak različitih tipova mikroemulzija (Gosenca i sar., 2013; Hoppel i sar., 2014). Dodavanje kosurfaktanata se najčešće vrši u sklopu surfaktanta, pri čemu je ugao na grafičkom prikazu obeležen kao 100 % smeše surfaktanta i kosurfaktanta u odgovarajućem odnosu, ali je takođe moguće dodavati kosurfaktante u sklopu masne ili vodene faze. Variranje masne faze, kosurfaktanata, kao i istovremeno inkorporiranje različitih kosurfaktanata može značajno uticati na mogućnost nastajanja mikroemulzionih oblasti u većem opsegu masenih udela ekscipijenasa, što se odražava većom površinom mikroemulzionog regiona na pseudoternarnom faznom dijagramu.

Imajući u vidu literaturne i eksperimentalne rezultate studije rastvorljivosti takrolimusa, kao masna faza izabran je propilenglikol monokaprilat - Capryol[®] 90. Dodatno, kako bi se što bolje ispitaio proces nastanka mikroemulzija u zavisnosti od strukture ekscipijenasa, odlučeno je sprovođenje komparativnog ispitivanja nastanka mikroemulzija korišćenjem i masne faze iz grupe srednjelančanih triglicerida - Saboderm TCC. Kao primarni kosurfaktanti korišćeni su etanol, izopropanol ili propilenglikol, a takođe je ispitan efekat dodatka sekundarnog kosurfaktanta - propilenglikola u sklopu vodene faze. Isključivo stabilni uzorci koji su tečni i transparentni (Slika 4-1, levo) su posmatrani pod polarizacionim mikroskopom i označeni kao mikroemulzije ukoliko su bili izotropni. Opalescentni i mutni uzorci (Slika 4-1 sredina i desno) ne predstavljaju mikroemulzije i nisu označeni na pseudoternarnim faznim dijagramima.



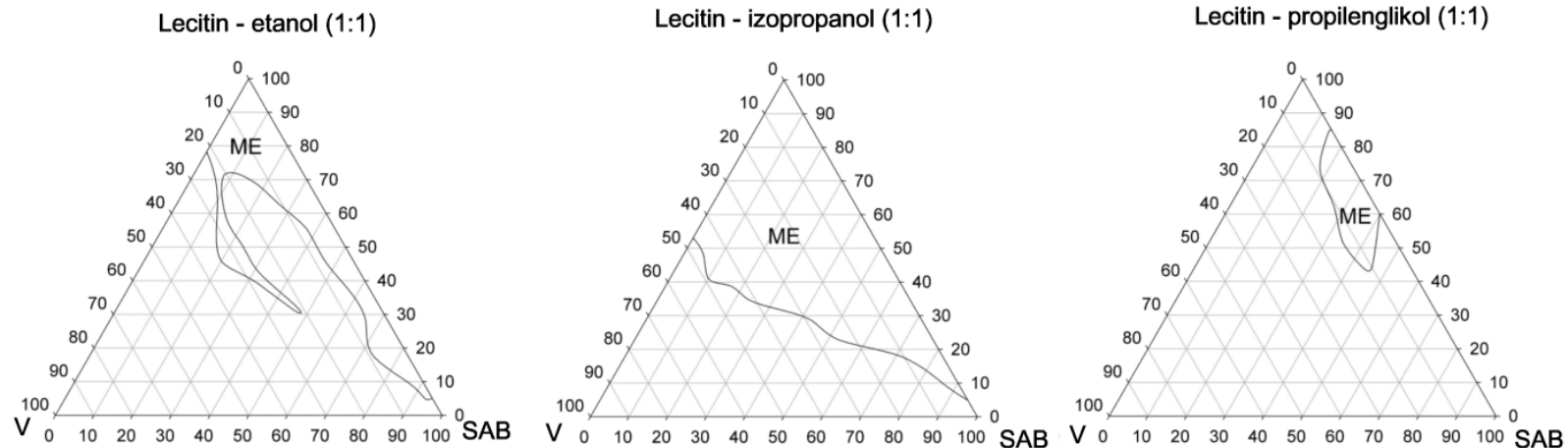
Slika 4-1. Transparentni (mikroemulzija), opalescentni i mutni uzorci dobijeni pri konstruisanju pseudoternarnih faznih dijagrama.

4.1.2.1 *Ispitivanje uticaja kosurfaktanata*

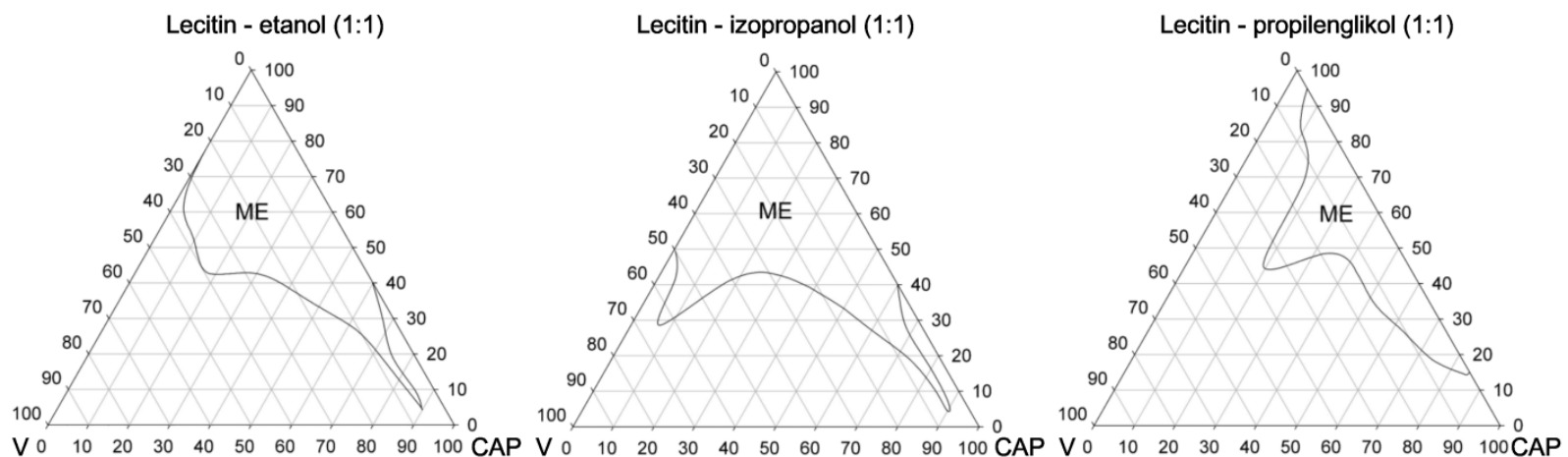
Generalno, kosurfaktanti se koriste u cilju menjanja kritičnog parametra pakovanja surfaktanata, što se postiže bilo njihovim inkorporiranjem u vodenu fazu, čineći je manje hidrofilnom i/ili inkorporiranjem u međupovršinski film (Aboofazeli i sar., 1995; Hoppel i sar., 2014). U slučaju primene lecitina kao surfaktanta, koji ima tendenciju formiranja relativno rigidnih međupovršinskih filmova, od izuzetne je važnosti inkorporiranje kosurfaktanata u međupovršinski film čime se povećava njegova fleksibilnost i modifikuje kritični parametar pakovanja lecitina, što može rezultovati u nastanku mikroemulzija (Gosenca i sar., 2013; Hoppel i sar., 2014).

Najmanje mikroemulzione oblasti na pseudoternarnim faznim dijagramima dobijene su korišćenjem propilenglikola kao jedinog kosurfaktanta (Slika 4-2 i Slika 4-3, desno). Jedan od razloga tome je intenzivno formiranje transparentnih ili turbidnih gelova u regionima faznog dijagrama sa visokim udelom smeše surfaktanta i kosurfaktanta. To se može objasniti prisustvom dve hidroksilne grupe u strukturi propilenglikola koje omogućavaju intenzivno građenje vodoničnih veza i umrežavanje sa molekulima lecitina i masne faze usled čega može doći do nastanka gel strukture. S druge strane, uzorci koji su sadržali niže udele surfaktanta i kosurfaktanta su bili mutni i nestabilni (vizuelno razdvajanje faza tokom 24 h).

Zamena propilenglikola etanolom kao primarnim kosurfaktantom dovela je do povećanja mikroemulzione oblasti, dok je primena izopropanola rezultovala prisustvom najvećih mikroemulzionih regiona na faznim dijagramima. Imajući u vidu da etanol i izopropanol sadrže po jednu alkoholnu grupu, razlika između sposobnosti formiranja mikroemulzija između ova dva kosurfaktanta može se objasniti dužinom ugljovodoničnog lanca. Budući da izopropanol ima duži ugljovodonični lanac, dobijeni rezultati ukazuju na to da se on lakše inkorporira na međupovršini ulje/voda, omogućava bolju interpenetraciju ugljovodoničnih lanaca lecitina i masne faze čime se intenzivnije smanjuje rigidnost međupovršinskog filma i time omogućava nastajanje mikroemulzija u većem opsegu masenih udela komponenata, što finalno rezultuje u većim površinama mikroemulzionog regiona na faznim dijagramima (Aboofazeli i Lawrence, 1993; Ruth i sar., 1995). Ovo je dodatno potvrđeno rezultatima EPR studije, videti poglavlje 4.3.1.5.



Slika 4-2 Pseudoternarni fazni dijagrami sa označenim mikroemulzionim regionima (ME) dobijeni postepenim dodavanjem visokoprečišćene vode (V) sistemu lecitin-kosurfaktant/ulje, korišćenjem kaprilno kaprinskih triglicerida (Saboderm TCC, SAB) kao masne faze.



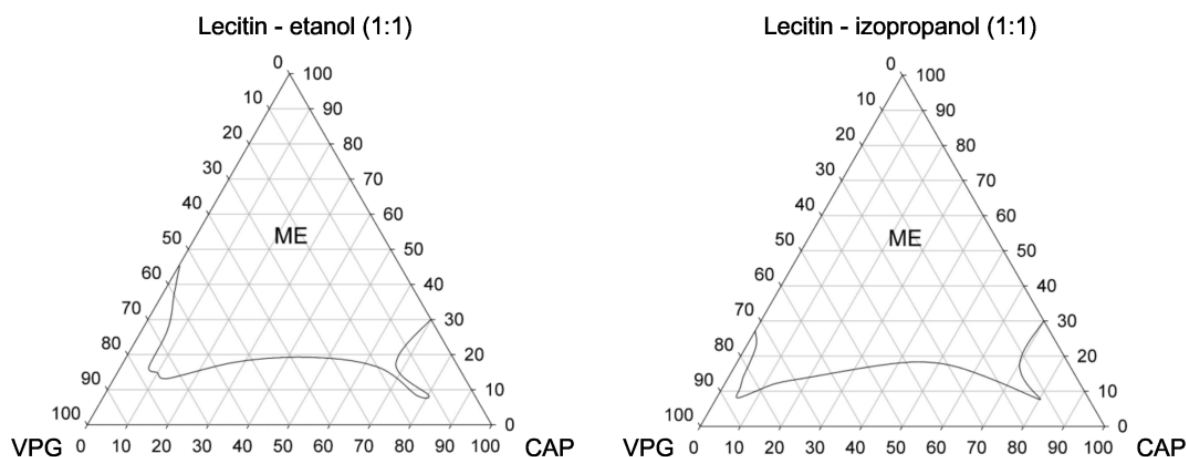
Slika 4-3 Pseudoternarni fazni dijagrami sa označenim mikroemulzionim regionima (ME) dobijeni postepenim dodavanjem visokoprečišćene vode (V) sistemu lecitin-kosurfaktant/ulje, korišćenjem propilenglikol monokaprilata (Capryol[®] 90, CAP) kao masne faze.

Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima ispitivanja sprovedenih od strane drugih istraživačkih grupa, koje su koristile drugačije masne faze i surfaktante. Aboofazeli i saradnici (1994) su ispitivali mogućnost nastanka fosfolipidnih mikroemulzija korišćenjem izopropilmiristata kao masne faze i različitih kosurfaktanata iz grupe karboksilnih kiselina, amina, alkohola, alkandiola i polietilenglikol alkiletra. Razlike u površinama mikroemulzionih regiona i generalno sposobnosti formiranja mikroemulzija korišćenjem ovih kosurfaktanata autori su objasnili različitom distribucijom kosurfaktanata u vodenoj fazi, masnoj fazi i međupovršinskom filmu, kao i različitim uticajem kosurfaktanta na kritični parametar pakovanja lecitina. Hidrofilni kosurfaktanti, koji se lako rastvaraju u vodi, se obično primarno distribuiraju u vodenu fazu i polarnim regionima međupovršinskog filma čime se smanjuje kritični parametar pakovanja lecitina i omogućava nastanak mikroemulzija. Nasuprot tome, hidrofobni kosurfaktanti, koji se lako rastvaraju u uljima, se dominantno distribuiraju u masnu fazu i lipofilnim regionima međupovršinskog filma, povećavajući kritični parametar pakovanja lecitina. Rezultati ispitivanja su pokazali da je poželjno korišćenje kosurfaktanta sa dužim ugljovodoničnim lancem tako da se on distribuira u međupovršinski film, ali ugljovodonični lanac ne sme biti previše dugačak, jer tako ne bi doveo do narušavanja rigidnog međupovršinskog monosloja koji lecitin formira. Dodatno, neophodno je i da veličina polarne grupe bude takva da efikasno smanji kritični parametar pakovanja lecitina. Autori su zaključili da korišćenje kratkolančanih kosurfaktanata sa velikom polarnom grupom ima najveći potencijal za formiranje mikroemulzija stabilizovanih lecitinom, ali je predviđanje faznog ponašanja sistema komplikovano, jer dodatno zavisi od odabira masne faze. Shodno tome, Ruth i saradnici (1995) su poredili efekat etanola i butanola kao kosurfaktanata u mikroemulzijama koje sadrže izopropilmiristat, lecitin i vodu. Oni su uočili to da je količina kosurfaktanta potrebna za dobijanje mikroemulzija mnogo veća kada je korišćen etanol u poređenju sa butanolom. Razlog tome je različita distribucija ovih alkohola između međupovršine ulje/voda i vodene faze, koja zavisi od njihove hidrofilnosti. Naime, etanol, kao hidrofilniji alkohol, ima niži koeficijent distribucije između ovih faza od butanola, te je stoga potrebno upotrebiti veće količine ovog alkohola kako bi se ispoljio sličan efekat na fleksibilnost međupovršinskog filma kao kada se koristi butanol. El Maghraby (2008) i saradnici su ispitivali mogućnost dobijanja mikroemulzija korišćenjem polisorbata 80 kao surfaktanta, eukaliptusovog ulja kao masne faze i različitih kratkolančanih alkohola. Rezultati njihove studije su takođe pokazali da povećanjem ugljovodoničnog lanca od etanola ka izopropanolu dovodi do povećanja mikroemulzionog regiona na pseudoternarnim faznim dijagramima. Nasuprot tome, povećanjem broja hidroksilnih grupa, odnosno zamenom izopropanola propilenglikolom, dolazi do smanjenja mikroemulzionog regiona, dok primenom glicerola uopšte nije bilo moguće formirati mikroemulzije, odnosno uočeno je potpuno odsustvo mikroemulzionog regiona sa faznog dijagrama.

Uticaj primene kratkolančanih alkohola kao kosurfaktanata u mikroemulzijama ispitivali su i Gowala i saradnici (2020). Za razliku od prethodno navedenih studija, oni su uočili progresivnu ekspanziju mikroemulzione oblasti sistema n-butilacetat/ α -tokoferil polietilenglikol sukcinat/alkohol/voda kada je kao kosurfaktant korišćen etanol u poređenju sa n-propanolom i n-butanolom, što ukazuje na povećanu solubilizaciju korišćenog ulja skraćenjem ugljovodoničnog lanca alkohola. Naime, zaključeno je da etanol može da dovede do dehidracije molekula surfaktanta, to jest da istisne molekule vode iz polietilenoksidnih jedinica u surfaktantu, čime se omogućava bolja penetracija surfaktanta u uljane kapi. Ipak, treba naglasiti da je u ovom istraživanju korišćena manje lipofilna masna faza (butilacetat) u poređenju sa uljima korišćenim u prethodno navedenim studijama (izopropilmiristat, ulje eukaliptusa), što može biti uzrok različite efikasnosti ispitivanih kratkolančanih alkohola.

Kako bi se ispitala mogućnost proširenja mikroemulzionih oblasti na pseudoternarnim faznim dijagramima i inkorporacija što veće količine vode u mikroemulzijama, u ovoj doktorskoj disertaciji je ispitan i efekat primene sekundarnog kosurfaktanta - propilenglikola - dodavanog u sklopu vodene faze, dok je kao primarni kosurfaktant korišćen etanol ili izopropanol. Primena propilenglikola kao sekundarnog kosurfaktanta jeste prividno povećala mikroemulzioni region na pseudoternarnim faznim dijagramima (Slika 4-4), međutim, maksimalna količina vode koja je

mogla biti inkorporirana u mikroemulzijama nije povećana, odnosno nije bilo moguće dobiti visokodilutabilne mikroemulzije. Naime, u slučaju faznih dijagrama bez prisustva sekundarnog kosurfaktanta, do 40 % vode je moglo biti inkorporirano kada je korišćen etanol, odnosno do 65 % vode je moglo biti inkorporirano kada je korišćen izopropanol kao kosurfaktant. Međutim, na faznim dijagramima u kojima je korišćen propilenglikol kao sekundarni kosurfaktant u sklopu vodene faze, samo je 38,5 % vode (etanol kao primarni kosurfaktant) odnosno 43% vode (izopropanol kao primarni kosurfaktant) moglo biti inkorporirano.



Slika 4-4 Pseudoternarni fazni dijagrami sa označenim mikroemulzionim regionima (ME) dobijeni postepenim dodavanjem smeše visokoprečišćene vode i propilenglikola (1:1, VPG) sistemu lecitin-kosurfaktant/ulje, korišćenjem propilenglikol monokaprilata (Capryol[®] 90, CAP) kao masne faze.

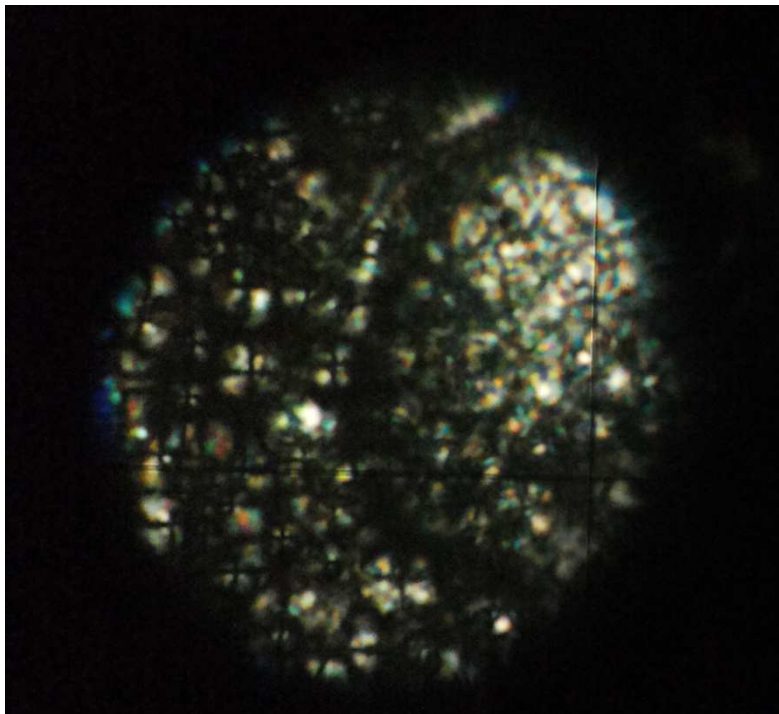
4.1.2.2 Ispitivanje uticaja masne faze

Komparacijom površina mikroemulzionih oblasti na pseudoternarnim faznim dijagramima dobijenim korišćenjem različitih masnih faza (propilenglikol monokaprilata - Capryol[®] 90 i kaprilnokaprilinskih triglicerida - Saboderm TCC), može se uočiti da odabir masne faze takođe ispoljava značajan efekat na mogućnost dobijanja mikroemulzija. Kao što je i očekivano, Capryol[®] 90, usled prisustva samo jednog srednjelančanog ugljovodoničnog lanca u svojoj strukturi i time manjoj voluminoznosti lipofilnog dela molekula, može bolje da interaguje sa ugljovodoničnim lancima unutar lecitina čime se obezbeđuje formiranje mikroemulzija sa manjim udelom surfaktanta-kosurfaktanta. S druge strane, prisustvo tri srednjelančana ugljovodonična lanca u strukturi Saboderm TCC značajno povećava voluminoznost lipofilnog dela molekula u poređenju sa masnom fazom Capryol[®] 90. Ovo je posebno izraženo kada je korišćen propilenglikol ili etanol kao kosurfaktant, dok je primena izopropanola umanjila ovu razliku između masnih faza.

4.1.2.3 Kombinovani efekat uticaja kosurfaktanta i masne faze

Na faznom dijagramu dobijenom korišćenjem kaprilno-kaprilinskih triglicerida kao masne faze i etanola kao kosurfaktanta (Slika 4-2, levo) može se uočiti to da su dva mikroemulziona regiona razdvojena nemikroemulzionim sistemom u kojem su uzorci ispoljavali izrazitu opalescenciju (Slika 4-1, sredina). Dodatnom analizom ovih uzoraka na polarizacionom mikroskopu uočeno je prisustvo takozvanih malteških krstova (Slika 4-5) koji mogu ukazivati na prisustvo lamelarne tečno-kristalne faze (Gosenca i sar., 2013; Müller-Goymann, 2004). Interesantno, zamenom etanola izopropanolom ili korišćenjem Capryol[®] 90 umesto Saboderm TCC masne faze, nije uočeno nastajanje tečno-kristalne faze u ovim regionima, već se formiraju stabilne, transparentne i izotropne mikroemulzije. Ovo se može objasniti kombinovanim efektom odabira kosurfaktanta i masne faze, pri čemu Saboderm TCC, usled prisustva tri srednjelančana ugljovodonična lanca u svojoj strukturi, ima veću voluminoznost hidrofobnog dela molekula i veću lipofilnost u poređenju

sa Capryol[®] 90, te stoga zahteva upotrebu lipofilnijeg kosurfaktanta koji može omogućiti bolju interpenetraciju lipofilnih ugljovodoničnih lanaca između masne faze i surfaktanta. S druge strane, Capryol[®] 90 sadrži jedan srednjelančani ugljovodonični lanac koji, usled manje voluminoznosti, lakše interaguje sa molekulima surfaktanta. Kako je cilj konstruisanja pseudoternarnih faznih dijagrama bio definisanje mikroemulzionih oblasti, nije nastavljeno sa dodatnim ispitivanjima tečno-kristalnih sistema.



Slika 4-5 Primer uočenih malteških krstova pri analzi opalescentnog uzorka pod polarizacionim mikroskopom.

4.1.3 Određivanje tipa mikroemulzija

Kao što je ranije pomenuto, postoje tri osnovna tipa mikroemulzija: U/V mikroemulzije, u kojima su uljane kapi homogeno dispergovane u spoljašnjoj vodenoj fazi, V/U mikroemulzije, kod kojih su vodene kapi dispergovane u spoljašnjoj uljanoj fazi, i bikontinuirane mikroemulzije, koje sadrže uljane i vodene regione koji se međusobno smenjuju (Lawrence i Rees, 2000). Tokom izrade presudoternarnih faznih dijagrama, svi uzorci koji su bili tečni, transparentni i izotropni označeni su kao mikroemulzije, međutim, koji tip mikroemulzije je obrazovan može se samo pretpostaviti na osnovu masenog odnosa vodene i masne faze. U regionima pseudoternarnih faznih dijagrama sa većim udelom vode dolazi do formiranja U/V mikroemulzija, u regionima koji sadrže veći maseni udeo masne faze može se očekivati nastajanje V/U mikroemulzija, dok regioni koji sadrže približno isti maseni odnos vodene i masne faze najverovatnije formiraju bikontinualne mikroemulzije (Lawrence i Rees, 2000). Kako bi se unutrašnja struktura mikroemulzija preciznije odredila i potvrdila, korišćene su metode određivanja provodljivosti sistema surfaktant-kosurfaktant/ulje tokom razblaživanja vodenom fazom, kao i DSC tehnika, pri čemu su odabrani uzorci snimani tokom hlađenja kako bi se pratila promena fizičkog stanja inkorporirane vode (Podlogar i sar., 2004; Todosijević i sar., 2014). Imajući u vidu veće mikroemulzione regione na faznim dijagramima dobijene korišćenjem ulja Capryol[®] 90, kao i to da se takrolimus mnogo bolje rastvara u tom ulju u poređenju sa masnom fazom Saboderm TCC, određivanje tipa provodljivosti mikroemulzija sprovedeno je samo u uzorcima sa Capryol[®] 90 kao masnom fazom. Dodatno, usled relativno male površine mikroemulzionog regiona korišćenjem propilenglikola kao primarnog kosurfaktanta, ovi uzorci nisu dodatno podvrgnuti određivanju tipa mikroemulzija.

4.1.3.1 *Praćenje provodljivosti tokom razblaživanja sistema surfaktant-kosurfaktant/ulje*

U literaturi je opisana pojava perkolacionog fenomena prilikom razblaživanja sistema surfaktant-kosurfaktant/masna faza vodenom fazom (Klossek i sar., 2013; Podlogar i sar., 2004; Tartaro i sar., 2020). Naime, u regionima sa malim masenim udelom vode (Φ_w) može se uočiti vrlo niska električna provodljivost ($< 10 \mu\text{S/cm}$), koja ukazuje na prisustvo V/U mikroemulzija, kod kojih su vodene kapi okružene surfaktantom i razdvojene masnom fazom, koja se ponaša kao izolator i sprečava provodljivost jona. Daljim uvođenjem vodene faze u sistem dolazi do formiranja kritične gustine vodenih kapi zbog koje dolazi do intenzivnog privlačenja između njih, međupovezivanja i formiranja vodenih kanala i klastera, usled kog dolazi do linearnog i naglog porasta u provodljivosti. Ovaj nagli porast provodljivosti posledica je prenošenja naelektrisanja kroz formirane vodene klustere koji interaguju sa polarnim glavama lecitina. Količina vode potrebna da bi počelo formiranje klastera označava se kao tačka perkolacionog praga (engl. *percolation threshold point*, Φ_p). Sa daljim porastom broja klastera dolazi do daljeg linearnog porasta provodljivosti sve do tačke Φ_m , gde je postignuta maksimalna provodljivost sistema. Bikontinuirane mikroemulzije se mogu očekivati u rasponu masenog udela vode od Φ_p do Φ_m . Tačka Φ_m označava se i kao tačka inverzije faza, nakon koje provodljivost postaje konstantna ili čak i opada, usled razblaživanja količine elektrolita u sistemu. U formulacijama koje sadrže maseni udeo vode veći od Φ_m može se očekivati formiranje U/V mikroemulzija.

Na osnovu analize pseudoternarnih faznih dijagrama, a sa ciljem inkorporiranja što veće količine vodene faze uz što manji maseni udeo smeše surfaktant-kosurfaktant kako bi se smanjio rizik od ispoljavanja iritacije kože usled primene formulacije, odabrane su sledeće linije razblaženja u pseudoternarnim faznim dijagramima koje su korišćene u ispitivanju strukture uzoraka mikroemulzija:

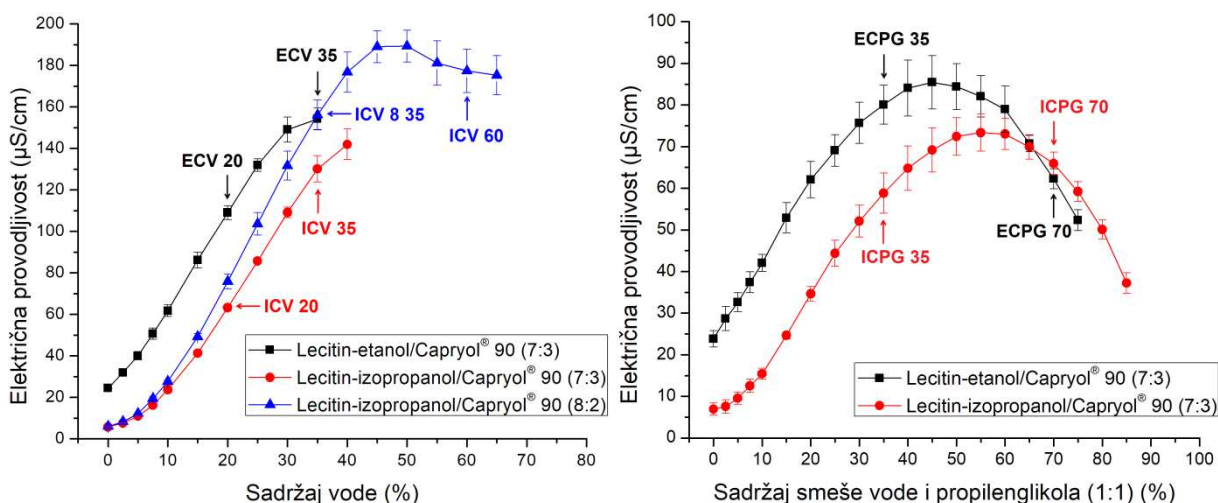
- Lecitin-etanol/Capryol[®] 90/voda (Slika 4-3, levo)
 - odnos surfaktant-kosurfaktant/masna faza = 7:3
- Lecitin-izopropanol/Capryol[®] 90/voda (Slika 4-3, sredina)
 - odnos surfaktant-kosurfaktant/masna faza = 7:3
 - odnos surfaktant-kosurfaktant/masna faza = 8:2
- Lecitin-etanol/Capryol[®] 90/voda-propilenglikol (Slika 4-4 levo)
 - odnos surfaktant-kosurfaktant/masna faza = 7:3
- Lecitin-izopropanol/Capryol[®] 90/voda-propilenglikol (Slika 4-4 desno)
 - odnos surfaktant-kosurfaktant/masna faza = 7:3

Imajući u vidu to da dodavanje soli/elektrolita može da dovede do narušavanja stabilnosti mikroemulzija i/ili promene u njihovoj strukturi, kao i to da analizirani sistemi sadrže dovoljnu količinu negativno naelektrisanih fosfolipida i drugih nečistoća iz lecitina koje omogućavaju dovoljno naelektrisanje za određivanje provodljivosti, odlučeno je da se studija provodljivosti sprovede bez eksternog dodavanja elektrolita. Visokoprečišćena voda ili smeša visokoprečišćene vode i propilenglikola u odnosu 1:1 dodavane su postepeno sve do narušavanja mikroemulzionog sistema i formiranja opalescentnog ili turbidnog sistema.

Rezultati studije provodljivosti prikazani su na slici Slika 4-6. Svi sistemi sa izopropanolom kao primarnim kosurfaktantom ispoljavaju perkolacioni fenomen. Naime, u regionima sa malim sadržajem vode ili smeše vode i propilenglikola ($\Phi_w, \Phi_{wpg} < 5\%$) može se uočiti niska električna provodljivost ($\sim 5\text{--}15 \mu\text{S/cm}$), koja ukazuje na prisustvo V/U mikroemulzija, u kojima su vodene kapi razdvojene uljanom fazom koja sprečava provodljivost naelektrisanja. Dalje dodavanje vode nakon tačke perkolacionog praga ($\Phi_w, \Phi_{wpg} \sim 5\%$) dovodi do formiranja kritične gustine vodenih kapi usled koje dolazi do njihovog međupovezivanja i formiranja vodenih klastera (bikontinuirane mikroemulzije) kroz koje se omogućava lakše provođenje naelektrisanja, te se može uočiti nagli i linearni porast provodljivosti sa dodatkom vodene faze (Klossek i sar., 2013; Tartaro i sar., 2020). Poređenjem provodljivosti sistema lecitin-izopropanol/Capryol[®] 90/voda sa različitim udelom surfaktant-kosurfaktant/ulje (7:3 i 8:2, Slika 4-6, levo), može se uočiti da sistem sa većim sadržajem lecitina ispoljava višu provodljivost usled veće koncentracije negativno naelektrisanih fosfolipida i

naelektrisanih nečistoća prisutnih u lecitinu. Takođe, maksimalna provodljivost ovog sistema postignuta je pri $\Phi_w \sim 45\%$, nakon čega provodljivost stagnira i postepeno opada, što se može pripisati promeni tipa mikroemulzija iz bikontinuiranih u U/V mikroemulzije, gde razblaživanje naelektrisanja visokoprečišćenom vodom dovodi do smanjenja u provodljivosti sistema. S druge strane, maksimalna provodljivost sistema sa manjim sadržajem lecitina i izopropanola (7:3) postignuta je pri $\Phi_w \sim 40\%$, nakon čega dolazi do destabilizacije mikroemulzionog sistema.

Analizom rezultata provodljivosti dobijenih korišćenjem etanola kao primarnog surfaktanta u poređenju sa izopropanolom, može se primetiti to da je provodljivost nešto viša u regionima sa malim sadržajem vode ili smeše vode i propilenglikola, kao i to da se ne može uočiti pojava perkolacionog fenomena, jer je provodljivost sistema lecitin-etanol/Capryol® 90 relativno visoka ($> 20 \mu\text{S/cm}$) i bez dodatka vodene faze, te pri malom dodatku vodene faze odmah dolazi do naglog i linearnog porasta provodljivosti. Odsustvo perkolacionog fenomena može se objasniti time što je u eksperimentima korišćen 96 % etanol, koji se uobičajeno koristi kao ekcipient u formulacijama za primenu na koži. Rezidualna količina vode prisutna u 96 % etanolu može biti dovoljna za formiranje V/U mikroemulzija i bez eksternog dodavanja vode. Daljim, eksternim dodavanjem vode može odmah doći do formiranja bikontinuiranih mikroemulzija, sve do $\Phi_w \sim 35\%$, nakon čega dolazi do destabilizacije mikroemulzionog sistema. Za razliku od izopropanola, korišćenje etanola kao jedinog kosurfaktanta nije omogućilo formiranje U/V mikroemulzija čak ni pri višim masenim odnosima surfaktant-kosurfaktant/ulje.



Slika 4-6 Provodljivost uzoraka mikroemulzija dobijenih postepenim razblaživanjem sistema surfaktant-kosurfaktant/ulje visokoprečišćenom vodom (levo) ili smešom visokoprečišćene vode i propilenglikola (1:1). Maseni odnos surfaktant-kosurfaktant/ulje prikazan je u legendi (7:3 ili 8:2).

Upotreba propilenglikola kao sekundarnog kosurfaktanta omogućila je formiranje U/V mikroemulzija čak i u sistemima kod kojih je etanol korišćen kao primarni kosurfaktant, dok je nastanak U/V mikroemulzija u kombinaciji sa izopropanolom omogućeno pri nižem sadržaju vode u poređenju sa sistemima bez propilenglikola kao sekundarnog kosurfaktanta. Naime, razblaživanje sistema lecitin-izopropanol/Capryol® 90 (odnos surfaktant-kosurfaktant/ulje 7:3) smešom visokoprečišćene vode i propilenglikola (Slika 4-6, desno) može se uočiti maksimalna provodljivost pri $\Phi_{wpg} \sim 55\%$, što odgovara masenom udelu vode od 27,5 %, nakon čega dolazi do promene strukture mikroemulzije iz bikontinuirane u U/V mikroemulziju. Slično se može uočiti i pri razblaživanju sistema lecitin-etanol/Capryol® 90 (odnos surfaktant-kosurfaktant/ulje 7:3) smešom visokoprečišćene vode i propilenglikola, kod kog se maksimalna provodljivost postiže pri $\Phi_{wpg} \sim 45\%$, što odgovara sadržaju vode od 22,5 %.

4.1.3.2 DSC analiza mikroemulzionih formulacija tokom hlađenja

Na osnovu rezultata studije provodljivosti, odabrane su određene formulacije označene na slici Slika 4-6 čija će struktura dodatno biti analizirana primenom DSC tehnike, kao metode termalne analize, kojom se može ispitati stanje vode u formulacijama praćenjem njenog zamrzavanja (Podlogar i sar., 2004; Todosijević i sar., 2014). Naime, u dispergovanim sistemima voda se može nalaziti u najmanje dva različita stanja: kao slobodna ("*bulk*") voda, ili kao vezana (unutrašnja, međupovršinska) voda. Slobodna voda ispoljava slične fizičko-hemijske osobine kao čista voda, te se tačka smrzavanja očekuje na temperaturi od oko 0°C (Garti i sar., 2000), ili još nižim temperaturama (-17°C) u slučaju korišćenja visokoprečišćene vode (Podlogar i sar., 2004), koja usled odsustva centara kristalizacije može postojati u tečnom stanju i na temperaturama ispod 0°C (superohlađena voda). Međutim, kompleksne formulacije često sadrže različite ekscipijense, kao što su alkoholi, surfaktanti i druge komponente koje u određenom stepenu mogu da interaguju sa molekulima slobodne vode i na taj način utiču na tačku smrzavanja vode, koja može biti pomerena ka nižim temperaturama (Podlogar i sar., 2004). S druge strane, vezana voda ima tačku smrzavanja na dosta nižim temperaturama, ili u nekim slučajevima uopšte nije moguće uočiti smrzavanja vode (Goebel i sar., 2011; Podlogar i sar., 2004; Todosijević i sar., 2014). DSC tehnika omogućava dobijanje informacija o temperaturi i entalpiji zamrzavanja vode u formulacijama, te se praćenjem površine i položaja pikova na DSC termogramima hlađenja formulacija sa različitim sadržajem vode može pretpostaviti da li se voda nalazi u slobodnom ili vezanom stanju, čime se indirektno može proceniti unutrašnja struktura mikroemulzija.

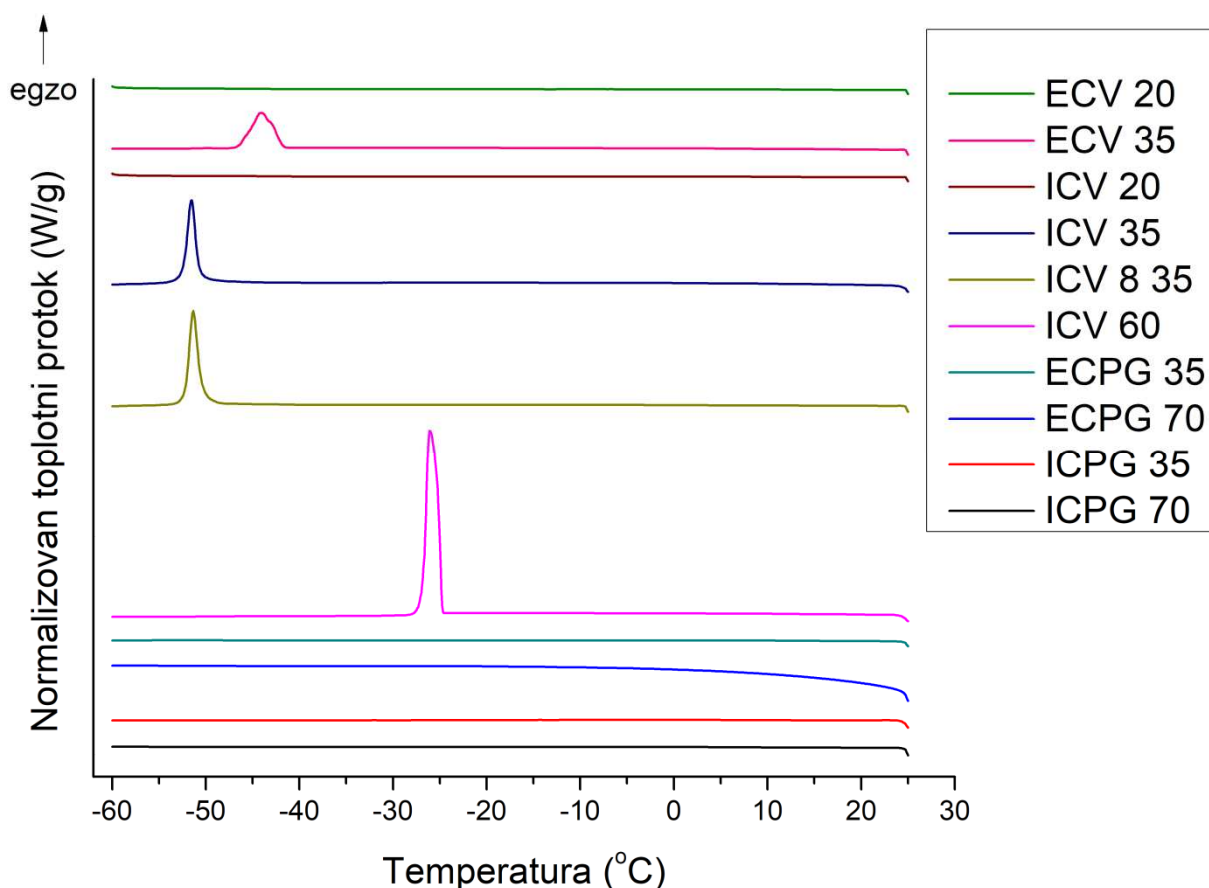
DSC krive hlađenja formulacija odabranih u studiji provodljivosti prikazane su na slici Slika 4-7, dok je detaljni sadržaj ovih formulacija prikazan u tabeli **Error! Not a valid bookmark self-reference.** Važno je napomenuti da DSC krive hlađenja sistema surfaktant-kosurfaktant/masna faza bez dodatka vodene faze ne ispoljavaju bilo kakve termalne promene. Stoga, sasvim je izvesno da egzotermni pik koji se može uočiti analizom formulacija ECV 35, ICV 35, ICV 8 35 i ICV 60 potiče od zamrzavanja vodene faze. Termodinamički parametri dobijenih pikova prikazani su u tabeli Tabela 4-4. Pik smrzavanja vodene faze u formulaciji ECV 35 postignut je pri temperaturi od -44,00°C, dok su pikovi smrzavanja vodene faze u formulacijama ICV 35 i ICV 8 35 skoro identični i nalaze se na -51,55°C, odnosno -51,33°C, što ne iznenađuje imajući u vidu da se ove dve formulacije razlikuju samo po odnosu surfaktant-kosurfaktant/masna faza i za obe je pretpostavljena bikontinuirana struktura u studijama provodljivosti. Ipak, s obzirom na to da ICV 8 35 sadrži značajno veći maseni udeo lecitina i izopropanola (Tabela 4-3) bilo je značajno proveriti i uporediti termalno ponašanje vodene faze u ovim formulacijama. Smrzavanje vodene faze na ovako niskim temperaturama ukazuje na jaku interakciju molekula vode sa surfaktantom i kosurfaktantima, te se stoga može zaključiti da se ona nalazi u vezanom stanju, što dodatno potvrđuje bikontinuiranu strukturu ovih mikroemulzija. Niža temperatura smrzavanja vodene faze kada je korišćen izopropanol kao kosurfaktant ukazuje na jaču interakciju molekula vode sa izopropanolom u poređenju sa etanolom. Termalnom analizom formulacije ICV 60, može se uočiti oštar egzotermni pik smrzavanja vode na relativno višoj temperaturi (-25,86°C) u poređenju sa prethodno pomenutim formulacijama sa manjim sadržajem vode. Imajući u vidu to da se pik smrzavanja visokoprečišćene vode može očekivati na oko -17°C (Podlogar i sar., 2004), sasvim je izvesno da i u ovoj formulaciji postoji slaba, ali nezanemarljiva interakcija molekula vode sa molekulima surfaktanta i kosurfaktanta. Bez obzira na to, ova frakcija vode se može smatrati slobodnom, što dalje ukazuje na prisustvo U/V mikroemulzije, što je i pretpostavljeno na osnovu studija provodljivosti.

Interesantno, posmatrajući rezultate analize formulacija ECV 20 i ICV 20, na DSC termogramu (Slika 4-7) nije moguće uočiti pik smrzavanja vode, što može ukazivati na to da ove formulacije poseduju V/U mikrostrukturu iako maseni odnosi masne faze (24 %) i vode (20 %, **Error! Not a valid bookmark self-reference.**), kao i rezultati studije provodljivosti ukazuju na to da one pripadaju bikontinuiranom tipu mikroemulzija. Međutim, odsustvo pika smrzavanja vode uočeno je i kod svih formulacija u kojima je korišćena smeša propilenglikola i vode: ECPG 35 i

ICPG 35 koje bi trebalo da poseduju bikontinuiranu strukturu, ECPG 70 i ICPG 70 za koje je pretpostavljena U/V struktura. To se može objasniti relativno velikim sadržajem etanola, izopropanola i propilenglikola u poređenju sa sadržajem vode, koji ispoljavaju krioprotektivna svojstva i intenzivno vezuju vodu, sprečavajući njeno smrzavanje iako se ona može nalaziti potpuno ili delimično u sklopu spoljašnje, kontinuirane faze (Goebel i sar., 2011). Stoga, detaljnije informacije o unutrašnjoj strukturi ovih sistema nije moguće dobiti korišćenjem metode termalne analize. Ovaj rezultat ukazuje na važnost komplementarnog pristupa i korišćenja različitih metoda u cilju određivanja unutrašnje strukture mikroemulzija.

Tabela 4-3 Sadržaj odabranih mikroemulzionih formulacija korišćenih u ispitivanju strukture mikroemulzija primenom DSC tehnike. Pojedine od navedenih formulacija korišćene su u daljim eksperimentima.

Oznaka formulacije	Odnos						
	surfaktant-primarni kosurfaktant / masna faza	Lecitin (%)	Etanol (%)	Izopropanol (%)	Propilen-glikol (%)	Capryol® 90 (%)	Voda (%)
ECV 20	7:3	28	28	-	-	24	20
ECV 35	7:3	22,75	22,75	-	-	19,5	35
ICV 20	7:3	28	-	28	-	24	20
ICV 35	7:3	22,75	-	22,75	-	19,5	35
ICV 8 35	8:2	32	-	32	-	16	35
ICV 60	8:2	16	-	16	-	8	60
ECPG 35	7:3	22,75	22,75	-	17,5	19,5	17,5
ECPG 70	7:3	10,5	10,5	-	35	9	35
ICPG 35	7:3	22,75	-	22,75	17,5	19,5	17,5
ICPG 70	7:3	10,5	-	10,5	35	9	35



Slika 4-7 DSC krive hlađenja uzoraka mikroemulzija označenih na slici Slika 4-6 i u tabeli DSC krive hlađenja formulacija odabranih u studiji provodljivosti prikazane su na slici Slika 4-7, dok je detaljni sadržaj ovih formulacija prikazan u tabeli **Error! Not a valid bookmark self-reference.** Važno je napomenuti da DSC krive hlađenja sistema surfaktant-kosurfaktant/masna faza bez dodatka vodene faze ne ispoljavaju bilo kakve termalne promene. Stoga, sasvim je izvesno da egzotermni pik koji se može uočiti analizom formulacija ECV 35, ICV 35, ICV 8 35 i ICV 60 potiče od zamrzavanja vodene faze. Termodinamički parametri dobijenih pikova prikazani su u tabeli Tabela 4-4. Pik smrzavanja vodene faze u formulaciji ECV 35 postignut je pri temperaturi od $-44,00^{\circ}\text{C}$, dok su pikovi smrzavanja vodene faze u formulacijama ICV 35 i ICV 8 35 skoro identični i nalaze se na $-51,55^{\circ}\text{C}$, odnosno $-51,33^{\circ}\text{C}$, što ne iznenađuje imajući u vidu da se ove dve formulacije razlikuju samo po odnosu surfaktant-kosurfaktant/masna faza i za obe je pretpostavljena bikontinuirana struktura u studijama provodljivosti. Ipak, s obzirom na to da ICV 8 35 sadrži značajno veći maseni udeo lecitina i izopropanola (Tabela 4-3) bilo je značajno proveriti i uporediti termalno ponašanje vodene faze u ovim formulacijama. Smrzavanje vodene faze na ovako niskim temperaturama ukazuje na jaku interakciju molekula vode sa surfaktantom i kosurfaktantima, te se stoga može zaključiti da se ona nalazi u vezanom stanju, što dodatno potvrđuje bikontinuiranu strukturu ovih mikroemulzija. Niža temperatura smrzavanja vodene faze kada je korišćen izopropanol kao kosurfaktant ukazuje na jaču interakciju molekula vode sa izopropanolom u poređenju sa etanolom. Termalnom analizom formulacije ICV 60, može se uočiti oštar egzotermni pik smrzavanja vode na relativno višoj temperaturi ($-25,86^{\circ}\text{C}$) u poređenju sa prethodno pomenutim formulacijama sa manjim sadržajem vode. Imajući u vidu to da se pik smrzavanja visokoprečišćene vode može očekivati na oko -17°C (Podlogar i sar., 2004), sasvim je izvesno da i u ovoj formulaciji postoji slaba, ali nezanemarljiva interakcija molekula vode sa molekulima surfaktanta i kosurfaktanta. Bez obzira na to, ova frakcija vode se može smatrati slobodnom, što dalje ukazuje na prisustvo U/V mikroemulzije, što je i pretpostavljeno na osnovu studija provodljivosti.

Interesantno, posmatrajući rezultate analize formulacija ECV 20 i ICV 20, na DSC termogramu (Slika 4-7) nije moguće uočiti pik smrzavanja vode, što može ukazivati na to da ove

formulacije poseduju V/U mikrostrukturu iako maseni odnosi masne faze (24 %) i vode (20 %, **Error! Not a valid bookmark self-reference.**), kao i rezultati studije provodljivosti ukazuju na to da one pripadaju bikontinuiranom tipu mikroemulzija. Međutim, odsustvo pika smrzavanja vode uočeno je i kod svih formulacija u kojima je korišćena smeša propilenglikola i vode: ECPG 35 i ICPG 35 koje bi trebalo da poseduju bikontinuiranu strukturu, ECPG 70 i ICPG 70 za koje je pretpostavljena U/V struktura. To se može objasniti relativno velikim sadržajem etanola, izopropanola i propilenglikola u poređenju sa sadržajem vode, koji ispoljavaju krioprotektivna svojstva i intenzivno vezuju vodu, sprečavajući njeno smrzavanje iako se ona može nalaziti potpuno ili delimično u sklopu spoljašnje, kontinuirane faze (Goebel i sar., 2011). Stoga, detaljnije informacije o unutrašnjoj strukturi ovih sistema nije moguće dobiti korišćenjem metode termalne analize. Ovaj rezultat ukazuje na važnost komplementarnog pristupa i korišćenja različitih metoda u cilju određivanja unutrašnje strukture mikroemulzija.

Tabela 4-3 sa različitim sadržajem vodene faze u sistemima lecitin-etanol/Capryol[®] 90/visokoprečišćena voda, lecitin-izopropanol/ Capryol[®] 90/visokoprečišćena voda, lecitin-etanol/ Capryol[®] 90/voda-propilenglikol i lecitin-izopropanol/ Capryol[®] 90/voda-propilenglikol.

Tabela 4-4 Termodinamički parametri pika vodene faze prilikom hlađenja uzoraka.

Formulacija	ECV 35	ICV 35	ICV 8 35	ICV 60
Entalpija (J/g)	3,53	3,22	3,28	9,32
Temperatura početka promene (°C)	-41,17	-44,55	-48,50	-24,58
Temperatura pika (°C)	-44,00	-51,55	-51,33	-25,86

4.2 Rezultati i diskusija druge faze ispitivanja

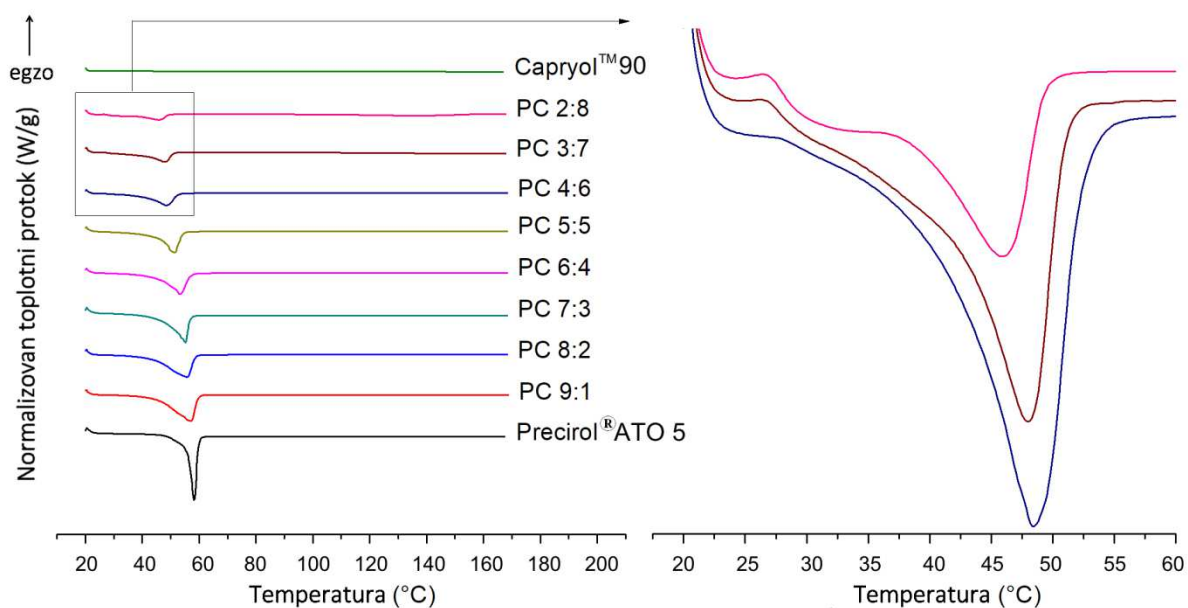
4.2.1 Razvoj nanostrukturiranih lipidnih čestica - preliminarni odabir smeše čvrstog i tečnog lipida

Imajući u vidu rezultate studije rastvorljivosti takrolimusa, koji ukazuju na zadovoljavajuću rastvorljivost u propilenglikol monokaprilatu (Capryol[®] 90), kao i mogućnost dobijanja mikroemulzija zasnovanih na lecitinu upravo korišćenjem ovog ulja, odlučeno je da se ista masna faza koristi kao tečni lipid/ulje u izradi nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzija. Rezultati preliminarne vizuelne procene mešanja odabranih čvrstih lipida (Dynasan[®] 114, Dynasan[®] 118, Precirol[®] ATO 5) sa ovim tečnim lipidom u masenim odnosima 6:4, 5:5 i 4:6 ukazali su na to da jedino primenom Precirol[®] ATO 5 ne dolazi do odvajanja kapi tečnog lipida iz lipidnog matriksa u ispitivanom masenom odnosu, dok je primenom druga dva čvrsta lipida bilo moguće vizuelno uočiti izdvojene kapi tečnog lipida na površini čvrste smeše. Stoga je Precirol[®] ATO 5 odabran kao čvrsti lipid za nastavak ispitivanja, dok su dalje studije sa Dynasan[®] 114 i Dynasan[®] 118 obustavljene.

Kako bi se odabrao optimalni maseni odnos čvrstog i tečnog lipida za izradu nanostrukturiranih lipidnih čestica, temperature topljenja odgovarajućih smeša u masenim odnosima od 9:1 do 2:8 su analizirane primenom DSC tehnike. Naime, dodatkom tečnog lipida čvrstoj masnoj fazi dolazi do povećanja nesavršenosti kristalne rešetke. Kao posledica toga, može se uočiti smanjenje temperature topljenja odgovarajuće smeše u poređenju sa temperaturom topljenja samog čvrstog lipida (Beloqui i sar., 2016; Montenegro i sar., 2016; Müller i sar., 2002). Stoga je DSC jedna od tehnika koja se često koristi za procenu kristaliniteta masne faze u preformulacionom razvoju nanostrukturiranih lipidnih čestica. U cilju što boljeg rastvaranja takrolimusa i smanjenja mogućnosti njegove ekspulzije iz lipidnog matriksa tokom skladištenja, poželjno je da formulacije sadrže što veći maseni udeo tečnog lipida. S druge strane, preduslov za nastanak nanostrukturiranih lipidnih čestica je da odabrani lipidni matriks bude u čvrstom agregatnom stanju na sobnoj temperaturi i telesnoj temperaturi (Montenegro i sar., 2016), što ograničava količinu tečnog lipida koja se može inkorporirati. Dodatno, inkorporiranje velike količine tečnog lipida može smanjiti okluziju kože i time može nepovoljno uticati na dermalnu raspoloživost aktivne supstance (Teeranachaideekul i sar., 2008).

DSC termogrami ispitivanih smeša prikazani su na slici Slika 4-8, dok su odgovarajući termodinamički parametri dati u tabeli Tabela 4-5. Ukratko, kao što je i očekivano, dodatak tečnog lipida značajno je smanjio tačku topljenja Precirol[®] ATO 5. Ipak, sve ispitivane smeše su bile u čvrstom stanju na sobnoj temperaturi i nisu ispoljile istiskivanje uljanih kapi iz lipidnog matriksa. Jedino je smeša čvrstog i tečnog lipida u masenom odnosu 1:9 imala polučvrste karakteristike, te stoga nije analiziran korišćenjem DSC tehnike.

Interesantno, detaljnijim posmatranjem DSC termograma smeša sa najvišim udelom tečnog lipida (2:8, Slika 4-8 desno) može se zapaziti postojanje dva endotermna pika i to na temperaturi od 34,17°C i 45,83°C. Poznato je da Precirol[®] ATO 5 ima polimorfne oblike koji mogu da se uoče na DSC termogramima primenom intenzivnih ciklusa grejanja i hlađenja čvrstog lipida, posebno ukoliko se uzorak čvrstog lipida pre analize najpre rastopi, a potom naglo ohladi do sobne temperature (Hamdani i sar., 2003). Ipak, isti autori uočili su da nakon nedelju dana skladištenja dolazi do postepene transformacije ovih polimorfnih oblika u stabilniju formu koja ima višu tačku topljenja i odgovara analizi čvrstog lipida koji nije podvrgnut intenzivnom grejanju i hlađenju. Ipak, naše ispitivanje je pokazalo formiranje polimorfnih oblika smeše čvrstog i tečnog lipida usled dodatka velike količine tečnog lipida, koji su prisutni i nedelju dana nakon pripreme uzorka. Prisustvo ovih polimorfnih oblika se ne može uočiti na DSC termogramu smeše čvrstog i tečnog lipida u masenom odnosu 4:6. Na osnovu toga, kao i kako bi se postigla dovoljna količina tečnog lipida u lipidnom matriksu, koja bi mogla da osigura rastvaranje takrolimusa u terapijskoj koncentraciji, odlučeno je ograničiti maseni odnos čvrstog i tečnog lipida koji će biti korišćen u izradi nanostrukturiranih lipidnih čestica na 4:6, 5:5 i 6:4.



Slika 4-8 DSC termogrami smeša čvrstog lipida (Precirol® ATO 5) i tečnog lipida (Capryol® 90) u različitim masenim odnosima (levo) i uvećani prikaz endoterminih pikova u smešama sa visokim sadržajem tečnog lipida (desno).

Tabela 4-5 Termodinamički parametri DSC analize smeše čvrstog lipida (Precirol® ATO 5) i tečnog lipida (Capryol® 90) u različitim masenim odnosima.

Odnos čvrstog i tečnog lipida			
lipida	Početak promene (°C)	Pik promene (°C)	Entalpija (J/g)
2:8	26,87/34,79	34,17/45,83	32,68
3:7	39,06	48,00	51,57
4:6	39,97	48,50	63,07
5:5	42,42	51,33	81,51
6:4	43,57	53,33	93,25
7:3	44,21	55,17	102,68
8:2	43,06	55,83	122,65
9:1	43,68	57,00	133,19
10:0	55,03	58,33	119,85

4.2.2 Odabir formulacija nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzije

Već u ranijim fazama preformulacione studije, uočen je snažan uticaj ukupne količine lipidne faze na mogućnost dobijanja tečnih nanostrukturiranih lipidnih čestica. Naime, preliminarne formulacije koje su sadržale više od 10 % ukupne masne faze, iako su bile tačne nakon izrade, postepeno su promenile reološke osobine i formirale gelove tokom prvih par sati nakon njihove izrade. Dalje, pokušaj izrade formulacija bez lecitina, korišćenjem samo polisorbata 80, pokazao se kao neuspešan jer je relativno brzo nakon izrade formulacija bilo moguće vizuelno uočiti formiranje agregata i izdvajanje masne faze po površini formulacije.

Tabela 4-6 Sadržaj odabranih formulacija nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzije.

Formulacija	Lipoid S75 (%)	Precirol®			Polisorbat	
		ATO (%)	5 Capryol®	BHT* (%)	80 (%)	Voda (%)
PCLP 6:4	1	6	4	0,05	1	87,95
PCLP 5:5	1	5	5	0,05	1	87,95
PCLP 4:6	1	4	6	0,05	1	87,95
PCLP 2:3	1	2	3	0,05	1	92,95
PCLP 4:6 B	2	4	6	0,05	2	85,95
PCLP 4:6 C	0,5	4	6	0,05	0,5	88,95
PCLP 4:6 D	1	4	6	0,05	-	88,95
CLP 10	1	-	10	0,05	1	87,95

*Butilhidroksitoluen

Na osnovu preliminarnih rezultata, a kako bi se procenio uticaj odgovarajućih formulacionih parametara (ukupne količine lipida, odnosa čvrstog i tečnog lipida, količina surfaktanata), odabrane su formulacije prikazane u tabeli Tabela 4-6 koje će biti podvrgnute daljoj karakterizaciji u nastavku ispitivanja. Kao što je i očekivano, bilo je moguće izraditi sve formulacije korišćenjem istog proizvodnog postupka - homogenizacije pod visokim pritiskom uz zagrevanje, dok će detaljniji efekat ispitivanih faktora biti opisan u sklopu fizičko-hemijske karakterizacije nosača.

Formulacija PCLP 4:6, koja sadrži 10 % ukupne masne faze i u kojoj je odnos čvrstog i tečnog lipida 4:6, odabrana je kao standard za održavanje faktora formulacije konstantnim pri variranju procesnih parametara usled zadovoljavajućih preliminarnih rezultata njene stabilnosti. Stoga su pripremljene još tri formulacije koje su izrađene variranjem procesnih parametara:

- PCLP 500 bara (formulacija izrađena pri pritisku homogenizacije od 500 bara umesto 800 bara);
- PCLP 10 ciklusa (formulacija izrađena primenjivanjem 10 umesto 5 ciklusa homogenizacije);

- PCLP I.H. (formulacija dobijena intenzivnim hlađenjem u ledenom kupatilu nakon homogenizacije pod visokim pritiskom, umesto postepenim hlađenjem na sobnoj temperaturi).

Ove formulacije nisu navedene u tabeli Tabela 4-6 budući da imaju isti sastav kao formulacija PCLP 4:6. Interesantno, formulacija PCLP I.H. je ispoljavala polučvrste karakteristike odmah nakon izrade, što ukazuje na to da temperatura tokom hlađenja igra značajnu ulogu kao procesni parametar koji se mora uzeti u obzir kako bi se izbeglo geliranje formulacija. Variranje pritiska tokom homogenizacije i broja ciklusa homogenizacije nije ispoljilo toliko drastičan efekat na dobijene formulacije. Ipak, detaljniji uticaj ovih procesnih parametara biće opisan u sledećem poglavlju, u sklopu fizičko-hemijske karakterizacije nosača.

Dodatno, po uzoru na formulaciju PCLP 4:6, uspešno je napravljena nanoemulzija CLP 10, kod koje je celokupna količina masne faze izrađena od tečnog lipida. Mogućnost dobijanja nanoemulzije korišćenjem istog proizvodnog postupka i iste količine masne faze i surfaktanta je od velikog značaja kako bi se direktno mogle uporediti fizičko-hemijske karakteristike ovih strukturno različitih nosača, kao i njihov efekat na isporuku lekovite supstance u kožu.

4.3 Rezultati i diskusija treće faze ispitivanja

4.3.1 Fizičko-hemijska karakterizacija i stabilnost mikroemulzija

4.3.1.1 Veličina kapi i indeks polidisperziteta

Imajući u vidu unutrašnju strukturu različitih tipova mikroemulzija, određivanje veličine kapi unutrašnje faze u ovim sistemima relevantno je samo u slučaju prisustva U/V mikroemulzija ili V/U mikroemulzija, pošto se kod bikontinuiranih mikroemulzija unutrašnja struktura sastoji od isprepletanih segmenata uljane i vodene faze, koji ne poseduju tipičnu kapljičnu strukturu (Sahle i sar., 2012). Dodatno, pouzdano određivanje veličine kapi unutrašnje faze je posebno komplikovano s obzirom na to da se mikroemulzije, za razliku od nanoemulzija i nanostrukturiranih lipidnih čestica, ne mogu razblaživati vodom u dovoljnoj količini usled narušavanja njihove strukture. Razblaživanje prilikom korišćenja PCS tehnike je često poželjno kako bi se smanjila interakcije između kapi, i neutralisao uticaj variranja indeksa refrakcije spoljašnje, kontinuirane faze. Ipak, zbog narušavanja stabilnosti sistema, analiza veličine kapi i indeksa polidisperziteta odabranih uzoraka U/V mikroemulzija sprovedena je bez razblaživanja, a rezultati su prikazani u tabeli Tabela 4-7.

Tabela 4-7 Veličina kapi i indeks polidisperziteta odabranih uzoraka ulje u vodi mikroemulzija, srednja vrednost \pm standardna devijacija, n = 3.

Formulacija	Veličina kapi (nm)		Indeks polidisperziteta	
	Inicijalno	Nakon skladištenja ^a	Inicijalno	Nakon skladištenja ^a
ECPG 70	76,14 \pm 0,03	77,44 \pm 0,64	0,14 \pm 0,02	0,14 \pm 0,01
ICV 60	19,39 \pm 0,11	20,04 \pm 0,22	0,39 \pm 0,05	0,28 \pm 0,01
ICPG 70	41,49 \pm 1,11	45,47 \pm 0,58	0,2 \pm 0,04	0,11 \pm 0,01

^a Formulacije su skladištene tokom godinu dana na sobnoj temperaturi.

Najmanja veličina kapi unutrašnje faze uočena je kod formulacije ICV 60. Dodatno, ova formulacija ispoljava bimodalnu raspodelu veličine kapi koja je uzrok relativno velikom indeksu polidisperziteta. Naime, analizom ovog uzorka može se uočiti prisustvo dominantnog pika površine 89,7 % sa srednjom vrednošću veličine kapi od 31,82 nm, i sporednog pika površine 10,3 % koji ukazuje na prisustvo entiteta dijametra 3,96 nm. Postojanje sporednog pika najverovatnije je posledica prisustva micela u formulaciji budući da je sličan pik uočen pri analizi vodenog rastvora surfaktanta i kosurfaktanta u istom masenom odnosu, bez dodatka masne faze. Ovaj sporedni pik nije uočen pri analizi formulacija ECPG 70 i ICPG 70, koje pokazuju unimodalnu raspodelu veličine kapi sa niskim indeksom polidisperziteta ($\leq 0,2$). Interesantno, ove formulacije imaju veću veličinu kapi unutrašnje faze od formulacije ICV 60, što se može objasniti značajno nižim sadržajem lecitina (10,5 % vs. 22 %), kao i relativno višim sadržajem ulja (8 % vs. 9 %, DSC krive hlađenja formulacija odabranih u studiji provodljivosti prikazane su na slici Slika 4-7, dok je detaljni sadržaj ovih formulacija prikazan u tabeli **Error! Not a valid bookmark self-reference.** Važno je napomenuti da DSC krive hlađenja sistema surfaktant-kosurfaktant/masna faza bez dodatka vodene faze ne ispoljavaju bilo kakve termalne promene. Stoga, sasvim je izvesno da egzotermni pik koji se može uočiti analizom formulacija ECV 35, ICV 35, ICV 8 35 i ICV 60 potiče

od zamrzavanja vodene faze. Termodinamički parametri dobijenih pikova prikazani su u tabeli Tabela 4-4. Pik smrzavanja vodene faze u formulaciji ECV 35 postignut je pri temperaturi od -44,00°C, dok su pikovi smrzavanja vodene faze u formulacijama ICV 35 i ICV 8 35 skoro identični i nalaze se na -51,55°C, odnosno -51,33°C, što ne iznenađuje imajući u vidu da se ove dve formulacije razlikuju samo po odnosu surfaktant-kosurfaktant/masna faza i za obe je pretpostavljena bikontinuirana struktura u studijama provodljivosti. Ipak, s obzirom na to da ICV 8 35 sadrži značajno veći maseni udeo lecitina i izopropanola (Tabela 4-3) bilo je značajno proveriti i uporediti termalno ponašanje vodene faze u ovim formulacijama. Smrzavanje vodene faze na ovako niskim temperaturama ukazuje na jaku interakciju molekula vode sa surfaktantom i kosurfaktantima, te se stoga može zaključiti da se ona nalazi u vezanom stanju, što dodatno potvrđuje bikontinuiranu strukturu ovih mikroemulzija. Niža temperatura smrzavanja vodene faze kada je korišćen izopropanol kao kosurfaktant ukazuje na jaču interakciju molekula vode sa izopropanolom u poređenju sa etanolom. Termalnom analizom formulacije ICV 60, može se uočiti oštar egzotermni pik smrzavanja vode na relativno višoj temperaturi (-25.86°C) u poređenju sa prethodno pomenutim formulacijama sa manjim sadržajem vode. Imajući u vidu to da se pik smrzavanja visokoprečišćene vode može očekivati na oko -17°C (Podlogar i sar., 2004), sasvim je izvesno da i u ovoj formulaciji postoji slaba, ali nezanemarljiva interakcija molekula vode sa molekulima surfaktanta i kosurfaktanta. Bez obzira na to, ova frakcija vode se može smatrati slobodnom, što dalje ukazuje na prisustvo U/V mikroemulzije, što je i pretpostavljeno na osnovu studija provodljivosti.

Interesantno, posmatrajući rezultate analize formulacija ECV 20 i ICV 20, na DSC termogramu (Slika 4-7) nije moguće uočiti pik smrzavanja vode, što može ukazivati na to da ove formulacije poseduju V/U mikrostrukturu iako maseni odnosi masne faze (24 %) i vode (20 %, **Error! Not a valid bookmark self-reference.**), kao i rezultati studije provodljivosti ukazuju na to da one pripadaju bikontinuiranom tipu mikroemulzija. Međutim, odsustvo pika smrzavanja vode uočeno je i kod svih formulacija u kojima je korišćena smeša propilenglikola i vode: ECPG 35 i ICPG 35 koje bi trebalo da poseduju bikontinuiranu strukturu, ECPG 70 i ICPG 70 za koje je pretpostavljena U/V struktura. To se može objasniti relativno velikim sadržajem etanola, izopropanola i propilenglikola u poređenju sa sadržajem vode, koji ispoljavaju krioprotektivna svojstva i intenzivno vezuju vodu, sprečavajući njeno smrzavanje iako se ona može nalaziti potpuno ili delimično u sklopu spoljašnje, kontinuirane faze (Goebel i sar., 2011). Stoga, detaljnije informacije o unutrašnjoj strukturi ovih sistema nije moguće dobiti korišćenjem metode termalne analize. Ovaj rezultat ukazuje na važnost komplementarnog pristupa i korišćenja različitih metoda u cilju određivanja unutrašnje strukture mikroemulzija.

Tabela 4-3). Ovo je u skladu sa rezultatima drugih istraživačkih grupa (Moreno i sar., 2003; Pestana i sar., 2008).

Poređenjem formulacije ECPG 70 i ICPG 70, koje sadrže isti maseni odnos surfaktanta, kosurfaktanta, masne i vodene faze, a razlikuju se jedino po primenjenom kosurfaktantu (etanol ili izopropanol), može se uočiti to da formulacija ICPG 70 ima značajno manju veličinu kapi unutrašnje faze. Najverovatniji razlog tome je nastajanje fleksibilnijeg međupovršinskog filma pri primeni izopropanola u poređenju sa etanolom, koji omogućava lakši nastanak mikroemulzija i njihovu bolju stabilizaciju, što je u skladu sa rezultatima ispitivanja mogućnosti formiranja mikroemulzionih regiona na pseudoternarnim faznim dijagramima, koji su diskutovani u odeljku 4.1.2.1.

4.3.1.2 *pH i provodljivost mikroemulzija*

Sve ispitivane mikroemulzije formulacije imaju pH vrednost manju od 7 (Tabela 4-8). Imajući u vidu mogućnost degradacije takrolimusa u baznim sredinama (Skak i Hansen, 2016), umereno kisela sredina formulacija je pogodna kako bi se dodatno osigurala stabilnost ove aktivne supstance, a takođe je prihvatljiva za dermalnu primenu.

Rezultati merenja provodljivosti odabranih mikroemulzija ukazuju na generalno nisku provodljivost (Tabela 4-8), što je u skladu sa očekivanjima imajući u vidu to da su eksperimenti sprovedeni bez dodatka eksternih elektrolita kako ne bi došlo do narušavanja mikroemulzionog sistema (Podlogar i sar., 2004). Iako je glavni cilj studija provodljivosti zapravo određivanje unutrašnje strukture mikroemulzija tokom postepenog razblaživanja, što je i opisano u poglavlju 4.1.3.1, merenje provodljivosti odabranih formulacija tokom skladištenja može da ukaže na promene u stabilnosti formulacije.

Tabela 4-8 pH, provodljivost i viskozitet odabranih mikroemulzionih formulacija, srednja vrednost \pm standardna devijacija, n=3.

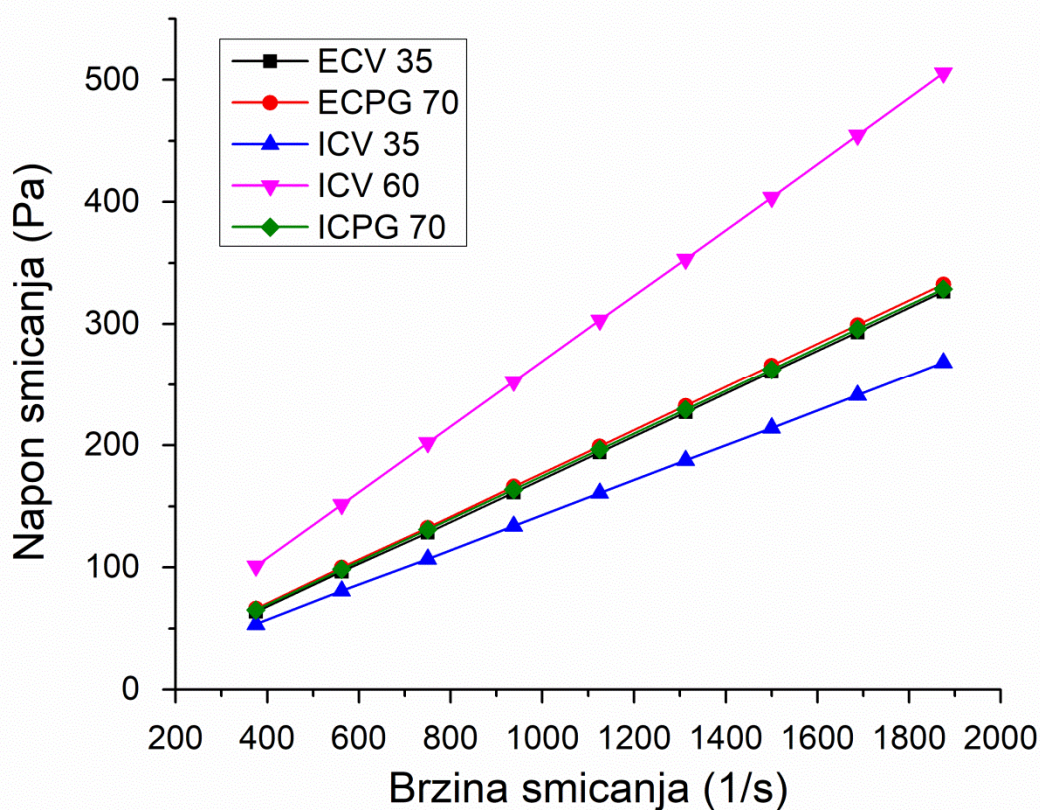
Formulacija	pH		Provodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$)		Viskozitet (mPa*s)
	Inicijalno	Nakon skladištenja ^a	Inicijalno	Nakon skladištenja ^a	
ECV 35	5,82 \pm 0,02	5,00 \pm 0,02	158,93 \pm 0,32	162,77 \pm 0,55	17,24 \pm 0,21
ECPG 70	5,65 \pm 0,01	5,04 \pm 0,02	60,1 \pm 0,36	68,67 \pm 0,25	18,49 \pm 0,72
ICV 35	5,78 \pm 0,02	4,95 \pm 0,02	137,10 \pm 0,60	146,6 \pm 0,40	15,49 \pm 1,07
ICV 60	5,58 \pm 0,01	4,57 \pm 0,01	186,9 \pm 0,70	191,03 \pm 0,35	29,71 \pm 2,40
ICPG 70	5,69 \pm 0,02	5,05 \pm 0,01	58,82 \pm 0,38	65,27 \pm 0,40	16,46 \pm 0,81

^a Formulacije su skladištene tokom godinu dana na sobnoj temperaturi.

4.3.1.3 Reološke karakteristike mikroemulzija

Krive tečenja mikroemulzija, izražene kao zavisnost napona smicanja od brzine smicanja, prikazane su na slici Slika 4-9. Kod svih mikroemulzija uočeno je linearno povećanje napona smicanja sa porastom brzine smicanja, što ukazuje na to da se ispitivani uzorci ponašaju kao njutnovske tečnosti. Ovo je u skladu sa literaturnim podacima o reološkim karakteristikama mikroemulzija (Sahle i sar., 2013; Todosijević i sar., 2015).

Ispitivane mikroemulzije imaju niske vrednosti prividnog viskoziteta (Tabela 4-8), što, zajedno sa odsustvom anizotropije kada se uzorak posmatra pod polarizacionim mikroskopom, ukazuje na to da anizotropni agregati/tečni kristali nisu prisutni u uzorcima. Imajući u vidu da viskozitet mikroemulzija zavisi od masenog udela vodene faze i surfaktanata, očekivana je veća razlika u viskozitetu ispitivanih formulacija. Poređenjem formulacija ECV 35 i ICV 35, može se uočiti da primena izopropanola kao primarnog kosurfaktanta dovodi do nastajanja formulacija relativno nižeg viskoziteta od primene etanola kao kosurfaktanta. Interesantno, iako formulacije ECPG 70 i ICPG 70 sadrže relativno veliki maseni udeo propilenglikola (35 %), one nisu ispoljile značajno različite vrednosti viskoziteta u poređenju sa formulacijom ECV 35. Najveći viskozitet ispoljava formulacija ICV 60, koja sadrži najveći maseni udeo vode.



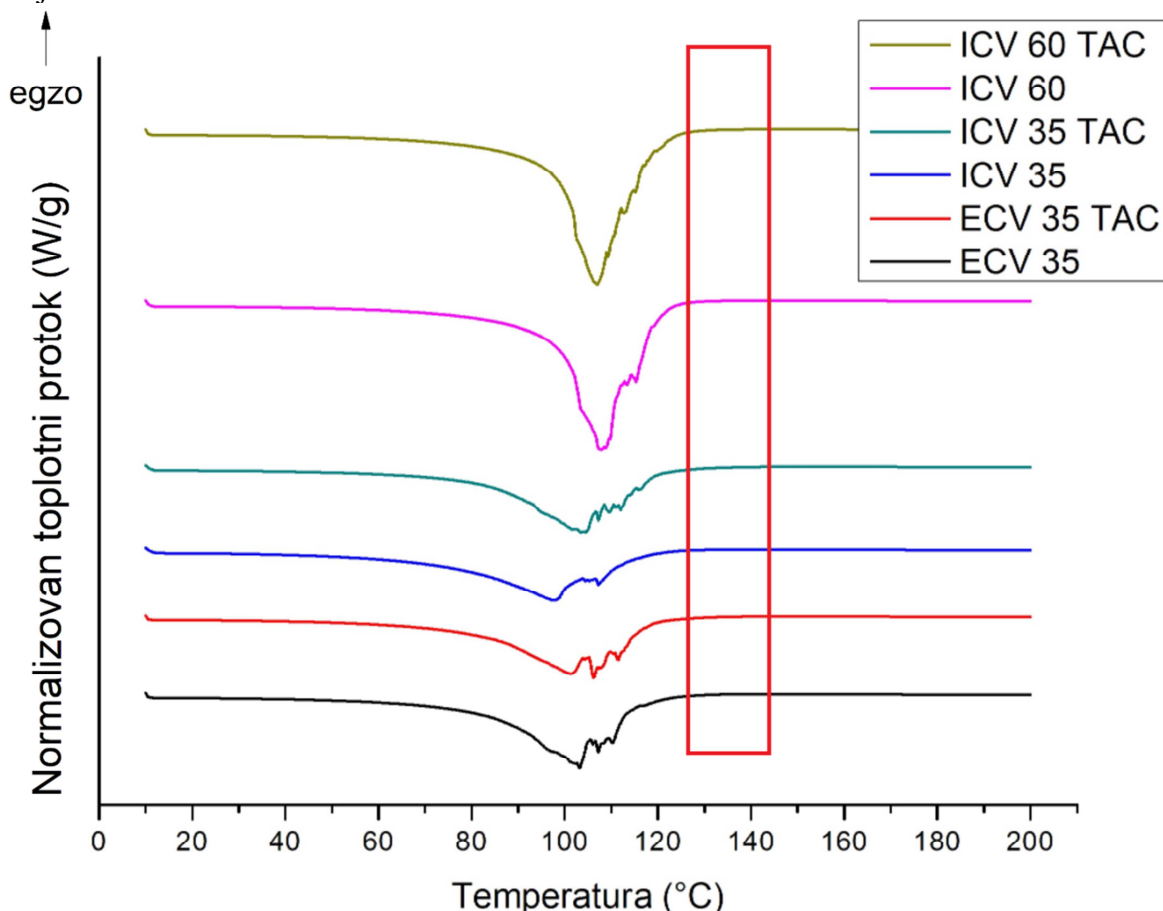
Slika 4-9 Krive tečenja placebo mikroemulzionih formulacija koje ukazuju na njutnovski tip tečenja formulacija (linearna zavisnost između napona smicanja i brzine smicanja).

Iako je u slučaju topikalne primene lekovitih supstanci nekada poželjno modifikovati/povećati viskozitet mikroemulzionih formulacija primenom odgovarajućih gelirajućih agenasa kako bi se olakšala njihova manipulacija tokom aplikacije, odlučeno je da se dalja ispitivanja sprovode bez dodatka gelirajućih agenasa iz više razloga. Naime, tečne formulacije se mogu lakše primenjivati na velikim površinama tela, kao i u kosmatim regionima, pogotovu u formi spreja za primenu na koži. Ovo je od posebnog značaja u tretmanu psorijaze, koja često zahvata relativno velike površine i kosmate regione. Dalje, dodatak gelirajućih agenasa i drugih ekscipijenasa može dovesti do promene strukture mikroemulzije i/ili narušavanja mikroemulzionog sistema. Konačno, modifikacija viskoziteta značajno može da utiče na oslobađanje i dermalnu raspoloživost lekovite supstance, pri čemu je superiornost mikroemulzija u poređenju sa mikroemulzionim gelovima utvrđena u slučaju celekoksiba (Subramanian i sar., 2005).

4.3.1.4 Ispitivanje prisustva kristala takrolimusa u mikroemulzijama

S obzirom na to da se takrolimus vrlo slabo rastvara u vodi, nakon njegovog inkorporiranja u formulacijama on može biti rastvoren u masnoj fazi i/ili međupovršinskom filmu, ili se delimično može nalaziti u vidu nerastvorenih kristala. Kako bi se procenilo fizičko stanje takrolimusa u formulacijama, korišćena je DSC tehnika pri zagrevanju uzoraka, a rezultati su dodatno potvrđeni analizom uzoraka pod polarizacionim mikroskopom.

Tokom DSC analize pri zagrevanju nerastvorenog takrolimusa može se očekivati pojava endoternog pika na temperaturi između 128°C i 142°C, (Patel i sar., 2013; Zidan i sar., 2011), usled topljenja kristala takrolimusa. Pojava ovakvog pika može se očekivati i pri zagrevanju mikroemulzionih formulacija, ukoliko je takrolimus prisutan u nerastvornom obliku. DSC krive placebo bikontinuiranih (ECV 35, ICV 35) i U/V mikroemulzija (ICV 60), kao i mikroemulzija sa inkorporiranim takrolimusom (ECV 35 TAC, ICV 35 TAC, ICV 60 TAC) prikazane su na slici Slika 4-10. Za sve formulacije uočava se prisustvo endoternog pika u temperaturnom opsegu od 90°C do 120°C, koji se javlja usled evaporacije vode i alkohola iz mikroemulzija. Kao što je i očekivano, najveći endotermni pik uočen je kod formulacije ICV 60, jer ona poseduje najveći maseni udeo vode (60 %). Kod ispitivanih formulacija nije uočeno prisustvo endoternog pika u opsegu topljenja takrolimusa (Slika 4-10, crveni pravougaonik), što ukazuje na to da je takrolimus potpuno rastvoren u mikroemulzijama. Fizičko stanje takrolimusa dodatno je potvrđeno posmatranjem uzoraka pod polarizacionim mikroskopom, pri čemu nije uočeno postojanje kristala u formulacijama.



Slika 4-10 DSC-krive zagrevanja bikontinuiranih (ECV 35, ICV 35) i U/V (ICV 60) mikroemulzionih formulacija sa i bez inkorporiranog takrolimusa (TAC). Crveni pravougaonik označava temperaturni opseg u kome se očekuje topljenje eventualno prisutnih kristala takrolimusa.

4.3.1.5 EPR analiza mikroemulzionih formulacija

Primenom EPR tehnike praćena je promena u ponašanju spin proba sa nesparenim elektronom: 5-doksil stearinske kiseline (5-DSA) i 12-doksil stearinske kiseline (12-DSA, Tabela 3-1) nakon njihove inkorporacije u placebo mikroemulzije i mikroemulzije sa lekovitom supstancom. Ovom tehnikom moguće je steći uvid u fluidnost međupovršinskog filma, kao i detaljnije proceniti lokalizaciju takrolimusa i njegovo eventualno prisustvo u međupovršinskom filmu (Avramiotis i sar., 2007; Fanun i sar., 2011).

Na osnovu dobijenih EPR spektara izračunati su sledeći parametri: vreme rotacione korelacije (τ_R), izotropna konstanta hiperfinog cepanja (α'_0), i parametar uređenosti (S). Rezultati su prikazani u tabeli Tabela 4-9, dok su primeri EPR spektara predstavljeni na slici Slika 4-11. Poređenjem placebo formulacija, može se uočiti da su sve vrednosti vremena rotacione korelacije niže u slučaju bikontinuiranih mikroemulzija (ECV 35, ICV 35) u poređenju sa U/V mikroemulzijama (ICV 60, ECPG 70, ICPG 70). Niže vrednosti vremena rotacione korelacije ukazuju na veću mobilnost spin proba kada su one inkorporirane u bikontinuiranim mikroemulzijama usled nižeg mikroviskoziteta u njihovoj neposrednoj okolini, što dalje ukazuje na veću fluidnost i fleksibilnost međupovršinskog filma. Međupovršinski film u U/V mikroemulzijama je rigidniji, što za posledicu ima otežanu mobilnost proba i više vrednosti vremena rotacione korelacije. Takođe, pri faznom prelazu iz bikontinuirane (ICV 35) u U/V mikroemulziju (ICV 60) usled povećanja masenog udela vodene faze, može se uočiti značajni porast u vrednosti vremena rotacione korelacije pri korišćenju obe probe. Slične promene u dinamici međupovršinskog filma diskutovane su od strane Kalaitzaki i saradnika (2015a; 2015b), koji su zaključili da dodatak vodene faze smanjuje elastičnost međupovršinskog filma usled promene orijentacije molekula surfaktanta pri čemu oni bivaju gušće pakovani.

Dalje, poređenjem vrednosti vremena rotacione korelacije u formulacijama koje se razlikuju jedino u korišćenom kosurfaktantu (ECV 35 i ICV 35, kao i ECPG 70 i ICPG 70), može se uočiti da su vrednosti vremena rotacione korelacije 5-DSA probe dosta niže kada se koristi izopropanol umesto etanola, dok izabrani kosurfaktant ne utiče značajno na vremena rotacione korelacije 12-DSA probe. Ovo dodatno potvrđuje pretpostavku iz prve faze ispitivanja da izopropanol dovodi do formiranja fleksibilnijeg međupovršinskog filma od etanola, i to u regionima bližim polarnoj glavi surfaktanta, te se stoga vidi razlika u vrednostima vremena rotacione korelacije kada se koristi 5-DSA proba. Naime, kod 5-DSA probe se nespareni elektron prisutan u nitroksidnom prstenu nalazi bliže polarnoj glavi, dok je nespareni elektron u 12-DSA probi lokalizovan dublje u nepolarnom ugljovodoničnom lancu, pri čemu odabir kratkolančanog alkoholnog kosurfaktanta nema značajni uticaj na fluidnost ovog dela međupovršinskog filma.

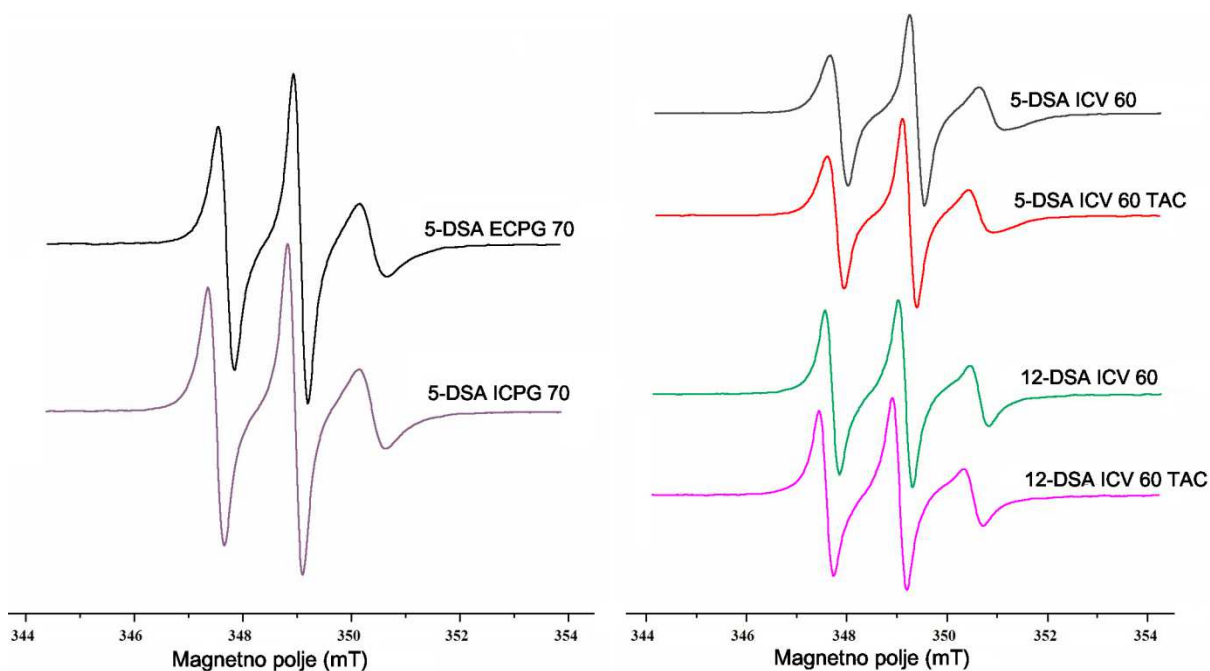
Rezultati dobijeni izračunavanjem parametra uređenosti (S) su u skladu sa rezultatima dobijenim analizom vremena rotacione korelacije. Naime, vrednost parametra uređenosti može varirati od 0 do 1, pri čemu vrednost $S = 0$ ukazuje na to da se spin proba nalazi u potpuno randomizovanom stanju, dok vrednost $S = 1$ ukazuje na prisustvo probe u potpuno uređenom stanju (Papadimitriou i sar., 2008). Promena u vrednosti parametra uređenosti oslikava promenu u dinamici međupovršinskog filma i to usled povećanja rigidnosti međupovršinskog filma dolazi do povećanja vrednosti parametra uređenosti. Analizom dobijenih vrednosti za parametar uređenosti (Tabela 4-9), može se uočiti to da nema značajne razlike u uređenosti međupovršinskog filma na različitoj udaljenosti od polarne glave kada su u pitanju bikontinuirane mikroemulzije (ECV 35 i ICV 35). Nasuprot tome, kod U/V mikroemulzija (ECPG 70, ICPG 70, ICV 60) prisutna je veća uređenost međupovršinskog filma u regionima bližim polarnoj glavi, gde je 5-DSA lokalizovana, dok se stepen uređenosti dubljih, lipofilnijih regiona međupovršinskog filma ne razlikuju značajno od bikontinuiranih mikroemulzija. Ovo ukazuje na veću rigidnost hidrofilijskih delova međupovršinskog filma u U/V mikroemulzijama u poređenju sa bikontinuiranim mikroemulzijama. Takođe, pri faznom prelazu iz bikontinuirane (ICV 35) u U/V mikroemulziju (ICV 60) usled dodatka vodene faze, može se uočiti povećanje vrednosti parametra uređenosti pri korišćenju 5-DSA probe.

Tabela 4-9 EPR analiza odabranih mikroemulzija τ_R - vreme rotacione korelacije, α'_o - izotropna konstanta hiperfinog cepanja, S - parametar uredenosti.

Formulacija	5-DSA			12-DSA		
	τ_R (ns)	α'_o ($\times 10^{-4}$ T)	S	τ_R (ns)	α'_o ($\times 10^{-4}$ T)	S
ECV 35	1,43 \pm 0,03	14,77 \pm 0,02	0,08 \pm 0,01	1,11	14,8	0,06
ECV 35 TAC	1,44 \pm 0,01	14,76 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	1,24	14,81	0,06
ICV 35	1,21 \pm 0,04	14,90 \pm 0,02	0,07 \pm 0,01	1,12	14,85	0,06
ICV 35 TAC	1,20 \pm 0,01	14,86 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	1,16	14,8	0,07
ICV 60	2,18 \pm 0,06	14,32 \pm 0,17	0,11 \pm 0,01	1,37	14,68	0,07
ICV 60 TAC	2,14 \pm 0,01	14,39 \pm 0,16	0,11 \pm 0,01	1,5	14,69	0,07
ECPG 70	2,20 \pm 0,06	14,42 \pm 0,05	0,12 \pm 0,01	1,75	14,7	0,07
ICPG 70	1,92 \pm 0,06	14,52 \pm 0,02	0,10 \pm 0,01	1,74	14,7	0,08

Praćenje izotropne konstante hiperfinog cepanja (α'_o) pruža uvid u polarnost okruženja sa kojim nitroksidni paramagnetski prsten interaguje. Povećanje ove vrednosti ukazuje na interakciju nitroksidnog prstena sa polarnijim okruženjem (Papadimitriou i sar., 2008). Placebo formulacije sa izopropanolom (ICV 35, ICPG 70) imaju relativno više vrednosti α'_o pri korišćenju 5-DSA probe od formulacija sa etanolom (ECV 35, ECPG 70). Ovaj rezultat dodatno potvrđuje rezultate i pretpostavku iz prve faze ispitivanja da izopropanol može bolje da penetrira u regione međupovršinskog filma u kojima je lokalizovan i nitroksidni prsten 5-DSA, čineći ih polarnijim, te je stoga olakšan nastanak mikroemulzionih sistema.

Prisustvo takrolimusa u odabranim bikontinuiranim (ECV 35 TAC, ICV 35 TAC) i U/V mikroemulzijama (ICV 60 TAC) nije značajno uticalo na vrednosti vremena rotacione korelacije kada je korišćena 5-DSA proba, dok su se ove vrednosti povećale u slučaju korišćenja 12-DSA probe. Dodatno, parametar uredenosti pri korišćenju oba tipa proba nije značajno promenjen nakon inkorporacije takrolimusa. Slično, nisu uočene značajne razlike u vrednostima izotropne hiperfine konstante cepanja, odnosno u polarnosti okruženja sa kojim nitroksidni prstenovi interaguju nakon inkorporacije lekovite supstance. Ovi rezultati ukazuju na odsustvo takrolimusa iz hidrofilnijih regiona međupovršinskog filma i njegovo delimično prisustvo u dubljim, lipofilnijim regionima međupovršinskog filma. Imajući u vidu izuzetno slabu rastvorljivost takrolimusa u vodi, odsustvo kristala nerastvorenog takrolimusa u formulacijama, i njegovu kompleksnu, lipofilnu strukturu, može se pretpostaviti da je takrolimus dominantno lokalizovan unutar masne faze (propilenglikol monokaprilata).



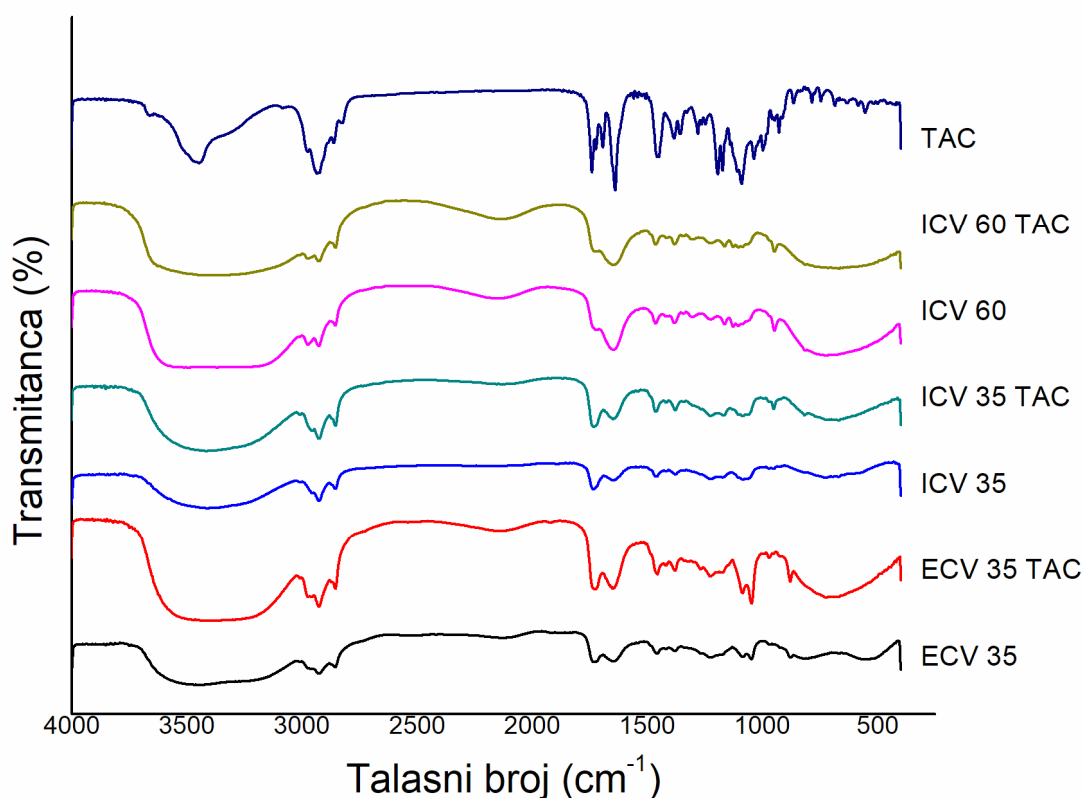
Slika 4-11 EPR spektri 5-doksil stearinske kiseline (5-DSA) u U/V mikroemulzionim formulacijama bez lekovite supstance (ECPG 70 i ICPG 70, levo). EPR spektri 5-doksil stearinske kiseline (5-DSA) i 12-doksil stearinske kiseline (12-DSA) u U/V mikroemulziji (ICV 60) sa i bez inkorporiranog takrolimusa (TAC).

Poređenjem EPR spektara formulacija prikazanih na slici Slika 4-11, može se uočiti to da odabir kratkolančanog alkohola kao kosurfaktanta i inkorporacija takrolimusa ne dovode do značajnih promena u EPR spektrima korišćenih spin proba sa nesparenim elektronom.

4.3.1.6 FTIR: ispitivanje interakcije takrolimusa sa mikroemulzijama

Kako mikroemulzije sadrže veliki maseni udeo surfaktanta i kosurfaktanta, određene interakcije između takrolimusa i mikroemulzionog nosača mogu biti očekivane. Kako bi se procenile ove interakcije, korišćena je FTIR tehnika. Na FTIR spektru čistog takrolimusa (Slika 4-12) može se uočiti široka apsorpciona traka usled vibracija rastezanja OH- grupe na 3460 cm^{-1} , zatim rezonantne amidiska i ketonska vibracija rastezanja pri 1740 cm^{-1} , 1724 cm^{-1} i 1694 cm^{-1} , C=C vibracija rastezanja na 1640 cm^{-1} , estarska C=O vibracija na 1192 cm^{-1} , kao i etarska C-O-C vibracija rastezanja na 1172 cm^{-1} i 1090 cm^{-1} . Slični rezultati dobijeni su i od strane drugih istraživačkih grupa (Patel i sar., 2013; Zidan i sar., 2011) i u saglasnosti su sa strukturom takrolimusa (Slika 1-1).

Analizom placebo mikroemulzionih formulacija, kao i mikroemulzija sa inkorporiranim takrolimusom, može se uočiti to da se veliki broj apsorpcionih traka preklapa sa trakama prisutnim u FTIR spektru čistog takrolimusa (Slika 4-12). Ovo je i očekivano, s obzirom na to da takrolimus ima kompleksnu strukturu i sadrži veliki broj funkcionalnih grupa koje su takođe prisutne u ekscipijensima korišćenim za izradu mikroemulzija. Poređenjem mikroemulzija sa i bez takrolimusa nije uočena pojava novih pikova ili značajno pomeranje pikova ka višim ili nižim talasnim brojevima. Ovo sugerše da ne dolazi do značajnih hemijskih interakcija između takrolimusa i surfaktanta, kosurfaktanta i/ili masne faze prisutne u mikroemulzijama, odnosno nisu uočene bilo kakve strukturne promene nakon inkorporacije takrolimusa.



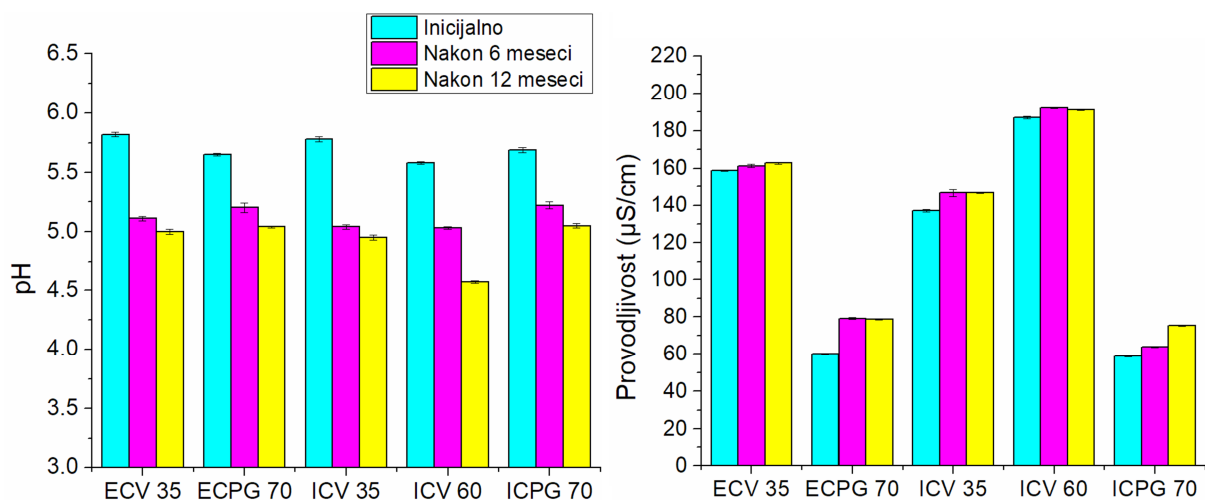
Slika 4-12 FTIR spektri čistog takrolimusa (TAC), kao i bikontinuiranih (ECV 35, ICV 35) i U/V mikroemulzija (ICV 60) sa i bez takrolimusa.

4.3.1.7 *Stabilnost mikroemulzionih formulacija*

Kako su mikroemulzije termodinamički stabilni sistemi koji se spontano formiraju, očekivano je da tokom godinu dana skladištenja ovih formulacija na sobnoj temperaturi neće doći do značajnih promena koje bi mogle narušiti njihovu strukturu. To je i potvrđeno u ovoj studiji, s obzirom da nije došlo do značajnih promena u njihovom izgledu, izotropnosti, veličini kapi, indeksu polidisperziteta i viskozitetu u poređenju sa inicijalnim vrednostima.

Ipak, tokom studije stabilnosti uočeno je postepeno smanjenje pH vrednosti (Tabela 4-8 i Slika 4-13), koje je najverovatnije posledica degradacije fosfolipida iz lecitina i oslobađanja slobodnih masnih kiselina. Promena pH vrednosti najizraženija je tokom prvih šest meseci studije, a ukupna promena pH vrednosti je u redu veličine jedne pH jedinice tokom godinu dana, pri čemu su formulacije i nakon skladištenja na sobnoj temperaturi u trajanju od godinu dana imale prihvatljive karakteristike za primenu na koži.

Slično tome, vrednosti provodljivosti mikroemulzija nakon godinu dana skladištenja su umereno porasle (Slika 4-13, desno), što je i očekivano usled postepene degradacije lecitina i generisanja dodatnog naelektrisanja koje doprinosi provodljivosti sistema. Ipak, ovaj porast i dalje ne ukazuje na promenu strukture mikroemulzija tokom skladištenja, što je i očekivano budući da njihova struktura dominantno zavisi od tipa surfaktanta, kosurfaktanta, masne faze i njihovog međusobnog odnosa, kao i količine vodene faze.

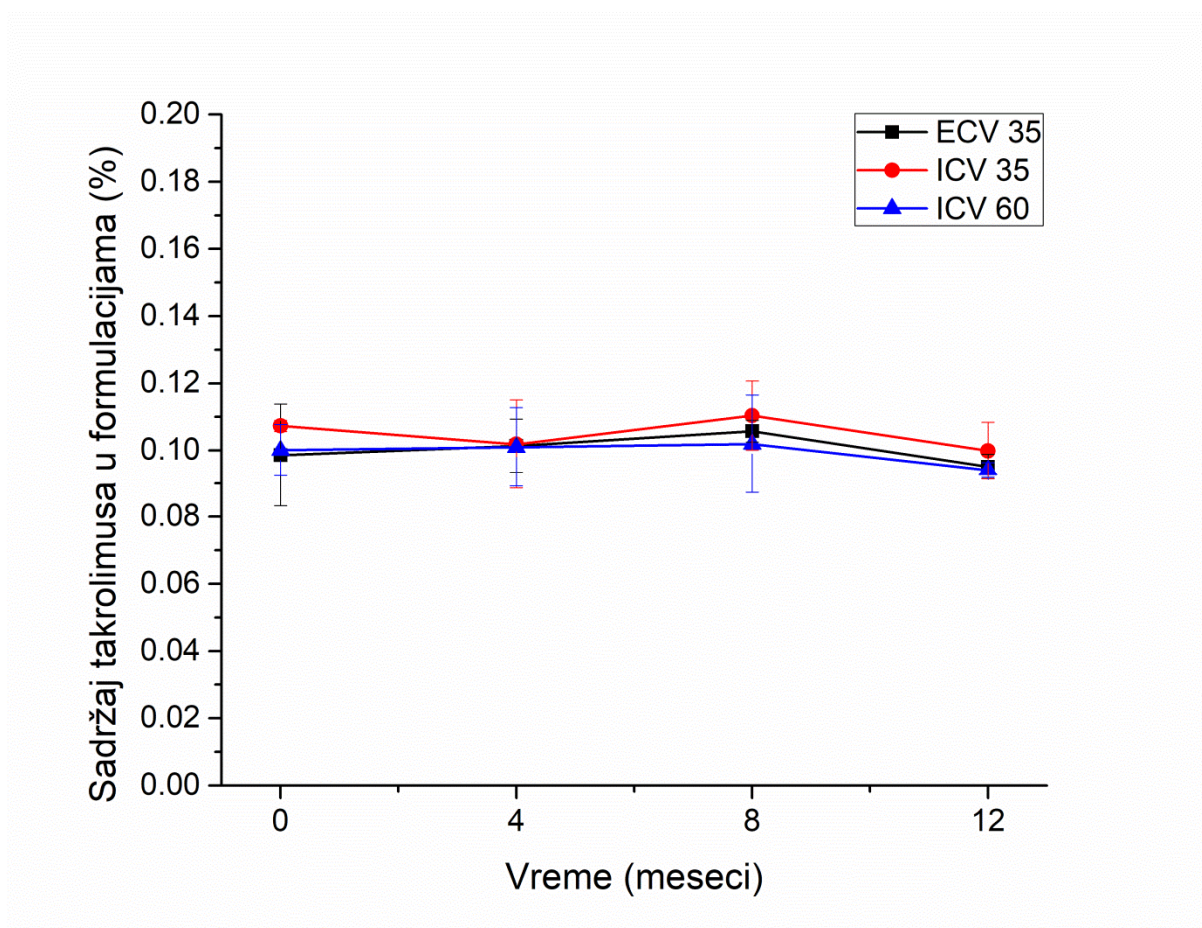


Slika 4-13 Grafički prikaz promene pH i provodljivosti mikroemulzija tokom sprovedene studije stabilnosti, srednja vrednost \pm standardna devijacija, $n = 3$.

4.3.1.8 *Stabilnost takrolimusa u mikroemulzionim formulacijama*

Imajući u vidu to da je takrolimus sklon hemijskoj degradaciji, pogotovu u medijumima kod kojih je $\text{pH} > 7$ (Skak i Hansen, 2016), od posebne je važnosti ispitati njegov sadržaj i njegovu eventualnu degradaciju tokom skladištenja. S obzirom na to da su mikroemulzije skladištene tokom najdužeg vremenskog perioda (godinu dana), ukoliko postoji potencijal degradacije takrolimusa, on bi najviše bio izražen nakon dugotrajnog čuvanja.

Kao što se može videti na slici Slika 4-14, tokom ispitivanog perioda skladištenja nije došlo do značajne degradacije takrolimusa u svim mikroemulzionim formulacijama, pri čemu je sadržaj takrolimusa varirao od 93 % do 107 % od početne vrednosti. Ovi preliminarni rezultati ukazuju na zadovoljavajuću stabilnost takrolimusa u mikroemulzijama, koja je postignuta pre svega zahvaljujući lokalizaciji takrolimusa unutar masne faze, kao što je zaključeno na osnovu rezultata EPR ispitivanja (poglavlje 4.3.1.5). Ovim je smanjena mogućnost oksidativne degradacije takrolimusa čime se poboljšava njegova stabilnost. Takođe, blago kisela pH vrednost samih mikroemulzionih formulacija je mogla značajno doprineti poboljšanju stabilnosti takrolimusa s obzirom da u baznoj sredini može doći do narušavanja njegove strukture i otvaranja makrolidnog prstena. Svakako, demonstrirana stabilnost mikroemulzija sa takrolimusom u periodu od godinu dana je solidna osnova za definisanje prihvatljivog roka upotrebe ukoliko bi se ovakve formulacije proizvodile industrijski.



Slika 4-14 Određivanje sadržaja takrolimusa u mikroemulzionim formulacijama tokom skladištenja na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svetlosti, u periodu od godinu dana, srednja vrednost \pm standardna devijacija, $n=3$.

4.3.2 Fizičko-hemijska karakterizacija i stabilnost nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzija

4.3.2.1 Veličina čestica i indeks polidisperziteteta

Primenom PCS određena je veličina čestica i raspodela veličine čestica izabranih nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzija, čiji je sadržaj prikazan u tabeli Tabela 4-6. Pokazano je da ispitivane formulacije imaju veoma usku distribuciju veličine čestica (Tabela 4-10). Naime, dobijene vrednosti indeksa polidisperziteteta, kao glavnog indikatora raspodele veličine čestica, manje su od 0.26 za sve ispitivane formulacije. Dodatno, sve formulacije imale su veličinu čestica ispod 200 nm. Treba naglasiti, međutim, da nisu svi ispitivani sistemi imali istu prosečnu veličinu čestice i da je ona zavisila od drugih ispitivanih varijabli koje će biti detaljnije diskutovane kasnije, ali da su bez obzira na to svi ispitivani sistemi imali prilično ujednačen indeks polidisperziteteta, što je od značaja za razmatranje eventualnih uzroka dobre distribucije veličine čestica, nezavisno od faktora koji određuju njihovu veličinu.

Kada je reč o veličini čestica, od velikog značaja za ovu studiju bila je identifikacija kritičnih parametara koji mogu uticati na veličinu nastalih čestica. Ovo je ispitivano u zavisnosti, najpre, od sastava lipidne smeše, jer je uočena jaka zavisnost veličine čestica od odnosa tečne i čvrste lipidne faze. Naime, analizom placebo NLC uočeno je da su one formulacije koje su sadržale identične količine lipidne faze (10 %), ali različite odnose čvrste i tečne lipidne faze (4:6, 5:5, 6:4), imale različite veličine nastalih čestica (Tabela 4-10, formulacije PCLP 6:4, PCLP 5:5, PCLP 4:6), time jasno pokazujući da ovaj faktor predstavlja jedan od ključnih parametara za razvoj NLC sistema. Načelno, uočeno je da viša koncentracija čvrste lipidne faze u lipidnom matriksu rezultuje većim česticama. Ovo je neočekivan rezultat, budući da su u sličnoj studiji Date i saradnici (2011) pokazali, da u njihovim formulacijama koje sadrže 5 % ukupne masne faze sastavljene od istog čvrstog i tečnog lipida koristeći Gelucire 50/13, nejonski surfaktant iz grupe polietilenglikolnih estara, veličina dobijenih čestica ne varira sa promenom količine dodatog tečnog lipida. Ipak, direktno poređenje ovih rezultata nije moguće s obzirom na korišćenje različitih surfaktanata, čija efikasnost značajno može da utiče na fizičko-hemijske osobine dobijenih formulacija, kao i to da je u njihovoj studiji ukupna količina masne faze iznosila samo 5 %.

Dalje, poređenjem formulacija PCLP 4:6 i PCLP 2:3, koje imaju različiti totalni udeo masne faze (10 %, odnosno 5 %, respektivno), a kod kojih je masna faza sadržala isti odnos čvrstog i tečnog lipida (4:6), može se uočiti da je veličina čestica značajno smanjena i to za oko 30 nm kada je manja količina lipidne faze prisutna u formulacijama. Ovo se može objasniti raspodelom disperzione energije koja je dostupna tokom procesa homogenizacije pod visokim pritiskom. Naime, Müller i saradnici (2002) su pokazali da, iako je količina disperzione energije ista u procesu izrade formulacija korišćenjem istog pritiska pri homogenizaciji i istog broja ciklusa, usled prisustva veće količine masne faze u formulacijama smanjuje se disperziona energija koja je dostupna po jedinici mase lipida, što može rezultovati u nastajanju većih čestica. Oni su takođe pretpostavili da se ovo može kompenzovati povećanjem broja homogenizacionih ciklusa. Međutim, u našoj studiji, podvrgavanje formulacije PCLP 4:6 duplo većem broju ciklusa homogenizacije (deset ciklusa umesto pet), nije postignuto dalje smanjenje veličine čestica. Ovo je interesantan rezultat koji sugerise to da razlika u veličini čestica ne potiče samo zbog promenjene količine dostupne energije homogenizacije po jedinici mase lipida, već može zavisiti i od drugih faktora, kao što je količina dostupnog surfaktanta po jedinici masne faze.

Imajući to u vidu, ispitivan je i uticaj koncentracije surfaktanata na svojstva ovih formulacija. Kao što je prikazano u tabeli Tabela 4-6, formulacije PCLP 4:6, PCLP 4:6 B, PCLP 4:6 C i PCLP 4:6 D sadrže istu količinu masne faze i isti odnos čvrstog i tečnog lipida, ali različitu količinu surfaktanata. Rezultati dobijeni analizom veličine čestica ovih formulacija ukazuju na to da postoji određen trend u smanjenju veličine čestica kada je korišćeno duplo više surfaktanta (PCLP 4:6 B), i kod ove formulacije je veličina čestica smanjena za oko 5 nm. Ipak, ovo skromno smanjenje veličine čestica usled prisustva veće količine surfaktanta po jedinici masne faze nije dovoljno kako

bi se objasnilo smanjenje veličine čestica od oko 30 nm kada se količina masne faze smanji sa 10 % na 5 %. Pri korišćenju duplo manje količine surfaktanata (PCLP 4:6 C) ili potpunog isključivanja polisorbata 80 iz formulacije (PCLP 4:6 D), ostavljajući lecitin kao jedini stabilizator disperzije, može se uočiti porast u veličini čestica za nešto više od 10 nm. Interesantno, iako se smatra da upotreba samo fosfolipida, bez dodatka drugih voluminoznih surfaktanata/kosurfaktanata kao sternih stabilizatora, ne mogu da dovedu do zadovoljavajuće stabilizacije nanoemulzija (Klang i Valenta, 2011; Salminen i sar., 2014), bilo je moguće napraviti formulaciju PCLP 4:6 D korišćenjem samo lecitina kao surfaktanta. Razlog tome može biti parcijalna amfifilnost tečnog lipida Capryol[®] 90, koji bi mogao da preuzme ulogu kosurfaktanta i olakša stabilizaciju međupovršinskog filma. Posmatrajući sve rezultate, količina surfaktanta u formulacijama nije imala tako izraženi efekat na veličinu čestica kao što su to imali količina masne faze i odnos čvrstog i tečnog lipida u formulacijama.

Poređenjem formulisane nanoemulzije CLP 10 i nanostrukturiranog lipidnog nosača PCLP 4:6, koji sadrže isti maseni udeo surfaktanata i masne faze, a razlikuju se po tome što se ukupna količina masne faze u nanoemulziji sastoji samo od tečnog lipida, može se uočiti to da je izbacivanjem čvrstog lipida dobijena nešto manja veličina kapi unutrašnje faze kod nanoemulzije.

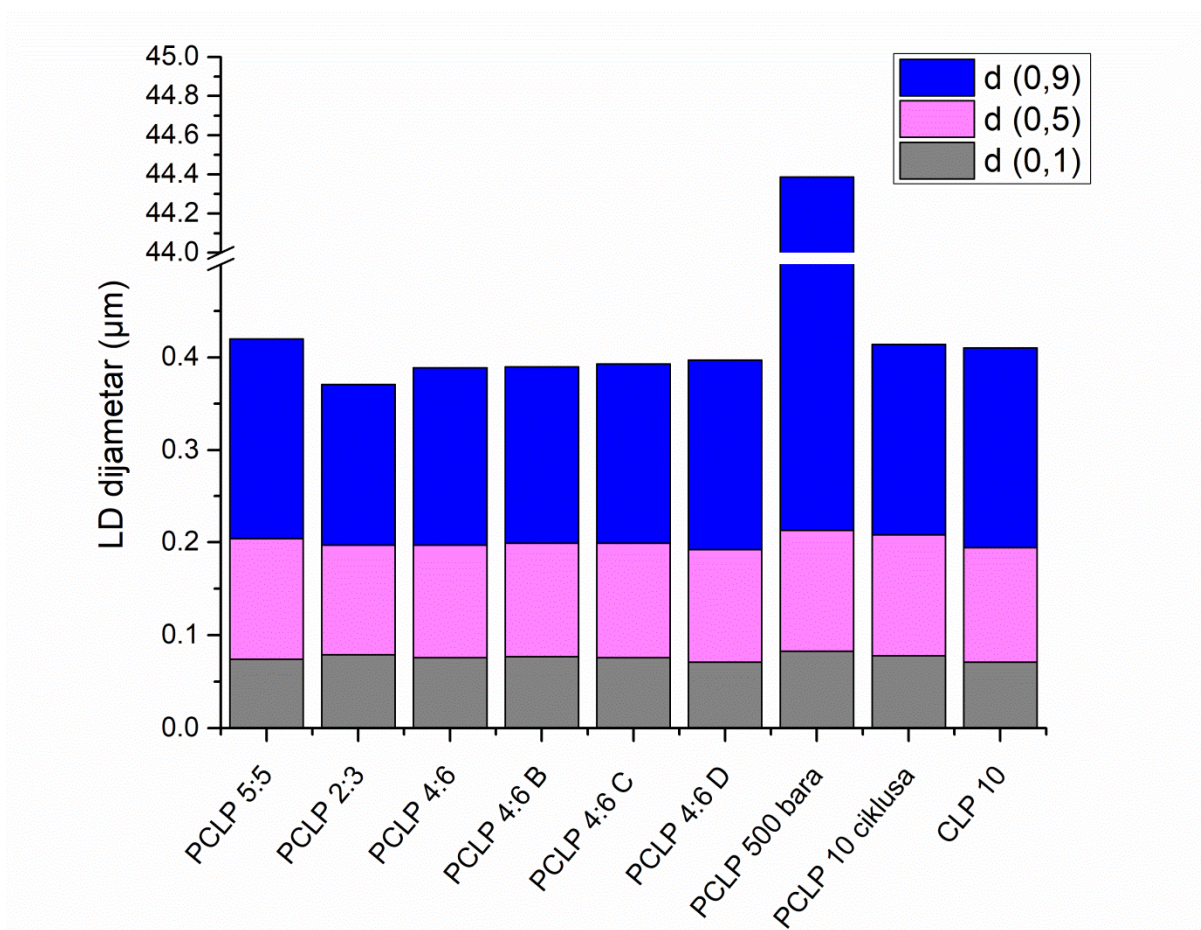
Imajući u vidu to da je PCS pouzdana tehnika za određivanje veličine čestica koje se kreću u nanometarskom opsegu, odabrane formulacije su dodatno analizirane korišćenjem komplementarne metode laserske difrakcije, kojom se može detektovati prisustvo velikih agregata mikrometarskih dimenzija. LD tehnikom potvrđena je unimodalna distribucija čestica i odsustvo čestica mikrometarske veličine kod skoro svih formulacija (Tabela 4-11). Izuzetak je formulacija PCLP 4:6 kada se tokom proizvodnog postupka primenjuje pritisak od 500 bara umesto 800 bara (PCLP 500 bara). Kod nje je vrednost parametra $d(0,9)$ u mikrometarskom opsegu (44,2 μm , Tabela 4-11). Ovaj parametar ukazuje na to da 10 % čestica ima dijаметar čestica veći od date vrednosti, te se stoga može zaključiti prisustvo određenih agregata mikrometarskih veličina u ovoj formulaciji. Slično tome, može se primetiti relativno velika vrednost zapreminskog srednjeg prečnika ($D[4,3]$) formulacije PCLP 4:6 D (1,423 μm , Tabela 4-11), kod koje je izbačen polisorbit 80 kao sterni stabilizator, već sadrži isključivo lecitin kao surfaktant. S obzirom na to da je vrednost $d(0,9)$ ove formulacije 0,205 μm , može se zaključiti da je u ovoj formulaciji primećeno prisustvo relativno velikih agregata, ali u dosta manjoj količini nego kod formulacije PCLP 500 bara. Bez obzira na to, ovo može ukazati na to da lecitin, uprkos prvobitnim zadovoljavajućim rezultatima, nije adekvatan za stabilizaciju nanostrukturiranih lipidnih čestica kada se primenjuje bez dodatka odgovarajućih sternih stabilizatora kao što je polisorbit 80.

Tabela 4-10 Fizičko-hemijska karakterizacija odabranih formulacija nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzije sa ili bez takrolimusa (TAC): veličina čestica, indeks polidisperziteta i zeta potencijal. Inicijalne vrednosti i vrednosti nakon skladištenja na sobnoj temperaturi u trajanju od tri ^(a) ili šest meseci ^(b). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija, n=3.

Formulacija	Veličina čestica (nm)		Indeks polidisperziteta				Zeta potencijal (mV)	
	Inicijalno	Nakon skladištenja	Inicijalno	Nakon skladištenja	Inicijalno	Nakon skladištenja	Inicijalno	Nakon skladištenja
PCLP 6:4	182,23 ± 1,54		0,26 ± 0,02				-34,30	0,26
PCLP 5:5	154,53 ± 2,32		0,25 ± 0,02				-34,49 ± 0,13	
PCLP 4:6	143,00 ± 1,42	140,33 ± 2,12 ^b	0,23 ± 0,01	0,17 ± 0,01 ^b			-36,97 ± 0,45	-37,77 ± 0,90 ^b
PCLP 2:3	112,17 ± 0,35	108,47 ± 1,01 ^b	0,25 ± 0,00	0,20 ± 0,01 ^b			-36,53 ± 1,10	-35,57 ± 1,35 ^b
PCLP 4:6 B	137,87 ± 2,92	153,63 ± 0,67 ^b	0,23 ± 0,02	0,22 ± 0,04 ^b			-39,20 ± 1,22	-36,83 ± 0,40 ^b
PCLP 4:6 C	151,27 ± 2,40	149,50 ± 4,59 ^b	0,20 ± 0,00	0,19 ± 0,03 ^b			-31,60 ± 0,26	-36,80 ± 1,47 ^b
PCLP 4:6 D	151,97 ± 2,02	154,03 ± 2,72 ^b	0,19 ± 0,02	0,23 ± 0,05 ^b			-39,50 ± 2,48	-37,87 ± 0,58 ^b
PCLP 4:6 TAC	143,23 ± 1,08	140,33 ± 1,00 ^b	0,21 ± 0,01	0,15 ± 0,01 ^b			-35,60 ± 0,50	-37,30 ± 0,44 ^b
CLP 10	127,03 ± 2,52	124,20 ± 1,66 ^a	0,20 ± 0,01	0,22 ± 0,02 ^a			-35,33 ± 0,55	-38,00 ± 1,55 ^a
CLP 10 TAC	135,13 ± 1,15	143,43 ± 1,65 ^a	0,19 ± 0,03	0,24 ± 0,00 ^a			-34,10 ± 0,36	-37,00 ± 1,68 ^a
PCLP 500 bara	147,80 ± 1,15	137,57 ± 0,57 ^a	0,21 ± 0,02	0,19 ± 0,02 ^a			-36,03 ± 1,80	-38,73 ± 0,35 ^a
PCLP 10 ciklusa	144,67 ± 0,51	147,93 ± 0,60 ^b	0,23 ± 0,02	0,19 ± 0,02 ^b			-35,83 ± 0,78	-37,90 ± 3,10 ^b

^a - nakon tri meseca

^b - nakon šest meseci



Slika 4-15 LD dijometri kapi/čestica odabranih formulacija prikazani kao vrednosti d (0,1), d (0,5) i d (0,9).

Rezultati analize odabranih formulacija laserskom difrakcijom je izuzetno značajan jer dodatno potvrđuje važnost korišćenja komplementarnih metoda u cilju određivanja veličine čestica kod termodinamički nestabilnih sistema kao što su nanoemulzije i nanostrukturirane lipidne čestice. Ipak je važno napomenuti da je studija određivanja veličine čestica primenom LD tehnike sprovedena mesec dana nakon izrade formulacija, te se ne može detaljno potvrditi da li je prisustvo agregata mikrometarskog opsega posledica nestabilnosti formulacija odmah nakon izrade, ili posledica skladištenja formulacije u periodu od mesec dana.

Tabela 4-11 Veličina čestica i raspodela veličina čestica odabranih nanostrukturiranih lipidnih nosača i nanoemulzija korišćenjem LD tehnike

Formulacija	Zapreminski srednji prečnik D [4,3] (μm)	Površinski srednji prečnik D [3, 2] (μm)	d (0,1) (μm)	d (0,5) (μm)	d (0,9) (μm)	Širina raspodele
PCLP 5:5	0,782	0,117	0,074 ± 0,006	0,130 ± 0,003	0,216 ± 0,002	1,097
PCLP 2:3	0,123	0,112	0,079 ± 0,001	0,118 ± 0,002	0,174 ± 0,002	0,811
PCLP 4:6	0,129	0,114	0,076 ± 0,000	0,121 ± 0,002	0,192 ± 0,002	0,956
PCLP 4:6 B	0,129	0,114	0,077 ± 0,001	0,122 ± 0,000	0,191 ± 0,003	0,937
PCLP 4:6 C	0,130	0,115	0,076 ± 0,000	0,123 ± 0,000	0,194 ± 0,000	0,959
PCLP 4:6 D	1,423	0,113	0,071 ± 0,001	0,121 ± 0,001	0,205 ± 0,004	1,107
PCLP 500 bara	13,062	0,133	0,083 ± 0,000	0,130 ± 0,001	44,17 ± 7,77	338,57
PCLP 10 ciklusa	0,137	0,120	0,078 ± 0,001	0,130 ± 0,001	0,206 ± 0,002	0,985
CLP 10	0,311	0,114	0,071 ± 0,002	0,123 ± 0,001	0,216 ± 0,002	1,179

4.3.2.2 *Određivanje zeta potencijala*

Zeta potencijal je vrlo važan parametar karakterizacije termodinamički nestabilnih koloidnih sistema, kojim se može proceniti naelektrisanje kapi/čestica i njihovo elektrostatičko odbijanje koje dovodi do stabilizacije koloidnog sistema. Zapravo, prema DLVO teoriji, kako bi se osigurala prihvatljiva kinetička stabilnost sistema kao što su nanoemulzije i nanostrukturirani lipidni nosači, neophodno je da elektrostatičko odbijanje između kapi/čestica nadvlada privlačne Van der Valsove sile. Zeta potencijal zavisi od raznih faktora kao što su odabir surfaktanata i kosurfaktanata i prisustvo naelektrisanih grupa na njihovoj površini, dimenzija kapi/čestice, karakteristike rastvora u kojem se kapi/čestice nalazi, poput pH, temperature, prisustva elektrolita i provodljivosti itd. Generalno je zastupljeno gledište da apsolutne vrednosti zeta potencijala veće od 30 mV obezbeđuju zadovoljavajuće elektrostatičko odbijanje čime se obezbeđuje stabilnost ovih sistema (Han i sar., 2008).

Rezultati merenja zeta potencijala nanoemulzija i nanostrukturiranih čestica dati su u tabeli Tabela 4-10. Kao što je ranije pomenuto, određivanje zeta potencijala kod mikroemulzija nije potrebno budući da su to termodinamički stabilni sistemi. Sve ispitivane formulacije imale su zeta potencijal niži od -30 mV što znači da je negativno elektrostatičko odbijanje dovoljno jako da spreči agregaciju kapi/čestica. Imajući u vidu da je kao surfaktant korišćen lecitin, koji može da sadrži negativno naelektrisane fosfolipide koji obezbeđuju površinsko naelektrisanje, ne iznenađuje da ispitivane nanoformulacije imaju dobra elektrohemijiska svojstva. Poređenjem formulacija sa i bez korišćenog polisorbata 80 kao sternog stabilizatora (PCLP 4:6, PCLP 4:6 D), može se uočiti da ne dolazi do značajne promene u vrednostima zeta potencijala. Takođe, vrednosti zeta potencijala nanoemulzije i nanostrukturiranog lipidnog nosača se ne razlikuju značajno, što ukazuje da prisustvo tečnog ili smeše čvrstog i tečnog lipida nisu uticali na elektrohemijiska svojstva površine kapi/čestica. Slično, inkorporiranje takrolimusa u formulacijama nije značajno uticalo na zeta potencijal, što je i očekivano, jer se njegova lokalizacija očekuje u dubljim slojevima masne faze, a ne na površini međupovršinskog filma.

4.3.2.3 *Merenje pH i provodljivosti*

Kao što je pomenuto ranije, pH je izuzetno značajan parametar za osiguranje stabilnosti aktivne supstance u ovim formulacijama. Pokazano je da je stabilnost takrolimusa loša u baznoj sredini (Skak i Hansen, 2016), pa je tako poželjno bilo da se obezbedi stabilan i blago kiseo pH u ovim sistemima.

Rezultati provodljivosti i pH dati su u tabeli Tabela 4-12. Iz priloženog se vidi da pH malo varira između ovih formulacija, a da njegova vrednost inverzno korelira sa količinom lipidne faze. Visoki maseni udeo tečnog lipida Capryol[®] 90 korelira sa nešto nižom pH vrednošću formulacija. Sve pH vrednosti prihvatljive su za dermalnu primenu ovih formulacija.

Merenjem provodljivosti formulacija, može se zapaziti da formulacija koja ima najveći sadržaj lecitina (PCLP 4:6 B) ima i najveću provodljivost (Tabela 4-12). Ovo je i očekivano, imajući u vidu da naelektrisane čestice prisutne u ovim sistemima, kao i različite naelektrisane nečistoće normalno prisutne u lecitinu, značajno doprinose provođenju struje kroz koloidnu disperziju. S druge strane, formulacija PCLP 6:4, koja ispoljava najveći viskozitet, ima i najmanju provodljivost jer je provođenje struje kroz vodenu fazu otežano usled visokog viskoziteta formulacije.

4.3.2.4 *Reološka merenja i zapažanja*

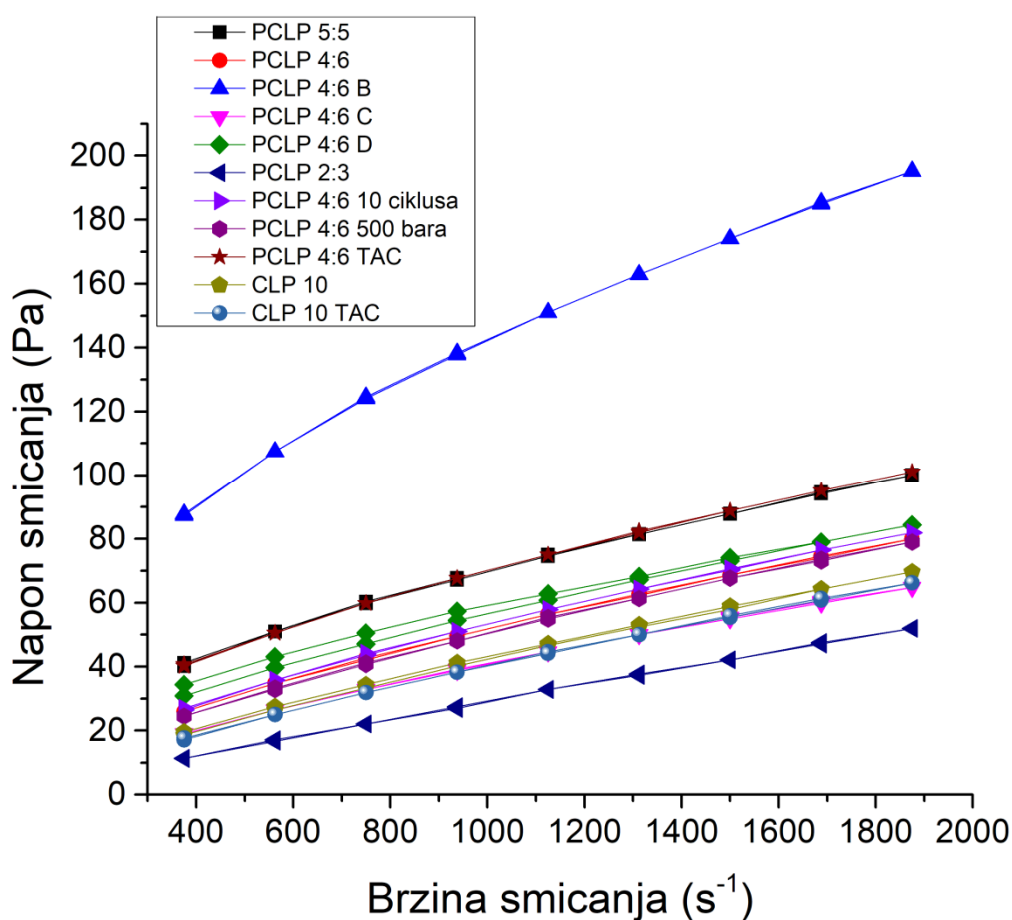
S obzirom na to da je tokom preformulacionih studija identifikovano geliranje različitih formulacija kao indikator nestabilnosti dobijenih sistema, od velike je važnosti merenje i praćenje viskoziteta nanostrukturiranih lipidnih formulacija. Ispitivane formulacije pokazale su se kao vrlo nezahvalan model sistem za reološka ispitivanja korišćenjem iste metode koja je korišćenja u

reološkoj analizi mikroemulzija, jer su neke od NLC formulacija bile izuzetno visoke viskoznosti i njima nije bilo praktično moguće izmeriti viskozitet pomenutom metodom.

Krive tečenja formulacija, u vidu zavisnosti napona smicanja od brzine smicanja, prikazane su na slici

Slika 4-16, dok je zavisnost viskoziteta formulacija i brzine smicanja prikazana na slici Slika 4-17. Vrednosti prividnog viskoziteta formulacija pri brzini smicanja od 375 s^{-1} date su u tabeli Tabela 4-12. Analizom dobijenih rezultata može se uočiti to da je odabir formulacionih parametara značajno uticao na reološke karakteristike datih formulacija.

Naime, poređenjem formulacija sa različitim odnosom čvrstog i tečnog lipida (PCLP 6:4, PCLP 5:5, PCLP 4:6), može se zaključiti da veći maseni udeo čvrstog lipida doprinosi povećanju viskoziteta nastalih nanostrukturiranih lipidnih čestica. Naime, viskozitet formulacije PCLP 6:4 je bio toliko veliki da ovaj uzorak nije mogao biti analiziran korišćenom metodologijom. Zapravo, već nekoliko dana nakon skladištenja ove formulacije, došlo je do njene promene iz tečnog u polučvrsto stanje. Kako je interes ove studije odabir isključivo tečnih, stabilnih formulacija, dalja ispitivanja sa ovom formulacijom nisu sprovedena. S druge strane, smanjenje masenog udela čvrstog lipida, kao i potpuno isključivanje čvrstog lipida iz formulacije i posledično nastajanje nanoemulzija, dodatno je smanjilo prividni viskozitet formulacija (Tabela 4-12).



Slika 4-16 Krive tečenja nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzija. TAC u nazivu formulacije ukazuje na prisustvo inkorporiranog takrolimusa.

Tabela 4-12 pH, provodljivost i viskozitet nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzija, inicijalne vrednosti i vrednosti nakon skladištenja na sobnoj temperaturi u trajanju od 3 meseca (a) ili 6 meseci (b)

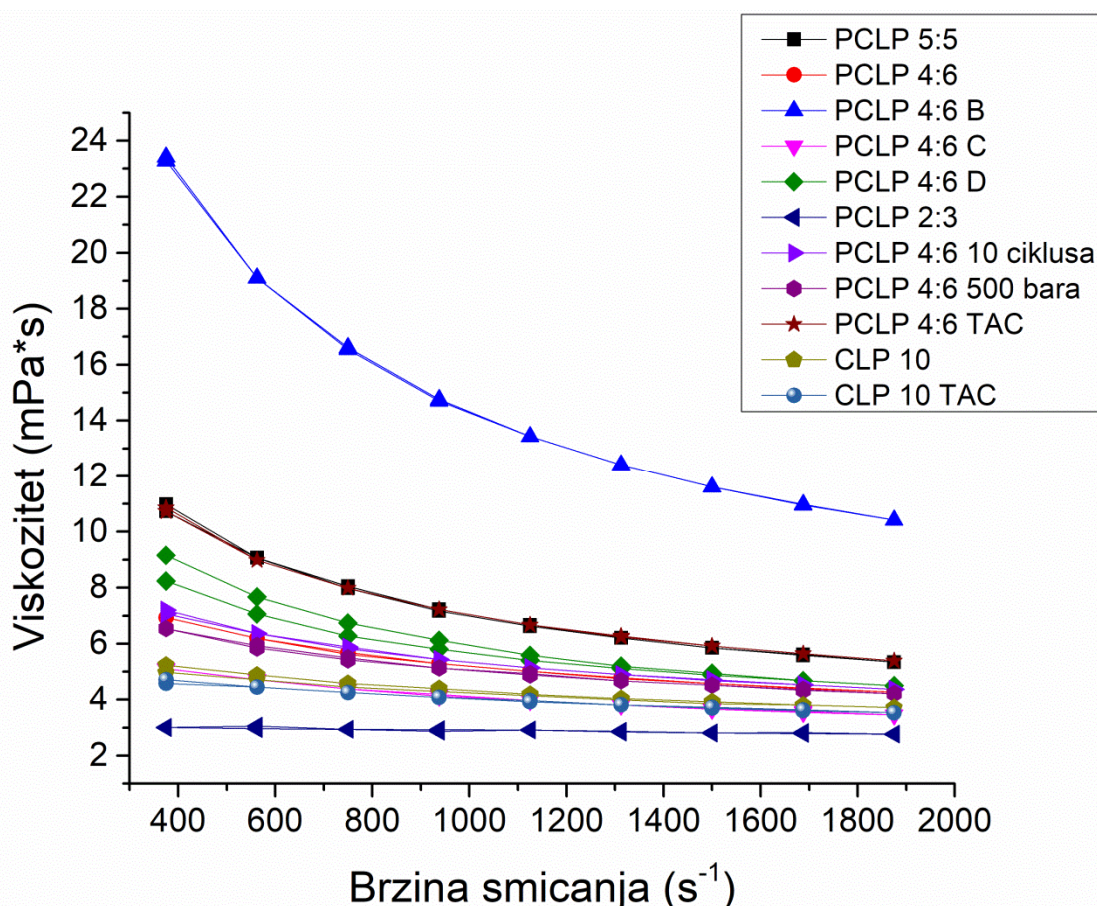
Formulacija	pH			Provodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$)						Viskozitet ($\text{mPa}\cdot\text{s}$)	
	Inicijalno	Nakon skladištenja ^{a, b}		Inicijalno	Nakon skladištenja ^{a, b}						
PCLP 6:4	4,52	\pm 0,01	-	52,53	\pm 0,67	-	-	-	-	-	-
PCLP 5:5	4,58	\pm 0,01	-	68,13	\pm 0,40	-	-	-	-	10,40	\pm 0,83
PCLP 4:6	4,61	\pm 0,01	4,06 \pm 0,02 ^b	69,60	\pm 0,98	90,33	\pm 0,31 ^b	-	-	6,87	\pm 0,09
PCLP 2:3	4,77	\pm 0,02	4,06 \pm 0,02 ^b	63,13	\pm 0,85	75,57	\pm 0,35 ^b	-	-	3,01	\pm 0,00
PCLP 4:6 B	4,62	\pm 0,03	4,11 \pm 0,08 ^b	95,70	\pm 0,17	107,87	\pm 0,29 ^b	-	-	23,61	\pm 0,28
PCLP 4:6 C	4,58	\pm 0,02	4,10 \pm 0,02 ^b	65,83	\pm 0,51	89,93	\pm 0,21 ^b	-	-	5,62	\pm 0,74
PCLP 4:6 D	4,52	\pm 0,01	3,95 \pm 0,04 ^b	65,43	\pm 0,14	65,37	\pm 0,06 ^b	-	-	7,85	\pm 0,55
PCLP 4:6 TAC	4,42	\pm 0,02	3,89 \pm 0,02 ^b	70,73	\pm 0,15	75,80	\pm 0,36 ^b	-	-	6,80	\pm 0,34
CLP 10	4,22	\pm 0,02	4,07 \pm 0,01 ^a	76,87	\pm 0,70	84,73	\pm 0,64 ^a	-	-	5,23	\pm 0,00
CLP 10 TAC	4,38	\pm 0,02	4,10 \pm 0,02 ^a	74,93	\pm 0,12	85,93	\pm 1,47 ^a	-	-	4,38	\pm 0,28
PCLP 500 bara PCLP 10	4,55	\pm 0,02	4,30 \pm 0,01 ^a	66,37	\pm 3,00	74,57	\pm 0,55 ^a	-	-	6,47	\pm 0,09
ciklusa	4,54	\pm 0,02	3,79 \pm 0,08 ^b	67,30	\pm 0,14	81,80	\pm 0,44 ^b	-	-	7,26	\pm 0,09

^a - nakon tri meseca

^b - nakon šest meseci

Dalje, poređenjem formulacija koje sadrže isti maseni odnos čvrstog i tečnog lipida, ali različiti ukupni maseni udeo lipida (formulacije PCLP 4:6 i PCLP 2:3, sa 10 %, odnosno 5 % lipidne faze, respektivno), može se zaključiti da smanjenje ukupne količine lipida dovodi do značajnog smanjenja viskoziteta formulacije. Dodatno, iako sve formulacije koje sadrže 10 % lipida pokazuju nenjutnovski tip tečenja, odnosno korelacija između napona smicanja i brzine smicanja nije linearna, i određeno pseudoplastično ponašanje, formulacija PCLP 2:3, koja sadrži 5 % masne faze pokazuje njutnovski tip tečenja (koeficijent linearne korelacije $R^2 = 0,999$). Ovo je vrlo interesantan rezultat koji ukazuje na to da se promenom količine masne faze može uticati na tip tečenja i generalno reološke karakteristike formulacija.

Praćenjem promene reološkog ponašanja u zavisnosti od masenog udela surfaktanata, može se uočiti da formulacija sa najvišim udelom surfaktanata (PCLP 4:6 B) ispoljava najviši prividni viskozitet, kao i najveću promenu viskoziteta u zavisnosti od brzine smicanja. Slična zapažanja su i ranije napravljena (Zhou i sar., 2010), što otklanja sumnju da je u pitanju artefakt studije. S obzirom na to da lecitin može da dovede do geliranja formulacija, kao što je i u našem ispitivanju uočeno prilikom izrade mikroemulzija, može se smatrati da je on dominantno odgovoran za primećene razlike u viskozitetu. Interesantno, uočeno je da formulacija PCLP 4:6 D, koja sadrži samo lecitin, a ne i polisorbit 80 kao surfaktant, ispoljava u određenoj meri reopeksiju, odnosno, tokom analize dolazi do promene viskoziteta tako da je prividni viskozitet formulacije na kraju analize veći od prividnog viskoziteta formulacije na početku analize (Slika 4-17). Ovaj fenomen može indikovati nestabilnost pomenute formulacije i određene strukturne promene do kojih dolazi usled izlaganja sili smicanja.



Slika 4-17 Promena viskoziteta nanostrukturiranih lipidnih nosača i nanoemulzija u zavisnosti od brzine smicanja. TAC u nazivu formulacije ukazuje na prisustvo takrolimusa u toj formulaciji.

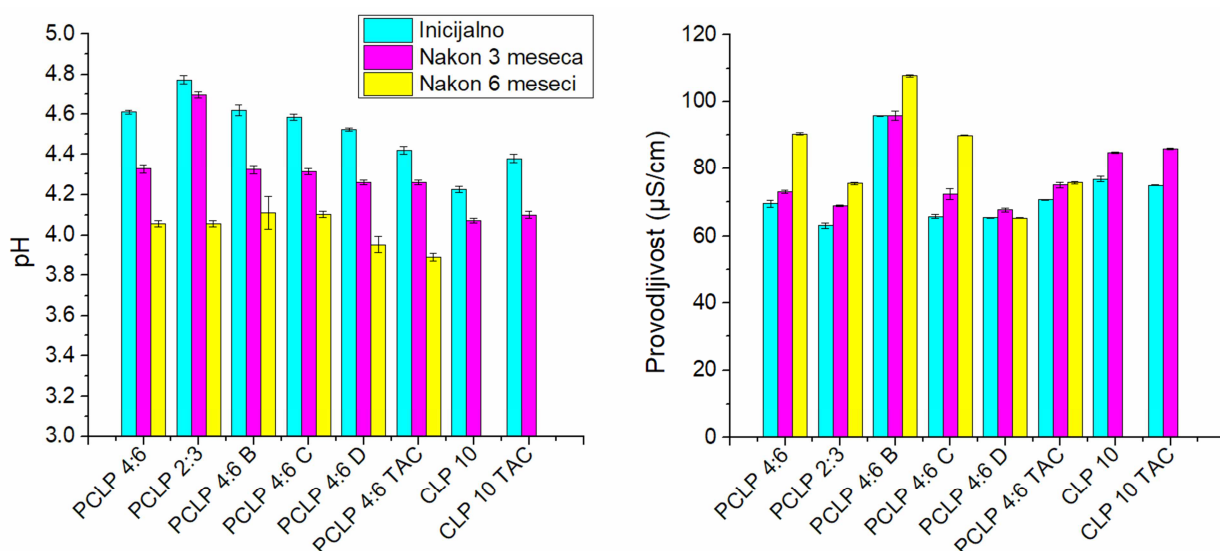
Variranje procesnih parametara, kao što su broj homogenizacionih ciklusa i pritisak tokom homogenizacije, nisu značajno uticali na reološke karakteristike razvijenih nosača. Nasuprot tome, treći procesni parametar koji je variran u našoj studiji - naglo hlađenje formulacija nakon izrade - doveo je do intenzivnog geliranja i nastajanja polučvrste formulacije, iako je njen sadržaj isti kao sadržaj u formulaciji PCLP 4:6. Ovo je interesantan rezultat, jer je očekivano da će brzo hlađenje formulacije dovesti do nastajanja čestica manje veličine. Međutim, u našoj studiji se naglo hlađenje pokazalo kao nepoželjno, te stoga ovaj proces nije dalje ispitivan. Mogući uzrok tome je nastajanje različitih polimorfni oblika čvrstog lipida usled naglog hlađenja (Hamdani i sar., 2003), koji su uzrokovali geliranje sistema.

4.3.2.5 *Stabilnost nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzija*

U literaturi se mogu naći podaci o stabilnosti različitih nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzija u periodu od par dana do par nedelja. Kako bi se što bolje ispitala stabilnost razvijenih nosača, u ovoj studiji je stabilnost formulacija praćena tokom šest meseci skladištenja na sobnoj temperaturi, zaštićenih od svetlosti, i velike razlike su uočene u ponašanju uzoraka tokom vremena.

Najpre, najveći broj formulacija odbačen je iz daljeg ispitivanja usled promena u reološkim karakteristikama, pri čemu je formulacija PCLP 6:4 gelirala u toku prvog meseca uz pojavu nehomogenih oblasti unutar uzorka, koje ukazuju na mogućnost agregacije čestica. Formulacija PCLP 5:5 gelirala u nešto manjoj meri oko dva meseca nakon njene izrade, i to bez vizuelno uočljive pojave nehomogenosti u uzorku. Formulacije sa nižim sadržajem čvrstog lipida nisu pokazale značajne promene tokom skladištenja, ali je primećeno da i u njima može doći do geliranja ukoliko su male količine uzoraka čuvane u epruvetama koje ne omogućavaju adekvatnu zaštitu od prodiranja vazduha i isparavanja vode.

Dalje, slično kao i kod mikroemulzija, tokom studije stabilnosti jasno je uočena promena u pH vrednosti i provodljivosti formulacija (Slika 4-18). Iako formulacije sadrže butilhidroksitoluen kao antioksidans, pad pH vrednosti i porast provodljivosti u skladu su sa teorijskim modelom u kojem postepena oksidacija i degradacija lipida i surfaktanata dovodi do pojave organskih kiselina i slobodnih protona u smešama.



Slika 4-18 Grafički prikaz promene pH vrednosti i provodljivosti ispitivanih nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzija tokom skladištenja (srednja vrednost ± standardna devijacija, n = 3).

Slično tome, uočeno je da apsolutna vrednost zeta potencijala kod određenih formulacija vremenom raste (Tabela 4-10), odnosno čestice postaju dodatno negativno naelektrisane, verovatno

zbog postepenog formiranja slobodnih masnih kiselina usled hidrolize fosfolipida iz lecitina, čime se povećava bruto naelektrisanje površine čestica. Slični rezultati zapaženi su i od strane drugih istraživačkih grupa (Klang i Valenta, 2011).

Veličina čestica i indeks polidisperziteta, određeni korišćenjem PCS tehnike, nisu se značajno promenili tokom skladištenja nanostrukturiranih lipidnih čestica na sobnoj temperaturi u trajanju od 6 meseci (Tabela 4-10). Ipak, rezultati dobijeni korišćenjem laserske difrakcije (Tabela 4-11, Slika 4-15) ukazuju na pojavu agregata nakon mesec dana skladištenja formulacija PCLP 500 bara, kod koje je pritisak tokom homogenizacije smanjen sa 800 na 500 bara, i formulacije PCLP 4:6 D, koja ne sadrži polisorbit 80 kao sterni stabilizator. Ipak, s obzirom na to da nije bilo moguće sprovesti analizu ovih formulacija metodom laserske difrakcije odmah nakon izrade, nije sigurno da li su ovi agregati posledica čuvanja formulacija tokom mesec dana, ili su nastali odmah nakon izrade formulacije.

Slično tome, kod odabrane nanoemulzije CLP 10 došlo je do formiranja krupnijih uljanih kapi koje su se i vizuelno mogle uočiti tokom četvrtog meseca skladištenja, te je studija stabilnosti ove formulacije obustavljena nakon tri meseca skladištenja. Ovaj rezultat je vrlo značajan jer ističe veliku razliku u stabilnosti komparabilnog nanostrukturiranog lipidnog nosača i nanoemulzije. Zapravo, budući da su formulacije PCLP 4:6 i CLP 10 izrađene korišćenjem istih procesnih parametara, iste količine surfaktanata i lipidne faze, s tim što je čvrsti lipid u potpunosti zamenjen tečnim lipidom u nanoemulziji, može se zaključiti to da se, u našem ispitivanju, NLC pokazao kao stabilniji u poređenju sa nanoemulzijom zahvaljujući prisustvu čvrstog lipida u masnoj fazi i posledično čvrstog lipidnog matriksa - nanočestica, koje su manje podložne fenomenu Ostvaldovog sazrevanja u poređenju sa nanoemulzijama, pri čemu dolazi do inkorporacije manjih kapi/čestica u veće kapi/čestice i posledične destabilizacije sistema.

Interesantno je takođe uporediti dve formulacije koje imaju isti odnos čvrste i tečne lipidne faze, a različiti ukupni maseni udeo lipidne faze (PCLP 4:6 i PCLP 2:3). Osim što imaju, kao što je ranije navedeno, različitu veličinu čestica, u skladu sa rezultatima predstavljenim u tabeli Tabela 4-10, zanimljivo je da su uočene određene razlike u stabilnosti ove dve formulacije. Već nakon tri meseca u formulaciji PLCP 2:3 uočena je promena boje celog sistema ka žutom, a ta promena je postajala intenzivnija tokom naredna tri meseca. Sličan fenomen je opisan u literaturi i pripisuje se postepenoj oksidaciji butil hidroksitoluena tokom skladištenja (Nieva-Echevarría i sar., 2014). Osim toga poznato je i da su produkti oksidacije lecitina blago žute boje. Efekat koji je zapažen ovde, verovatno je posledica oba ova procesa. Iako su procesne i formulacione varijable u ove dve formulacije slične (isti pritisak prilikom homogenizacije, isti broj ciklusa homogenizacije, ista koncentracija surfaktanata, itd.) treba imati u vidu da, kada se obračuna relativna količina stabilizujućih supstanci, ona je veća u formulaciji PLCP 2:3, upravo jer je količina ukupnih lipida manja, te je tako dostupnost surfaktanata u relativnom smislu veća u toj smeši. Slično važi i za koncentraciju butil hidroksitoluena u lipidnoj fazi, jer je količina dodatog butil hidroksitoluena ista, ali je količina lipidne faze manja u formulaciji PLCP 2:3, te je relativna koncentracija dostupnog butil hidroksitoluena veća. Posledica svega ovoga je da usled relativno visoke koncentracije butil hidroksitoluena u lipidnoj fazi formulacije PCLP 2:3, oksidacija ove supstance vodi do intenzivne i lako uočljive promene boje sistema. Iako se ova promena ne smatra kritičnom u pogledu isporuke lekovite supstance, ona sugerira određeni vid nestabilnosti sistema, koji se može okarakterisati kao nepoželjan od strane potencijalnih korisnika.

Iako je potrebna opširnija studija stabilnosti ovih sistema, određene smernice za takvo istraživanje mogu se dobiti i iz dobijenih rezultata. Iz dostupnog istraživačkog iskustva, moglo bi se hipotetisati da prisustvo čvrstog lipida u manjoj količini može biti faktor u stabilizaciji ovakvih sistema. Uslovi skladištenja, a prvenstveno prisustvo vazduha, smatraju se važnim faktorima koji doprinose kolapsu ovakvih sistema tokom vremena i dovode do formiranja gelova. Interesantno, iako ne sadrže određene konzervanse ili kratkolančane alkohole koji imaju antiseptični efekat, nije uočena mikrobiološka kontaminacija uzoraka tokom studije stabilnosti. To se može pripisati korišćenjem visoko prečišćenih ekscipijenasa, korišćenjem toplote tokom izrade formulacija, kao i dobrom zaptivanju sistema zatvaranja kontejnera.

4.3.2.6 *Selekcija ključnih parametara formulacije*

Na osnovu izloženih rezultata fizičko-hemijskih ispitivanja, odlučeno je da se u dalji tok studije uključe formulacije koje imaju niži viskozitet i bolju stabilnost, a opet dovoljnu količinu tečnog lipida kako bi teorijski bilo moguće inkorporirati lekovitu supstancu u željenoj količini. Kao ključni parametri u izradi nanostrukturiranih lipidnih čestica identifikovani su odnos čvrstog i tečnog lipida i totalni udeo lipidne faze, dok je kao ključni procesni parametar identifikovana brzina hlađenja nakon homogenizacije. Premda nije utvrđen značajan efekat pritiska tokom homogenizacije i odsustva sternog stabilizatora na skoro sve ispitivane fizičko-hemijske karakteristike, rezultati određivanja veličine čestica primenom LD tehnike ukazuju na mogućnost prisustva nezanemarljive količine mikrometarskih čestica u formulacijama mesec dana nakon njene izrade, kada je pritisak homogenizacije smanjen sa 800 na 500 bara, odnosno kada je sterna stabilizator isključen iz formulacije. Broj primenjenih ciklusa tokom homogenizacije nije se pokazao značajnim u ovoj studiji.

Formulacije PLCP 4:6 i CLP 10, izrađene primenom pritiska od 800 bara i pet homogenizacionih ciklusa, odabrane su kao najperspektivniji nosači za inkorporaciju takrolimusa i sprovođenje daljih ispitivanja.

4.3.2.7 *Inkorporacija takrolimusa u nanostrukturirane lipidne čestice i nanoemulzije*

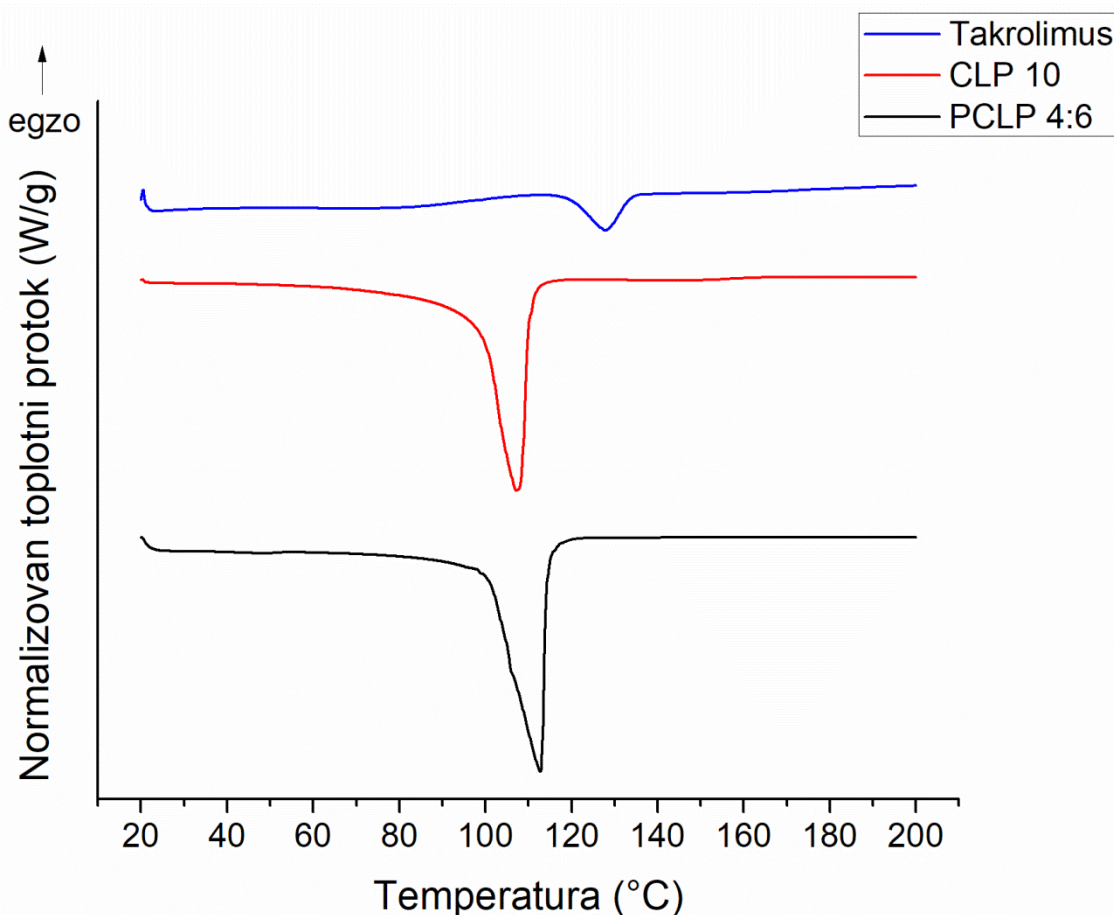
Za razliku od mikroemulzija, kod kojih se takrolimus može inkorporirati bilo tokom izrade formulacije ili u gotovu, prethodno izrađenu mikroemulziju zahvaljujući dinamičkom ponašanju ovih sistema i velikoj količini surfaktanta i kosurfaktanta, inkorporacija takrolimusa u nanostrukturirane lipidne čestice i nanoemulzije mora se vršiti za vreme izrade formulacija, rastvaranjem u (otopljenoj) masnoj fazi pre homogenizacije pod visokim pritiskom.

Inkorporacija takrolimusa nije dovela do značajne promene fizičko-hemijskih karakteristika nosača. Ipak, interesantan rezultat dobijen je poređenjem veličine kapi/čestica nanoemulzije i nanostrukturiranog lipidnog nosača sa i bez inkorporiranog takrolimusa (Tabela 4-10). Naime, inkorporacija takrolimusa u nanostrukturirani lipidni nosač nije uticala na promene veličine čestica prisutnih u sistemu ili indeksa polidisperziteta. S druge strane, dodavanje takrolimusa nanoemulziji dovelo je do određenog povećanja kapi unutrašnje faze i to za oko 8 nm. Iako se ova razlika ne može smatrati značajnom, interesantno je da je prisustvo tečne masne faze u nanoemulzijama manje robusno i podložnije uvećanju kapi usled prisustva voluminoznog takrolimusa, dok se čvrste lipidne čestice izgrađene od smeše čvrstog i tečnog lipida bolje odupiru ovoj promeni.

Efikasnost inkorporacije takrolimusa određena je razvijenom metodom koja je opisana u poglavlju 3.2.6.5. Tokom ispitivanja efikasnosti inkorporacije, uočeno je da lipidne faze (smeša čvrstog i tečnog lipida kao i sam tečni lipid) imaju nižu gustinu od vode, te je stoga masna faza izdvojena iznad vodene faze nakon centrifugiranja uzoraka. Koncentracija takrolimusa u vodenoj fazi uzoraka bila je niža od limita kvantifikacije korišćene UHPLC-MS/MS (5 ng/mL). S obzirom na to da nije uočeno prisustvo kristala takrolimusa na dnu tuba, više od 99 % takrolimusa inkorporirano je u masnoj fazi. Ovo je vrlo interesantan rezultat s obzirom na to da je inkorporacija takrolimusa u različite nanočestice rezultovala varijabilnom i značajno nižom efikasnošću inkorporacije (Khan i sar., 2016; Nam i sar., 2011; Yu i sar., 2018). Razlog ovako visoke efikasnosti inkorporacije takrolimusa verovatno leži u njegovoj dobroj rastvorljivosti u inovativno odabranom tečnom lipidu, kao i u tome da je sadržaj tečnog lipida ciljano relativno veliki u nanostrukturiranom lipidnom nosaču, kako bi se smanjio rizik od ekspanzije takrolimusa. Naime, NLC je ciljano izabran kao jedan od ispitivanih nanonosaa u ovim istraživanjima imajući u vidu da ima veći kapacitet inkorporacije lekovitih supstanci od čvrstih lipidnih nanočestica zbog prisustva tečnog lipida koji dovodi do formiranja imperfekcija u lipidnom matriksu i smanjuje ekspanziju aktivnih supstanci (Beloqui i sar., 2016; Montenegro i sar., 2016; Müller i sar., 2002). Osim toga, željena terapijska koncentracija takrolimusa u svim formulacijama je relativno niska (0,1 %, po

ugledu na referentni preparat sa najvišom koncentracijom takrolimusa), što takođe olakšava njegovu potpunu inkorporaciju.

Dalje, nanostrukturirani lipidni nosač PCLP 4:6 i nanoemulzija CLP 10 sa inkorporiranim takrolimusom analizirani su korišćenjem DSC tehnike (Slika 4-19). Ispitivane formulacije sa takrolimusom ispoljavaju prisustvo endoternog pika u temperaturnom opsegu od 90°C do 120°C, koji se javlja usled evaporacije vodene faze, dok u ovim nanonosaičima nije uočeno prisustvo endoternog pika na temperaturi između 128°C i 142°C koji bi odgovarao topljenju takrolimusa (Patel i sar., 2013; Zidan i sar., 2011), što ukazuje na to da je takrolimus potpuno rastvoren u ovim formulacijama. Fizičko stanje takrolimusa dodatno je potvrđeno posmatranjem uzoraka pod polarizacionim mikroskopom, pri čemu nije uočeno postojanje kristala u formulacijama.



Slika 4-19 DSC-krive zagrevanja (topljenja) takrolimusa, kao i nanostrukturiranih lipidnih čestica (PCLP 4;6) i nanoemulzije (CLP 10) sa inkorporiranom lekovitom supstancom.

4.4 Rezultati i diskusija četvrte faze ispitivanja

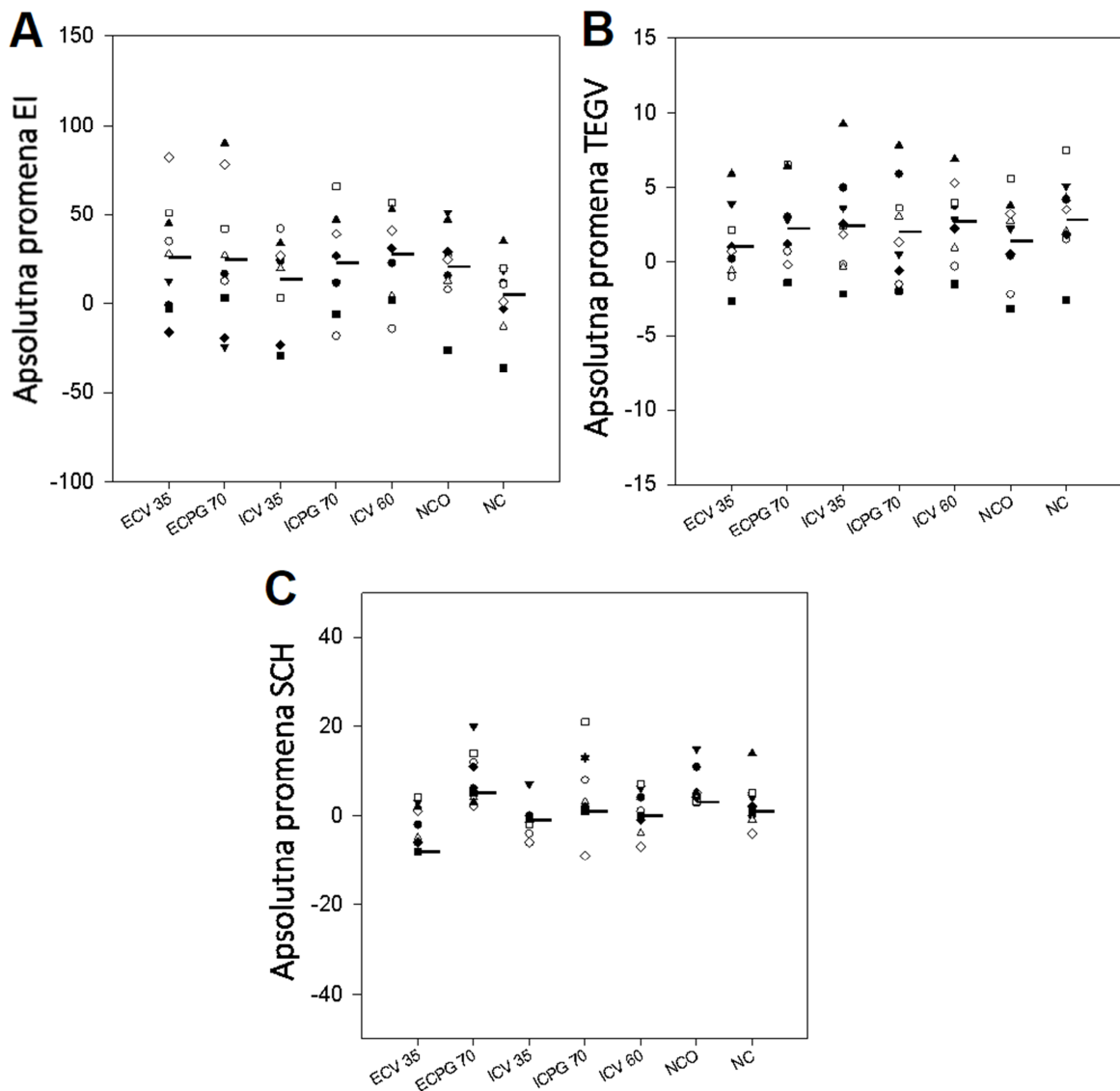
4.4.1 Procena bezbednosnog profila/iritacionog potencijala placebo mikroemulzionih formulacija primenom *in vivo* biofizičkih merenja kritičnih parametara stanja kože

Procena bezbednosnog profila/iritacionog potencijala formulacija od izuzetne je važnosti u ispitivanjima preparata za dermalnu primenu, pogotovu ukoliko su oni namenjeni u lečenju stanja ili promena usled kojih već postoje određeni poremećaji u strukturi kože, kao što je to atopijski dermatitis ili psorijaza. Iako su formulacije u ovoj studiji razvijene korišćenjem biokompatibilnih i bezbednih ekscipijenasa, količina surfaktanta i kosurfaktanata prisutnih u mikroemulzijama predstavljaju faktor rizika za iritaciju kože. Zbog toga je vrlo značajno proceniti njihov iritacioni potencijal. S obzirom na to da je takrolimus izuzetno snažan imunosupresiv, nije etički opravdano u ovoj fazi preliminarnih ispitivanja primenjivati formulacije sa takrolimusom na humanim dobrovoljcima. Zbog toga je sprovedeno ispitivanje korišćenjem placebo nosača - mikroemulzija bez inkorporirane lekovite supstance.

Rezultati ispitivanja prikazani su na slici Slika 4-20 i izraženi su kao apsolutna promena praćenog parametra (eritema indeksa, transepidermalnog gubitka vode i hidratacije *stratum corneum*-a) kod svakog ispitanika u poređenju sa bazalnim vrednostima izmerenim pre tretmana kože.

Generalno, sve ispitivane mikroemulzije su pokazale zadovoljavajuće bezbednosne profile i odsustvo iritacionog potencijala nakon 24-časovne studije pod okluzijom. Poređenjem formulacije ECV 35 i ICV 35, koje se razlikuju jedino po tipu primarnog kosurfaktanta, može se uočiti da primenjeni kosurfaktant (etanol ili izopropanol) nije ispoljio značajne razlike u vrednostima ispitivanih parametara. To je i očekivano, budući da se oba kosurfaktanta intenzivno koriste u formulacijama za primenu na koži. Takođe, nije uočena značajna razlika između formulacije ICV 35 i ICV 60, pri čemu ICV 60 sadrži oko 30 % manje surfaktanta i kosurfaktanta.

Statistički značajna promena dobijena je samo za hidrataciju *stratum corneum*-a prilikom aplikacije formulacije ECPG 70 i to u poređenju sa bazalnim vrednostima i netretiranim kontrolama. Takođe, moguće je uočiti određeni trend u porastu transepidermalnog gubitka vode prilikom primene ove formulacije, ali bez statističke značajnosti. Slično, uočen je trend u promeni ovih biofizičkih parametara nakon aplikacije formulacije ICPG 70 koji nije statistički značajan. Dodatno, tri ispitanika su prijavila povremeni i blagi osećaj peckanja tokom trajanja 24-časovne studije na ispitivanim mestima tretiranim ovim formulacijama. To se može objasniti prisustvom higroskopskog propilenglikola (35 %) u ovim formulacijama u poređenju sa formulacijama ECV 35, ICV 35 i ICV



Slika 4-20 *In vivo* procena bezbednog profila/iritacionog potencijala mikroemulzionih formulacija: **A** - apsolutna promena eritema indeksa (EI), **B** - apsolutna promena transepidermalnog gubitka vode (TEGV), **C** - apsolutna promena hidratacije *stratum corneum*-a (SCH). ECV 35, ECPG 70, ICV 35, ICPG 70, ICV 60 - mikroemulziona formulacije različitog sastava i strukture, NCO - netretirana kontrola sa okluzijom, NC - netretirana kontrola bez okluzije, različiti ispitanici označeni su različitim simbolima.

60, koji može da poveća hidrataciju *stratum corneum*-a, ali u kombinaciji sa primarnim kosurfaktantom (etanolom ili izopropanolom, 10,5 %) može da dovede do iritacije kože.

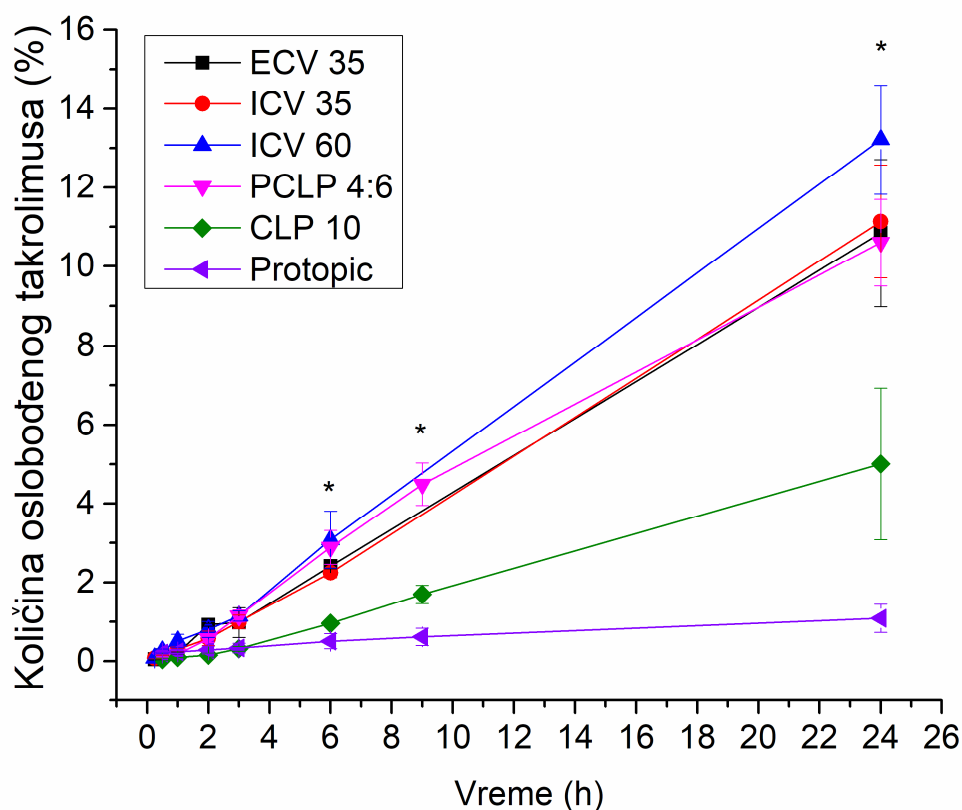
Iako rezultati ove preliminarne studije ukazuje na bezbednost primene svih odabranih mikroemulzija, ne treba zaboraviti da formulacije ECPG 70 i ICPG 70 sadrže najviši totalni udeo surfaktanta i kosurfaktanata (56 %) u poređenju sa formulacijama ECV 35 / ICV 35 (44,5 %), kao i ICV 60 (32 %, Tabela 4-3). U cilju dobijanja preparata koji se mogu koristiti dugoročno, čak i na oboleloj koži, sa minimalnim rizikom od iritacije kože, odlučeno je da se obustave dalja ispitivanja korišćenjem formulacija ECPG 70 i ICPG 70.

4.5 Rezultati i diskusija pete faze ispitivanja

4.5.1 *In vitro* ispitivanje brzine oslobađanja takrolimusa iz formulacija korišćenjem Franz-ovih difuzionih ćelija

Jedan od predulsova za ispoljavanje farmakološkog dejstva aktivne supstance jeste da se ona oslobodi iz nosača na željenom mestu, u željenoj količini i željenom brzinom, i da bude u rastvorenom stanju. Stoga, efikanost topikalno primenjenih lekova može zavistiti od oslobađanja aktivne supstance. Iako ispitivanje oslobađanja lekovite supstance ne može direktno ukazati na biološku raspoloživost lekovite supstance u koži, ovaj parametar može indirektno ukazati na izmenjeno *in vivo* ponašanje različitih formulacija u poređenju sa referentnim lekom (Shah i sar., 2015). Naime, rezultati ovog ispitivanja mogu da oslikavaju kombinovani efekat različitih fizičko-hemijskih parametara formulacija, kao što su rastvorljivost aktivne supstance u formulaciji, veličina kapi/čestica i reološke karakteristike formulacije. Imajući u vidu različitu unutrašnju strukturu razvijenih formulacija, mogu se očekivati razlike u kinetici oslobađanja takrolimusa. Naime, U/V mikroemulziona formulacija (ICV 60) i nanoemulzija (CLP 10) sadrže takrolimus u uljanim kapima koje su homogeno dispergovane u vodi, pri čemu je veličina kapi kod mikroemulzija značajno manja od veličine kapi kod nanoemulzije. U bikontinuiranim mikroemulzijama (ECV 35 i ICV 35) takrolimus je rastvoren u uljanoj fazi čiji regioni se međusobno protežu kroz regione vodene faze, dok je kod nanostrukturiranih lipidnih čestica (PCLP 4:6) takrolimus dispergovan u čvrstom lipidnom matriksu, koji je dalje homogeno dispergovan u vodenoj fazi.

Profili oslobađanja takrolimusa iz ispitivanih formulacija i referentne masti prikazani su na slici Slika 4-21. Kada se upoređi kumulativna količina oslobođenog takrolimusa nakon 6h, 9h i 24h od aplikacije, dobijena je statistički značajna razlika između svih formulacija u poređenju sa referentnom mašću. Poređenjem samih formulacija, može se uočiti da je oslobađanje takrolimusa najsporije iz nanoemulziona formulacije, dok značajna razlika nije uočena između mikroemulzionih formulacija i nanostrukturiranih lipidnih čestica. Ovo je u izvesnoj meri neočekivani rezultat imajući u vidu to da se ICV 60 sastoji od vrlo malih nanometarskih kapi, te stoga ima veliku aktivnu površinu preko koje takrolimus lako može da difunduje u spoljašnju fazu, za razliku od nanoemulzija i NLC kod kojih je prečnik kapi/čestica unutrašnje faze oko šest do osam puta veći. Iznenadjuće brzo oslobađanje takrolimusa iz NLC može se objasniti njegovom unutrašnjom strukturom. Naime, usled relativno velikog udela tečnog lipida u čvrstom lipidnom matriksu, najverovatnije dolazi do formiranja višestrukog (multiplog) tipa NLC, u kome postoje kompartmenti tečnog lipida (uljane kapi) dispergovane u čvrstom lipidu (Müller i sar., 2002). Kako je rastvorljivost takrolimusa mnogo veća u tečnom nego u čvrstom lipidu, on je dominantno rastvoren u ovim uljanim kompartmentima, iz kojih se relativno brzo oslobađa usled velikog koncentracionog gradijenta. Dodatno, relativno brzom oslobađanju takrolimusa dodatno doprinosi erozija nanočestica, čime se dalje povećava aktivna površina.



Slika 4-21 Kumulativna količina oslobođenog takrolimusa iz ispitivanih formulacija (ECV 35 i ICV 35 - bikontinuirane mikroemulzije, ICV 60 - U/V mikroemulzija, CLP 10 - nanoemulzija, PCLP 4:6 - nanostrukturirane lipidne čestice) i referentnog preparata (Protopic®). Srednja vrednost ± standardna devijacija, n = 4, * statistička značajnost između svih formulacija u poređenju sa referentnim preparatom (p < 0,05).

Generalno, ukupna količina takrolimusa koja je oslobođena nakon 24 h iz svih formulacija je relativno niska. Naime, tek $10,85 \pm 1,85$ %, $11,14 \pm 1,43$ % i $13,21 \pm 1,38$ % takrolimusa je oslobođeno iz formulacija ECV 35, ICV 35 i ICV 60, dok je iz NLC formulacije (PCLP 4:6) oslobođeno $10,60 \pm 1,09$ %, a iz nanoemulzije (CLP 10) $5,00 \pm 1,92$ %. S druge strane, količina takrolimusa oslobođena iz referentne masti je značajno manja ($0,85 \pm 0,28$ %) i u skladu je sa rezultatima dobijenim od strane drugih autora (Pople i Singh, 2010). Ovako niska količina oslobođenog takrolimusa iz formulacija i referentne masti je u skladu sa preporukama za *in vitro* studije oslobađanja aktivnih supstanci iz topikalnih formulacija, prema kojima je količina oslobođene supstance u akceptorskom medijumu očekivano manja od 30 % količine koja je nanete u donorskom kompartmentu (Shah i sar., 1999), što dodatno osigurava prisustvo "sink" uslova za lekovitu supstancu.

Rezultati oslobađanja takrolimusa iz odabranih formulacija (U/V mikroemulzije ICV 60, bikontinuiranih mikroemulzija ECV 35 i ICV 35, nanoemulzije CLP 10 i nanostrukturiranih lipidnih čestica PCLP 4:6), kao i referentnog preparata (Protopic® mast) analizirani su korišćenjem matematičkih modela prikazanih u tabeli Tabela 4-13. Na osnovu vrednosti koeficijenta determinacije (R^2), može se zaključiti koji model najbolje opisuje kinetiku oslobađanja lekovite supstance iz formulacija.

Tabela 4-13 Prikaz matematičkih modela i koeficijenta determinacije (R^2) korišćenih u određivanju kinetike oslobađanja takrolimusa iz mikroemulzionih formulacija (ECV 35, ICV 35, ICV 60), nanostrukturiranih lipidnih čestica (PCLP 4:6), nanoemulzije (CLP 10) kao i referentne masti (Protopic®). Najveće vrednosti R^2 označene su podebljanim fontom.

Matematički model	Jednačina	ECV 35	ICV 35	ICV 60	PCLP 4:6	CLP 10	Protopic®
Model nultog reda	$Q_t = Q_0 + K_0 * t$	0,9984	0,9983	0,9985	0,9946	0,9965	0,9820
Model prvog reda	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 * t$	0,6751	0,6692	0,6775	0,7854	0,7087	0,8482
Higuchi model	$Q_t = K_H * t^{1/2}$	0,9328	0,9302	0,9354	0,9669	0,9239	0,9878
Korsmeyer-Peppas model	$(Q_t/Q_\infty) = K_{KP} * t^n$	0,9880	0,9977	0,9881	0,9856	0,9872	0,9820
Hixson Crowell	$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_{HC} * t$	0,9975	0,9973	0,9979	0,9956	0,9946	0,9821

Q_t - količina lekovite supstance oslobođene u vremenu t , Q_0 - početna količina lekovite supstance, Q_t/Q_∞ - frakcija oslobođenog leka u vremenu t , Q_∞ - količina oslobođenja supstance u beskonačnom vremenu, K_0 , K_1 , K_H , K_{KP} , K_{HC} - konstante odgovarajućih modela, n - eksponent oslobađanja

Oslobađanje takrolimusa iz mikroemulzionih formulacija i nanoemulzije najbolje se može opisati korišćenjem modela nultog reda, što ukazuje na konstantno oslobađanje lekovite supstance iz formulacija, koje ne zavisi od njene koncentracije u nosaču. Interesantno, najveći koeficijent determinacije u analizi oslobađanja takrolimusa iz nanostrukturiranih lipidnih čestica dobijen je korišćenjem Hixson Crowell modela, koji opisuje oslobađanje lekovite supstance iz sistema kod kojih dolazi do promena u površini i dijametru čestica. S obzirom na to da ovaj nosač sadrži nanočestice izrađene od smeše čvrstog i tečnog lipida, pri čemu je takrolimus dominantno rastvoren u kompartmentima tečnog lipida, kao i to da može doći do postepene degradacije nanočestica tokom ispitivanja, dobijeni rezultat je u skladu sa očekivanjima. Ovaj tip oslobađanja iz NLC primećen je i od strane drugih istraživačkih grupa (Gadhav i sar., 2019; Lee i sar., 2014).

Za razliku od ispitivanih formulacija, oslobađanje takrolimusa iz referentne masti može se opisati korišćenjem Higuchi modela. Imajući u vidu to da je takrolimus rastvoren u propilenkarbonatnim kapima dispergovanim u masnoj fazi, može se očekivati da je ograničavajući faktor u oslobađanju takrolimusa iz masti zapravo difuzija kroz masnu fazu u akceptorski kompartment i zavisi od koncentracionog gradijenta lekovite supstance.

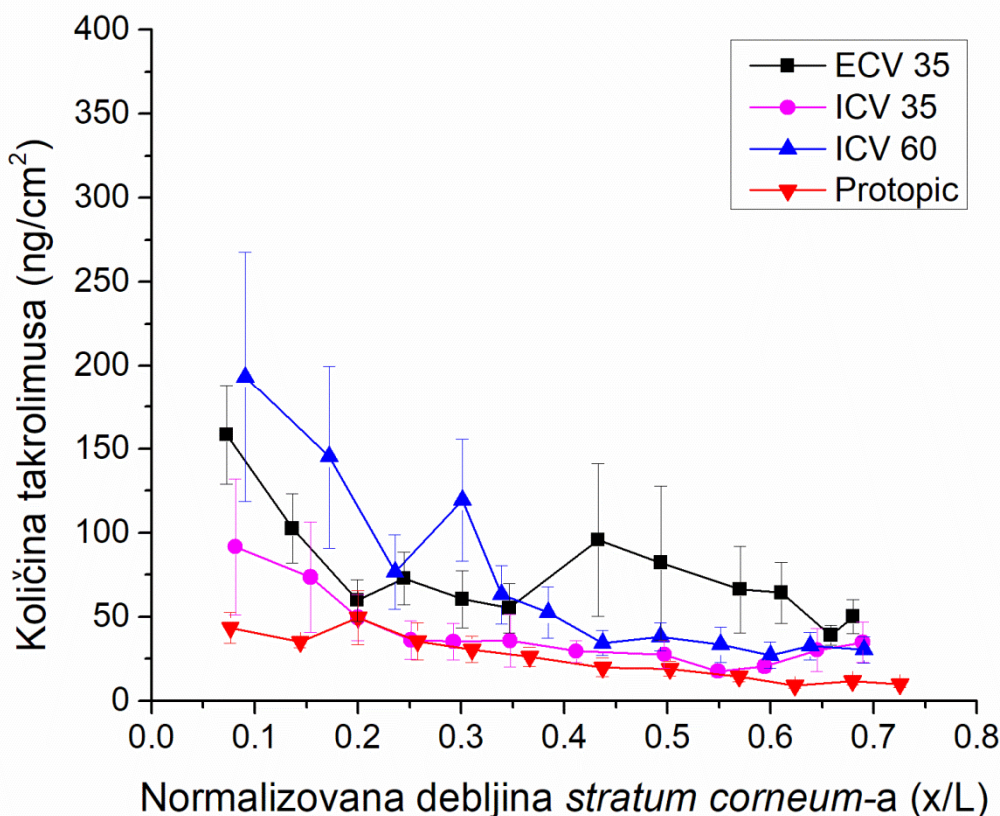
4.5.2 *In vitro* ispitivanje dermalne raspoloživosti / penetracije takrolimusa iz mikroemulzija u kožu uha svinje primenom metode sa trakama (engl. *tape stripping*)

U ispitivanjima dermalne raspoloživosti lekovitih supstanci koža uha svinje se pokazala kao izuzetno dobar model sistem, budući da poseduje visoku sličnost sa strukturom humane kože (Klang i sar., 2012). *In vitro* ispitivanje penetracije lekovite supstance u kožu uha svinje korišćenjem metode sa trakama može biti dobar indikator njene dermalne raspoloživosti iz primenjenog nosača budući da postoji korelacija između količine supstance prisutne u *stratum corneum*-u i količine supstance koja dospeva do dubljih slojeva kože (Corderly i sar., 2017). Dodatno, s obzirom na to da je *stratum corneum* glavna barijera za penetraciju lekovitih supstanci u dublje slojeve kože, povećana količina takrolimusa u ovom sloju kože se može smatrati rezervoarom iz kog lekovita supstanca vremenom može da permeira u dublje slojeve kože (Hadgraft i Lane, 2016), u kojima će ispoljiti svoje dejstvo.

Penetracioni profili takrolimusa iz bikontinuiranih mikroemulzija (ECV 35 i ICV 35), U/V mikroemulzije (ICV 60) i referentne masti (Protopic®) prikazani su na slici Slika 4-22, dok je

ukupna količina takrolimusa koja je penetrirala u *stratum corneum*-u prikazana na slici Slika 4-23. Iako je uočena relativno velika varijabilnost u količini takrolimusa ekstrahovanog iz traka nakon primene mikroemulzionih formulacija, prototip uzorci ECV 35 i ICV 60 su se pokazali kao superiorniji u poređenju sa referentnim preparatom u isporuci takrolimusa, posebno u dubljim slojevima *stratum corneum*-a. Ukupna količina takrolimusa koja je penetrirala u *stratum corneum* iz ovih formulacija je oko 3 puta veća od količine koja je penetrirala pri upotrebi referentnog preparata. S druge strane, penetracija takrolimusa iz bikontinuirane mikroemulzija ICV 35 nije bila značajno veća u poređenju sa referentnim preparatom, iako se može uočiti određeni trend poboljšanja penetracije.

Kada se međusobno uporedi penetracija takrolimusa iz bikontinuiranih mikroemulzija, koje se razlikuju isključivo po korišćenom kosurfaktantu (ECV 35 koja sadrži etanol i ICV 35 koja sadrži izopropanol), može se uočiti trend bolje penetracije takrolimusa nakon primene formulacije ECV 35. Budući da su kratkolančani alkoholi poznati kao hemijski pojačivači penetracije (Lane, 2013; Münch i sar., 2017), može se pretpostaviti da je etanol imao izraženiji efekat na poboljšanje penetracije takrolimusa od izopropanola. Međutim, razlika između ove dve formulacije nije statistički značajna, verovatno usled velike varijabilnosti rezultata.



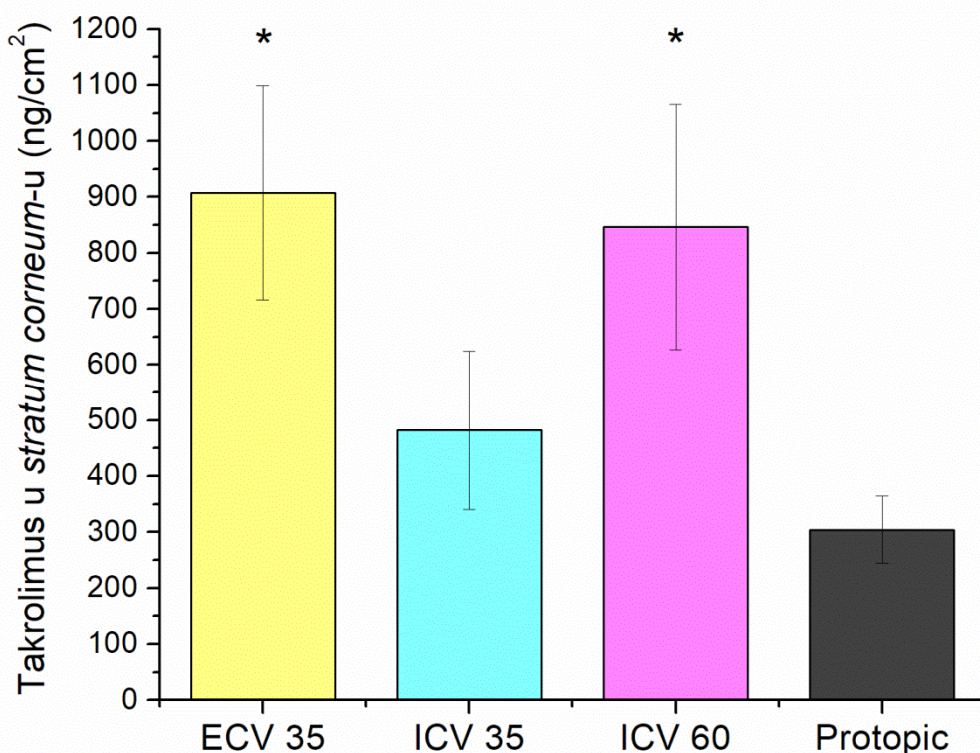
Slika 4-22 Penetracioni profili takrolimusa nakon tretmana bikontinuiranim mikroemulzijama (ECV 35 i ICV 35), U/V mikroemulzijom (ICV 60) i referentnim preparatom (Protopic® mast); srednja vrednost ± standardna greška, n = 5.

Dalje, poređenjem efekta bikontinuirane mikroemulzije (ICV 35) i U/V mikroemulzije (ICV 60), nije dobijena statistički značajna razlika u penetraciji takrolimusa, iako se može uočiti određeni trend u boljoj penetraciji nakon primene U/V mikroemulzije. S obzirom na to da ICV 35 sadrži relativno veću količinu lecitina i izopropanola, ovaj rezultat je zapravo u suprotnosti od naših očekivanja. Naime, poznato je da lecitin može da interaguje sa lipidima *stratum corneum*-a čineći ih fluidnijim, što omogućava bolju penetraciju lekovite supstance (Changez i sar., 2006; Hoeller i sar.,

2008; Schwarz i sar., 2012). Dodatno, izopropanol se može koristiti kao hemijski pojačivač penetracije (Lane, 2013). Stoga je očekivano da će formulacija koja sadrži više lecitina i izopropanola omogućiti bolju penetraciju lekovite supstance. Međutim, U/V mikroemulzija sadrži dosta više vode (60 % u poređenju sa 35 %), koja može biti odgovorna za proširivanje međucelijskih spojnica u *stratum corneum*-u i formiranje vodenih kanala kroz koje se lakše transportuju lekovite supstance (Changez i sar., 2006; Hoppel i sar., 2014).

Poređenjem ukupne količine takrolimusa ekstrahovane iz *stratum corneum*-a nakon dvočasovnog tretmana kože mikroemulzijama (Slika 4-23), može se uočiti da je značajno veća količina takrolimusa penetrirala nakon aplikacije ECV 35 i ICV 60 ($906,97 \pm 191,37 \text{ ng/cm}^2$ i $846,30 \pm 219,50 \text{ ng/cm}^2$, respektivno) u poređenju sa referentnim preparatom ($304,35 \pm 60,01 \text{ ng/cm}^2$). Iako je uočena povećana penetracija takrolimusa iz formulacije ICV 35 ($482,28 \pm 142,43 \text{ ng/cm}^2$) u poređenju sa referentnim preparatom, ova razlika nije značajna, verovatno usled velike varijabilnosti dobijenih rezultata. Takođe, međusobnim poređenjem ispitivanih, strukturno različitih mikroemulzionih formulacija, nije dobijena statistički značajna razlika u ukupnoj količini takrolimusa koji je penetrirao u *stratum corneum*.

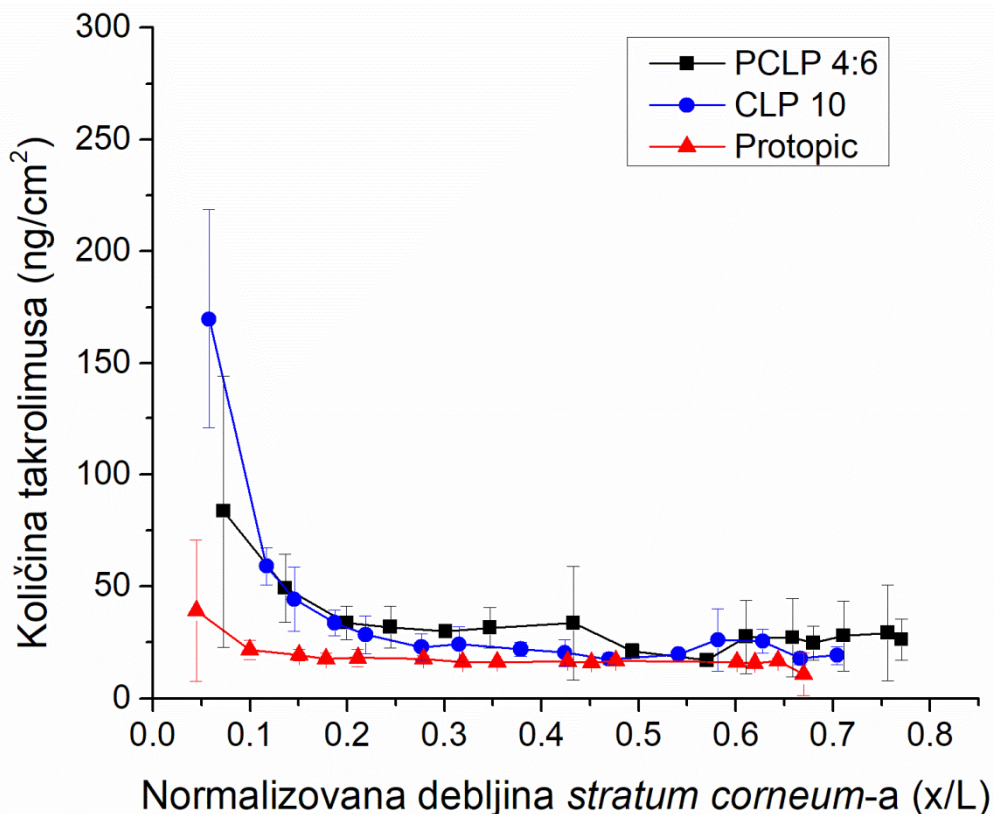
Imajući u vidu to da je ukupna količina takrolimusa u *stratum corneum*-u iz bikontinuirane mikroemulzije ECV 35 i U/V mikroemulzije ICV 60 vrlo slična (Slika 4-23), a da je količina surfaktanta i kosurfaktanta u formulaciji ECV 35 značajno viša, odlučeno je da se u daljim ispitivanjima koristi formulacija ICV 60 kao predstavnik mikroemulzija sa najmanjim sadržajem surfaktanta i kosurfaktanta.



Slika 4-23 Ukupna količina takrolimusa u *stratum corneum*-u nakon tretmana kože uha svinje bikontinuiranim mikroemulzijama (ECV 35, ICV 35), U/V mikroemulzijom (ICV 60) i referentnim preparatom (Protopic® mast). Srednja vrednost ± standardna greška, n = 5.

4.5.3 *In vitro* procena penetracije takrolimusa iz nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzija primenom tehnike diferencijalnog stripinga

Kako bi se procenila penetracija takrolimusa iz nanostrukturiranih lipidnih čestica i nanoemulzija u *stratum corneum* kože uha svinje, takođe je primenjena metoda sa trakama, kao i pri ispitivanju penetracije mikroemulzija. Penetracioni profili takrolimusa nakon dvočasovnog tretmana kože nanostrukturiranim lipidnim nosačem PCLP 4:6, nanoemulzijom CLP 10 i referentnim preparatom Protopic® prikazani su na slici Slika 4-24.

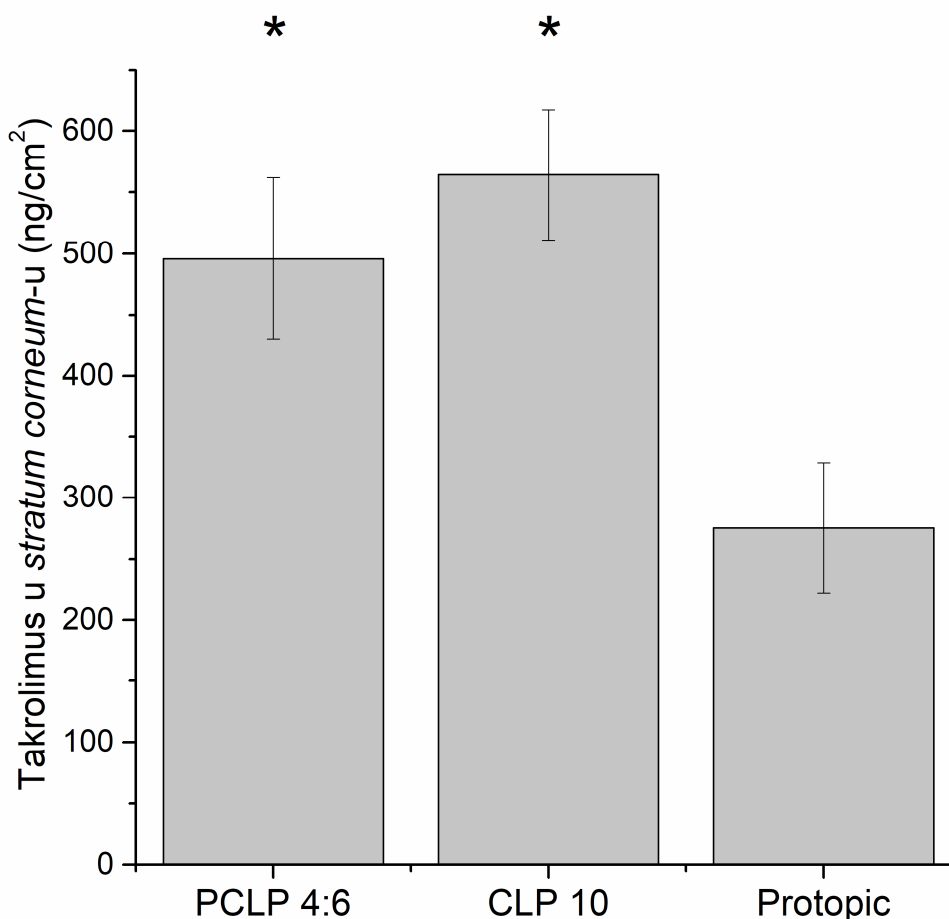


Slika 4-24 Penetracioni profili takrolimusa nakon tretmana nanostrukturiranim lipidnim česticama (PCLP 4:6 TAC), nanoemulzijom (CLP 10 TAC) i referentnim preparatom (Protopic® mast); srednja vrednost ± standardna devijacija, n = 3.

Sa penetracionih profila najpre se može uočiti to da je količina takrolimusa uklonjena prvom adhezivnom trakom relativno veća nakon primene nanoemulzije i nanostrukturiranih lipidnih čestica. Interesantno, s obzirom na izrazito različite organoleptičke karakteristike referentnog preparata u obliku masti (teško uklanjanje sa kože i masna tekstura) u poređenju sa ispitivanim formulacijama koje su vodene disperzije masne faze i mogu se lako ukloniti, moglo bi se očekivati da prva uklonjena traka sadrži neadekvatno uklonjenu formulaciju, pri čemu bi količina u prvoj traci bila najviša kod referentnog preparata. Međutim, u ovoj studiji je korišćena standardizovana tehnika kojom se efikasno uklanjaju rezidue formulacija sa kože uha svinje, tako da dobijeni rezultati zapravo predstavljaju količinu takrolimusa u početnim slojevima *stratum corneum*-a. Više količine lekovite supstance ekstrahovane iz prve trake nakon primene nanoemulzije i NLC ukazuju na to da ove formulacije imaju izuzetno jaku sposobnost adhezije na površinu kože. Dodatno, usled evaporacije vode iz ovih formulacija, dolazi do formiranja gustog filma nanokapi/nanočestica na površini kože, što sprečava evaporaciju vode iz kože i omogućava njenu hidrataciju (Zhou i sar., 2010). Osim toga, usled evaporacije vode iz formulacija dolazi do koncentrisanja lekovite supstance na mestu aplikacije, što povećava njen difuzioni gradijent i poboljšava njenu penetraciju kroz hidratizirani *stratum corneum*.

Poređenjem ukupne količine takrolimusa ekstrahovane iz *stratum corneum*-a nakon dvočasovnog tretmana kože ovim formulacijama, može se uočiti da je značajno veća količina takrolimusa penetrirala nakon aplikacije ispitivanih formulacija (495,84 ± 65,95 ng/cm² nakon primene PCLP 4:6, 564,12 ± 52,93 ng/cm² korišćenjem formulacije CLP 10) u poređenju sa referentnim preparatom (275,23 ± 53,54 ng/cm²). S druge strane, nije dobijena značajna razlika u količini takrolimusa u *stratum corneum*-u kada se uporede ove dve, strukturno različite formulacije. Ovo nije u skladu sa rezultatima pojedinih istraživačkih grupa, gde je uočena bolja penetracija lekovitih supstanci iz NLC formulacije (Wolf i sar., 2018), verovatno kao posledica intenzivnije hidratacije *stratum corneum*-a nakon primene NLC formulacije, čiji čvrsti lipidni matriks omogućava bolju okluziju kože (Montenegro i sar., 2017). Ipak, odsustvo razlike u našim ispitivanjima može se obrazložiti vrlo sličnim atributima ovih formulacija kao što su veličina kapi/čestica dispergovane faze i reološke karakteristike/prividni viskozitet formulacija.

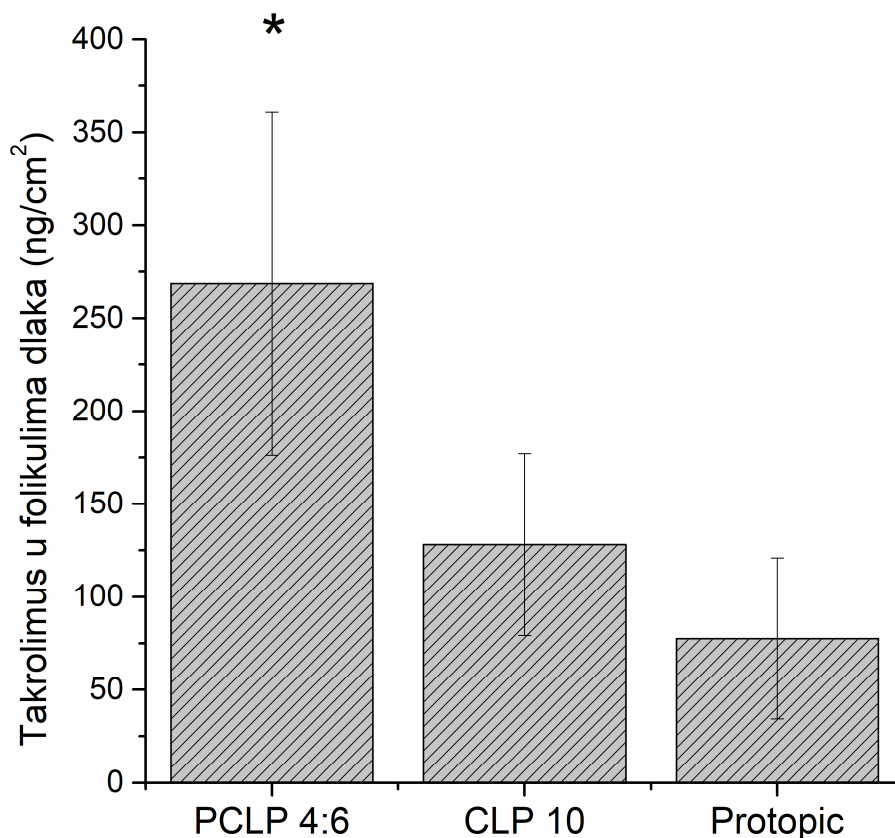
Interesantno, poređenjem količine takrolimusa u *stratum corneum*-u nakon primene ovih nosača (Slika 4-25) i nakon primene mikroemulzija (Slika 4-23) očekivano je da će mikroemulzije dovesti do značajno bolje penetracije takrolimusa usled prisustva velike količine surfaktanta i kosurfaktanta koji mogu da se ponašaju kao hemijski pojačivači penetracije jer interaguju sa lipidima *stratum corneum*-a. Međutim, iako je količina takrolimusa nakon dvočasovnog tretmana mikroemulzionim formulacijama ECV 35 i ICV 60 bila oko dva puta veća nego nakon primene nanostrukturiranog lipidnog nosača i nanoemulzije, ova razlika nije ispoljila statističku značajnost, verovatno usled velike varijabilnosti rezultata.



Slika 4-25 Količina takrolimusa u *stratum corneum*-u nakon dvočasovne primene nanostrukturiranih lipidnih čestica (PCLP 4:6), nanoemulzije (CLP 10) i referentnog preparata (Protopic[®] mast). Srednja vrednost ± standardna devijacija, n = 3, * statistički značajna razlika u poređenju sa referentnim preparatom.

U literaturi se mogu naći oprečni podaci o mogućnosti penetracije nanostrukturiranih lipidnih čestica u *stratum corneum*. Ipak, dominantan je stav da ovi nosači imaju potencijal za dermalnu isporuku lekovitih supstanci ukoliko mogu da oslobode lekovitu supstancu u određenom vremenskom intervalu i na odgovarajućoj lokaciji u folikulima dlaka, gde mogu nastati rezervoari lekovite supstance iz kojih će ona penetrirati u dublje slojeve kože koji okružuju folikule dlake (Lademann i sar., 2007; Patzelt i sar., 2017). Upravo zbog toga je od velike važnosti proceniti količinu lekovite supstance prisutne u folikulima dlaka nakon primene NLC formulacije. Dodatno, ovi nosači bi u vidu losiona bili pogodni za primenu na kosmatim površinama, što je dodatno značajno imajući u vidu da je jedini referentni preparat sa takrolimusom dostupan na tržištu u vidu masti, koja se relativno teško nanosi i razmazuje po kosmatoj površini.

Zbog toga je dodatno određena količina takrolimusa u folikulima dlake nakon tretmana formulacijom PCLP 4:6 i CLP 10 tako što je, nakon uklanjanja slojeva *stratum corneum*-a primenom adhezivnih traka, odrađena cijanoakrilatna površinska biopsija kože. Zapravo, na tretiranim mestima nanet je cijanoakrilatni lepak, koji može da proдре u folikule dlake i na taj način fizički ekstrahuje takrolimus koji se u njima nalazi. Rezultati su prikazani na slici Slika 4-26. Najveća količina takrolimusa ekstrahovana iz folikula dlaka ($268.54 \pm 92.38 \text{ ng/cm}^2$) dobijena je primenom nanostrukturiranog lipidnog nosača (PCLP 4:6), i statistički je značajno veća od količine takrolimusa u folikulima dlake nakon tretmana referentnom mašču ($77.61 \pm 43.25 \text{ ng/cm}^2$). Primena nanoemulzije nije značajno povećala količinu takrolimusa prisutnu u folikulima dlake ($128.17 \pm 48.87 \text{ ng/cm}^2$) u poređenju sa referentnom mašču. Dobijeni rezultati takođe ukazuju i na superiornost folikularne isporuke takrolimusa nakon primene nanostrukturiranih lipidnih čestica u poređenju sa nanoemulzijom, međutim, usled velike varijacije rezultata, ova razlika nije statistički značajna. Primenom ovih formulacija na humanim ispitanicima mogla bi se očekivati još veća količina takrolimusa u folikulima dlaka usled fiziološkog pomeranja dlaka, koje može dodatno da poboljša folikularnu isporuku lekovitih supstanci (Ilic i sar., 2018; Lademann i sar., 2007; Radtke i sar., 2017).



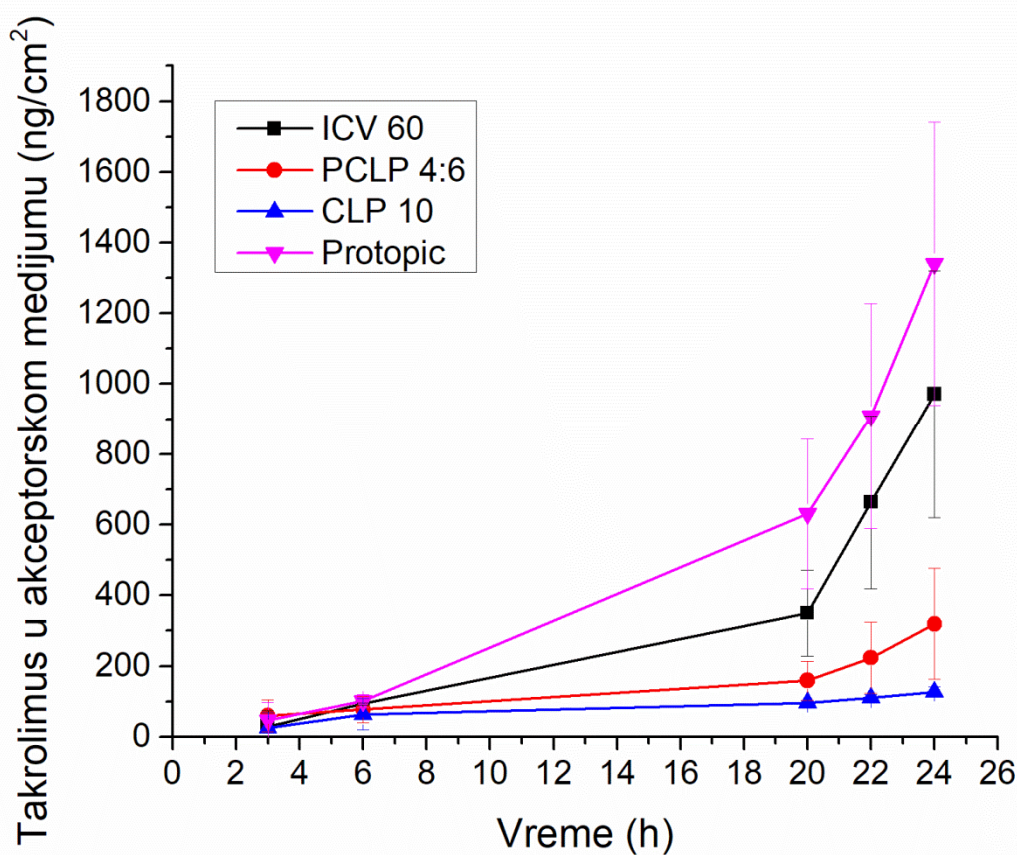
Slika 4-26 Količina takrolimusa ekstrahovana iz folikula dlaka nakon dvočasovne primene nanostrukturiranih lipidnih čestica (PCLP 4:6), nanoemulzije (CLP 10) i referentnog preparata. Srednja vrednost ± standardna devijacija, n = 3, * statistički značajna razlika u poređenju sa referentnim preparatom.

4.5.4 *In vitro* ispitivanje permeacije takrolimusa kroz kožu uha svinje pune debljine korišćenjem Franz-ovih difuzionih ćelija

Studije penetracije takrolimusa opisane u prethodnim poglavljima, sprovedene su na *ex vivo* modelu uha svinje, pri čemu je koža celog uha svinje, koje je pričvršćeno za ploču od stiropora, direktno tretirana formulacijama u trajanju od dva sata. Na ovaj način može se steći uvid u količinu takrolimusa prisutnu u *stratum corneum*-u, koja predstavlja rezervoar za dalju postepenu permeaciju u dublje slojeve kože. Međutim, kako bi se direktnije procenila brzina i stepen permeacije takrolimusa kroz slojeve kože, sprovedeno je 24-časovno ispitivanje permeacije na Franz-ovim difuzionim ćelijama, koristeći kožu uha svinje pune debljine kao membranu između donorskog i akceptorskog kompartmenta. Dodatno, praćenjem količine takrolimusa u akceptorskom kompartmentu, može se sagledati količina takrolimusa koja bi eventualno bila resorbovana u sistemsku cirkulaciju, čime bi se povećao rizik od nastanka sistemskih neželjenih efekata (Olson i sar., 2014), budući da su vijabilni epidermis i dermis ciljana mesta dejstva topikalno primenjenog takrolimusa.

Poređenjem permeacionih profila nakon primene mikroemulzije (ICV 60), nanostrukturiranog lipidnog nosača (PCLP 4:6), nanoemulzije (CLP 10) i referentne masti, može se uočiti da su vrlo male količine takrolimusa permeirale nakon 3 h i 6 h od aplikacije, pri čemu nije uočena statistički značajna razlika u količini permeiralog takrolimusa između svih formulacija (Slika 4-27). Međutim, u kasnijim vremenskim intervalima, odnosno nakon 20 h, 22 h i 24 h od aplikacije formulacija, može se uočiti da je značajno manje takrolimusa permeiralo u akceptorski medijum iz NLC formulacije PCLP 4:6 i nanoemulzije CLP 10 u poređenju sa referentnom mašću i mikroemulzijom

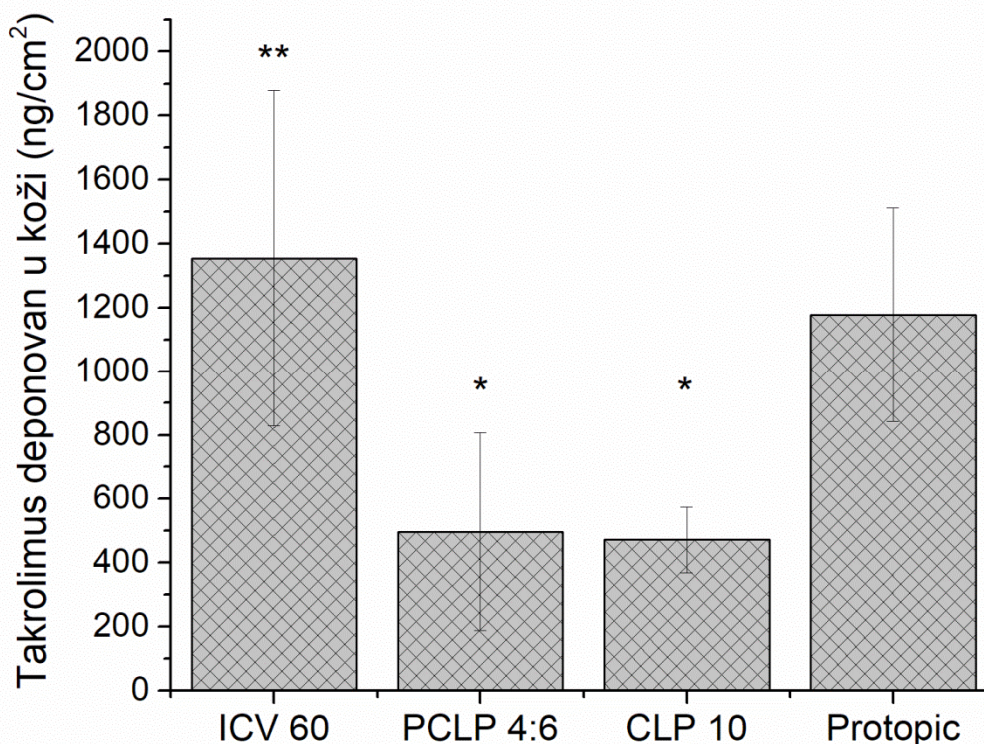
ICV 60, dok nema značajne razlike u količini permeiralog takrolimusa između mikroemulziona formulacije i referentne masti.



Slika 4-27 Količina takrolimusa koja je permeirala u akceptorski medijum nakon primene U/V mikroemulzije (ICV 60), nanostrukturiranih lipidnih čestica (PCLP 4:6), nanoemulzije (CLP 10) i referentne masti (Protopic®). Srednja vrednost ± standardna devijacija, n = 6.

Najveća brzina permeacije postignuta je primenom referentne masti ($177,46 \pm 49,06$ ng/cm²/h) i mikroemulzije ICV 60 ($155,12 \pm 57,10$ ng/cm²/h), zatim nanostrukturiranih lipidnih čestica PCLP 4:6 ($39,87 \pm 25,47$ ng/cm²/h), dok je nanoemulzija CLP 10 dovela do značajno manje brzine permeacije u poređenju sa ostalim formulacijama ($8,02 \pm 2,75$ ng/cm²/h).

Nakon 24-časovne studije permeacije na Franz-ovim difuzionim ćelijama izvršeno je ekstrahovanje takrolimusa iz isečaka kože koji su korišćeni kao biološka membrana između donorskog i akceptorskog kompartenta, kako bi se procenila ukupna količina takrolimusa koja je deponovana u koži. Najveća količina takrolimusa deponovana je primenom mikroemulzije ICV 60 i referentne masti, dok je značajno manja količina takrolimusa deponovana u koži pri primeni NLC formulacije PCLP 4:6 i nanoemulzije CLP 10 (Slika 4-28).



Slika 4-28 Ukupna količina takrolimusa deponovana u koži uha svinje pune debljine nakon 24-časovnog *in vitro* ispitivanja permeacije takrolimusa iz U/V mikroemulzije (ICV 60), nanostrukturiranih lipidnih čestica (PCLP 4:6), nanoemulzije (CLP 10) i referentne masti (Protopic®). Srednja vrednost ± standardna devijacija, n = 6, * statistički značajna razlika u odnosu na referentni preparat, ** statistički značajna razlika u odnosu na druge razvijene nanoformulacije.

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se uočiti značajne razlike u permeaciji takrolimusa iz U/V mikroemulzije, NLC i nanoemulzije. Naime, mikroemulzija je ispoljila značajno veću brzinu permeacije, kao i veću ukupnu količinu takrolimusa koji je deponovan u koži, što je i očekivano budući da ona sadrži najveću količinu lecitina, kao i relativno veliku količinu izopropanola, pri čemu se oba ekscipijensa smatraju pojačivačima penetracije usled njihove intenzivne interakcije sa lipidima u *stratum corneum*-u (Lane, 2013; Schwarz i sar., 2012). Dodatno, mikroemulzija sadrži najmanju veličinu kapi unutrašnje faze, kojom se može objasniti jednostavnije inter- i intracelularno prodiranje lekovite supstance. Ipak, povećana količina aktivne supstance u akceptorskom medijumu može da ukaže i na povećani rizik od ispoljavanja sistemskih neželjenih efekata. Generalno, nakon topikalne primene masti sa takrolimusom, minimalne količine takrolimusa su detektovane u sistemske cirkulaciji (Undre i sar., 2009). Bez obzira na to, registrovani su slučajevi toksičnih nivoa takrolimusa nakon primene masti, posebno ukoliko je tretman vršen pod okluzijom ili je tretirana velika površina tela (Olson i sar., 2014). Kada se uporede NLC i nanoemulzija, koji imaju isti sadržaj surfaktanata, kao i sličnu veličinu kapi/čestica unutrašnje faze i prividni viskozitet, iznenađujuće je to što je NLC ispoljio veću brzinu permeacije, kao i veću količinu permeiralog takrolimusa nakon 20 h, 22 h i 24 h od aplikacije u poređenju sa nanoemulzijom. Ipak, u literaturi su opisani rezultati koji ukazuju na bolju *in vitro* okluziju kože i povećanu *in vivo* hidrataciju kože nakon primene NLC u poređenju sa nanoemulzijama (Montenegro i sar., 2017). Stoga možemo pretpostaviti da je bolja okluzija kože usled prisustva čvrstog lipidnog matrkisa u formulaciji PCLP 4:6 dovela do povećane hidratacije kože i time povećane permeacije takrolimusa. Dodatno, evaporacija vode iz ove formulacije je mogla da indukuje transformaciju kristalne rešetke lipidnog matriksa u uređeniju formu, što bi za posledicu moglo imati ekspulziju lekovite supstance i povećanje njene termodinamičke aktivnosti, samim tim i povećanje penetracije takrolimusa u kožu

(Müller i sar., 2002). Takođe, povećani sadržaj takrolimusa u folikulima dlaka nakon primene formulacije PLCP 4:6 (Slika 4-26) svakako je mogao uticati na bolju permeaciju lekovite supstance. Iako se mikroemulzionna formulacija pokazala superiornijom u poređenju sa NLC formulacijom, prednost korišćenja lipidnih nanočestica bi upravo mogla biti manja sistemska toksičnost usled resorpcije aktivne supstance, što je zapaženo i od strane drugih autora (Bhise i sar., 2017; Chaiyana i sar., 2020; Liu i sar., 2007).

Poređenjem *in vitro* permeacionih profila kroz kožu uha svinje pune debljine sa *in vitro* profilima oslobađanja takrolimusa iz razvijenih nanonosača kroz sistemsku membranu (poglavlje 4.5.1) može se uočiti sličan trend, odnosno da su najintenzivnije oslobađanje i najveća permeacija iz razvijenih nanonosača postignute primenom mikroemulzije ICV 60, potom nanostrukturiranog lipidnog nosača PCLP 4:6 i nanoemulzije CLP 10, što ukazuje na to da primena sintetske membrane može relativno dobro opisati dermalnu isporuku takrolimusa iz formulacija. Ovo je i očekivano budući da sve tri razvijene formulacije predstavljaju vodene disperzije kod kojih je takrolimus inkorporiran u nanometarskim kapima/česticama masne faze, i sve imaju relativno slične vrednosti prividnog viskoziteta. Međutim, iznenađujući rezultat dobijen je za referentnu mast, pri čemu je ona ispoljila najmanje oslobađanje takrolimusa kroz sintetsku membranu, a najveću permeaciju takrolimusa kroz kožu uha svinje pune debljine.

Slično tome, poređenjem *in vitro* permeacionih profila sa *in vitro* penetracionim profilima (poglavlja 4.5.2 i 0) može se uočiti saglasnost rezultata kada su u pitanju razvijeni nanonosači, pri čemu je najveća penetracija, odnosno najveća permeacija postignuta korišćenjem mikroemulzije ICV 60, zatim nanostrukturiranog lipidnog nosača PCLP 4:6 i nanoemulzije CLP 10. Ipak, rezultati studije penetracije i studije permeacije su kontradiktorni kada je u pitanju primena referentne masti s obzirom na to da je najmanja penetracija dobijena nakon tretmana kože referentnom mašću, dok je u studiji permeacije referentna mast ispoljila najveću permeaciju takrolimusa kroz kožu uha svinje pune debljine u poređenju sa razvijenim nanonosačima.

Najverovatniji razlog ovako kontradiktornih rezultata nakon primene referentne masti može biti razlika u trajanju tretmana kože (2 h u studiji penetracije i 24 h u studiji permeacije) i posledično intenzivna okluzija kože u studiji permeacije od strane referentne masti, koja sadrži čvrsti i tečni parafin, vazelin i pčelinji vosak, koji imaju odlične okluzivne osobine i dovode do hidratacije *stratum corneum*-a. Naime, poznato je da se penetracija lekovitih supstanci povećava sa produženim trajanjem okluzije, s obzirom na to da dolazi do povećanja hidratacije kože. Produžena hidriranost kože (duža od 8 h) dovodi do bubrenja korneocita, formiranja pukotina između korneocita i nastanka mikrostrukturnih promena u organizaciji lipida kože (Tan i sar., 2010). Slično tome, utvrđeno je da fizičko-hemijske karakteristike nosača aktivne supstance mogu da uzrokuju reverzibilne izmene u slojevima kože, pri čemu produženo trajanje *in vitro* studije permeacije može da dovede do intenzivnije hidratacije kože i smanjenja njene barijerne funkcije (Prača i sar., 2018), čime se postiže veća percutana apsorpcija, posebno za vrlo lipofilne lekovite supstance (Hafeez i Maibach, 2013), kao što je takrolimus. Imajući to u vidu, možemo pretpostaviti da je duže trajanje *in vitro* studije permeacije dovelo do prenaplašene okluzije kože, i posledično intenzivnije permeacije takrolimusa iz masti. U prilog ovom obrazloženju ide i to što nije bilo značajne razlike u količini permealog takrolimusa između referentne masti i ostalih formulacija nakon 3 h i 6 h od aplikacije, dok se razlika javlja tek u kasnijim intervalima ispitivanja, kada efekti okluzije postaju dosta izraženiji. Takođe, nakon 24-časovne studije permeacije uočeno je da su isecci kože tretirane referentnom mašću mnogo više nabubrela tokom ispitivanja u poređenju sa netretiranom kožom i kožom tretiranom razvijenim nanonosačima, što dodatno ukazuje da je prenaplašena okluzija usled dugotrajnog izlaganja referentnoj masti odgovorna za dobijene iznenađujuće rezultate. Imajući u vidu sve rezultate, možemo pretpostaviti da su dobijene vrednosti za referentnu mast u *in vitro* permeacionoj studiji potencijalno prenaplašene usled intenzivnog okluzivnog efekta samog nosača, i da je veoma važno uzeti u obzir razlike u okluzivnom efektu ispitivanih formulacija, pogotovu kada se u ispitivanju koriste beskonačne, *infinite* doze i dugo vreme izlaganja, kao što je primećeno od strane drugih autora (Haque i sar., 2017).

Na kraju, važno je naglasiti da, osim dužeg vremena izlaganja, klasična postavka eksperimenta permeacije korišćenjem Franz-ovih difuzionih ćelija zahteva upotrebu akceptorskih medijuma koji mogu da utiču na kožnu barijeru, kao što je etanolni rastvor korišćen u ovoj studiji. Prisustvo etanola u akceptorskom medijumu neophodno je u cilju osiguranja sink uslova za takrolimus, s obzirom da se on vrlo slabo rastvara u vodi. Na osnovu našeg iskustva, rezultati penetracionih eksperimenata korišćenjem metode sa trakama bi realnije mogli da opišu ponašanje razvijenih formulacija i referentnog preparata u odgovarajućim kliničkim ispitivanjima, što je uočeno i od strane drugih autora (Klang i sar., 2011).

5 ZAKLJUČAK

Tokom **prve faze ispitivanja** prikupljena su nova saznanja od značaja u razvoju mikroemulzionih sistema stabilizovanih lecitinom.

- Na osnovu rezultata ispitivanja rastvorljivosti takrolimusa, kao tečna masna faza u razvoju naprednih nosača odabran je propilenglikol monokaprilat (Capryol[®] 90), koji je pokazao najbolje rastvaranje takrolimusa (komparativno najviša vrednost rastvorljivosti takrolimusa), a takođe se smatra perspektivnom masnom fazom usled njegove amfifilne prirode.
- Detaljnom analizom pseudoternarnih faznih dijagrama ulje/lecitin-kosurfaktant/voda i ulje/lecitin-kosurfaktant/voda-propilenglikol zaključeno je da odabir primarnog kosurfaktanta i masne faze značajno utiču na mogućnost formiranja mikroemulzionih regiona. Izopropanol se pokazao kao superiorni kosurfaktant u poređenju sa etanolom i propilenglikolom u formiranju mikroemulzija stabilizovanih lecitinom, usled bolje inkorporacije u međufaznu površinu čineći lecitinski monosloj fleksibilnijim. Takođe, formiranje mikroemulzionih regiona značajno je olakšano korišćenjem propilenglikol monokaprilata kao masne faze u poređenju sa kaprilno-kaprinским trigliceridima, što se može objasniti razlikom u njihovoj strukturi i lakšom interpenetracijom molekula surfaktanta i kosurfaktanata u manje voluminoznu masnu fazu kao što je propilenglikol monokaprilat.
- Primena propilenglikola kao sekundarnog kosurfaktanta u sklopu vodene faze nije omogućila značajno veću inkorporaciju vode i dobijanje visokodilutabilnih mikroemulzija, što ukazuje na adekvatnost primarnog kosurfaktanta da maksimalno omogući nastanak mikroemulzija stabilizovanih lecitinom. Ipak, propilenglikol kao sekundarni kosurfaktant omogućio je nastajanje U/V mikroemulzija sa manjim masenim udelom vode, čak i u kombinaciji sa etanolom, koji nije doveo do formiranja U/V mikroemulzija kada je korišćen kao jedini kosurfaktant.
- Studije provodljivosti mikroemulzija tokom razblaživanja, kao i DSC analiza pružile su uvid u unutrašnju strukturu odabranih uzoraka. Takođe je pokazana važnost korišćenja ovih komplementarnih metoda u cilju dobijanja pouzdanih rezultata, budući da pojedinačni rezultati DSC analize nisu omogućili predviđanje unutrašnje strukture mikroemulzija usled krioprotektivnog efekta korišćenog propilenglikola kao sekundarnog kosurfaktanta u sklopu vodene faze.

Rezultati **druge faze ispitivanja** ukazali su na saznanja neophodna za izradu nanostrukturiranih lipidnih čestica stabilizovanih lecitinom korišćenjem metode homogenizacije pod visokim pritiskom uz zagrevanje.

- Na osnovu preliminarnih rezultata mešljivosti odabranih čvrstih lipida (glicerilpalmitostearat - Precirol[®] ATO 5, gliceriltrimiristat - Dynasan 114 i gliceriltristearat Dynasan 118) sa propilenglikol monokaprilatom (Capryol[®] 90) kao tečnim lipidom u kome se takrolimus najbolje rastvara, uočeno je da jedino pri korišćenju Precirol[®] ATO 5 ne dolazi do izdvajanja kapi tečne lipidne faze iz čvrstog matriksa, te je Precirol[®] ATO 5 odabran kao čvrsti lipid za izradu nanostrukturiranih lipidnih čestica. Termalnom analizom smeša čvrstog i tečnog lipida u različitim masenim odnosima, odabrani su maseni odnosi 6:4, 5:5 i 4:6 za nastavak ispitivanja s obzirom na to da sadrže dovoljnu količinu tečnog lipida kako bi se omogućilo adekvatno rastvaranje takrolimusa, a ne dovode do narušavanja čvrste strukture lipidnog matriksa.
- Već u preliminarnim rezultatima ove faze ispitivanja izdvojili su se određeni kritični formulacioni i procesni parametri koji su imali veliki uticaj na mogućnost dobijanja nanostrukturiranih lipidnih čestica. Tu spadaju ukupni udeo masne faze, pri čemu su formulacije gelirale pri korišćenju više od 10 % masne faze; tip korišćenog

surfaktanta, pri čemu nije bilo moguće dobiti nanostrukturirane lipidne čestice korišćenjem samo polisorbata 80 bez lecitina kao glavnog surfaktanta; i intenzivno hlađenje nakon homogenizacije pod visokim pritiskom, koje je rezultovalo geliranjem formulacija.

- Pokazano je da je moguće izraditi nanoemulziju korišćenjem iste metode i istih eksperimentalnih uslova kao u izradi nanostrukturiranih lipidnih čestica. Naime, bilo je moguće zameniti čvrsti lipidni matriks, koji je sastavljen od smeše čvrstog i tečnog lipida u nanostrukturiranim lipidnim česticama, isključivo tečnim lipidom (uljem), bez neophodne promene količine surfaktanta (1 % lecitina i 1 % polisorbata 80) upotrebljenih u njihovoj izradi, kao ni promene procesnih parametara.

Treća faza ispitivanja dala je detaljniji uvid u fizičko-hemijske karakteristike razvijenih nosača, uticaj variranih formulacionih i procesnih parametara na njihove osobine, mogućnost inkorporacije takrolimusa, kao i stabilnost formulacija tokom skladištenja.

- Kada su u pitanju fizičko-hemijske karakteristike razvijenih nanonosaa, mikroemulziona formulacije su ispoljile najmanju veličinu kapi (19 nm - 76 nm) sa relativno niskim indeksom polidisperziteta, pri čemu je evidentno da upotreba izopropanola dovodi do formiranja kapi manjih dimenzija zbog nastajanja fleksibilnijeg lecitinskog filma na međufaznoj površini, dok upotreba propilenglikola kao sekundarnog kosurfaktanta u sklopu vodene faze dovodi do nastajanja većih kapi, usled smanjenja količine lecitina u sistemu. Veličina čestica kod nanostrukturiranih lipidnih nosača dosta je zavisila od kritičnih formulacionih parametara, kao što su ukupna količina masne faze i odnos čvrstog i tečnog lipida u lipidnom matriksu, ali je svakako iznosila manje od 200 nm. Veličina čestica se povećavala sa porastom udela čvrste masne faze, kao i sa ukupnom količinom inkorporirane masne faze. S druge strane, promena količine surfaktanta u ovoj studiji nije pokazala značajan uticaj na veličinu čestica. Vrlo je važno naglasiti i to da je primena komplementarne tehnike laserske difrakcije omogućila detektovanje prisustva malog broja mikrometarskih agregata u formulaciji izrađenoj korišćenjem nižeg pritiska tokom homogenizacije, kao i u formulaciji kod koje nije korišćen polisorbit 80 kao dodatak lecitinu. Ovi mikrometarski agregati nisu uočeni korišćenjem PCS tehnike. Zbog toga je važno koristiti obe metode pri analizi termodinamički nestabilnih sistema, kod kojih može doći do formiranja agregata, kako bi se osiguralo dobijanje pouzdanih rezultata. Nanoemulzije su ispoljile nešto manju veličinu kapi u poređenju sa komparabilnim nanostrukturiranim lipidnim česticama. Sve razvijene formulacije su ispoljavale blago kiselu pH vrednost, što dodatno osigurava mogućnost dermalne primene, kao i stabilnost takrolimusa nakon inkorporacije budući da dolazi do njegove degradacije u baznoj sredini.
- Dok su mikroemulzije i nanoemulzije ispoljavale relativno nizak viskozitet tokom skladištenja, prividni viskozitet nanostrukturiranih lipidnih čestica značajno je zavisio od variranih formulacionih parametara, kao što su ukupna količina masne faze i odnos čvrstog i tečnog lipida, pri čemu su pojedine formulacije gelirale nedugo nakon izrade.
- EPR analiza mikroemulzionih formulacija pružila je detaljniji uvid u fluiditet međupovršinskog filma i potvrdila veću fleksibilnost ovog filma, pogotovu u regionima bližim polarnim glavama surfaktanta, kada je korišćen izopropanol u poređenju sa etanolom, što je u skladu sa rezultatima prve faze istraživanja. Takođe, potvrđeno je postojanje rigidnijeg, gušće pakovanog međupovršinskog filma u U/V mikroemulzijama u poređenju sa bikontinuiranim mikroemulzijama. Na osnovu rezultata ove studije utvrđeno je i to da je takrolimus dominantno lokalizovan u masnoj fazi, kao i lipofilnim delovima međupovršinskog filma.

- Za razliku od mikroemulzija, koje imaju visoki kapacitet solubilizacije kako hidrofilnih tako i lipofilnih lekovitih supstanci, problem kod nanostrukturiranih lipidnih čestica može upravo biti nezadovoljavajuća inkorporacija takrolimusa. Ipak, pažljivim odabirom ekscipijena omogućena je potpuna inkorporacija takrolimusa u svim formulacijama. Uprkos tome, važno je naglasiti i to da postoji velika razlika između mikroemulzija i nanostrukturiranih lipidnih čestica/nanoemulzija u postupku inkorporiranja takrolimusa. Naime, takrolimus može relativno lako biti inkorporiran u prethodno pripremljene mikroemulzije, dok je za njegovu inkorporaciju u nanostrukturirane čestice i nanoemulzije neophodno inkorporirati ga tokom izrade samih nosača. Ovo bi moglo biti značajno u slučaju potrebe za *ex tempore* izradom formulacija sa takrolimusom korišćenjem dostupnih mikroemulzionih vehikuluma, ili u slučaju potrebe inkorporacije veoma termolabilnih lekovitih supstanci koje bi bile osetljive na zagrevanje tokom samog procesa izrade nosača.
- Praćenjem stabilnosti takrolimusa u mikroemulzijama tokom godinu dana nije uočena njegova degradacija i značajan pad u koncentraciji, što ukazuje na njegovu zadovoljavajuću stabilnost, koja je dominantno postignuta njegovom lokalizacijom unutar masne faze, kao i umereno kiselom pH vrednošću formulacija.
- Velika razlika u razvijenim nosačima uočena je prilikom praćenja stabilnosti formulacija. Naime, mikroemulzije, kao termodinamički stabilni sistemi, su superiorne u pogledu stabilnosti u poređenju sa ostalim nosačima i nisu ispoljile promene u strukturi tokom godinu dana skladištenja na sobnoj temperaturi. Nasuprot tome, iako je vrednost zeta potencijala kod nanoemulzije CLP 10 ukazivao na dobru stabilnost, ipak je došlo do narušavanja ovog sistema i formiranja krupnijih kapi nakon više od 3 meseca skladištenja. Za razliku od nanoemulzije, komparativni nanostrukturirani lipidni nosač PCLP 4:6 se pokazao stabilnim tokom 6 meseci skladištenja na sobnoj temperaturi. Zapravo, prisustvo čvrstog lipida u nanostrukturiranim lipidnim česticama omogućilo je usporene procese Ostvaldovog sazrevanja, čime je osigurana bolja stabilnost ove formulacije u poređenju sa nanoemulzijom.

U **četvrtj fazi ispitivanja** sprovedena je *in vivo* studija procene bezbednosnog profila/iritacionog potencijala placebo mikroemulzija, s obzirom na to da one predstavljaju najveći rizik od iritacije kože budući da sadrže najviši udeo surfaktana i kosurfaktana, iako su svi korišćeni ekscipijensi odabrani tako da budu biokompatibilni i bezbedni za primenu.

- Na osnovu rezultata ove faze ispitivanja može se zaključiti da sve mikroemulzije ispoljavaju zadovoljavajući bezbednosni profil s obzirom da nije uočena značajna promena u eritema indeksu i transepidermalnom gubitku vode, dok je samo jedna formulacija pokazala značajno povećanje hidratacije *stratum corneum*-a u poređenju sa kontrolnim vrednostima. Ipak, važno je naglasiti da su ovo preliminarni rezultati kratkotrajne studije sprovedene na malom broju zdravih dobrovoljaca, te je potrebno sprovesti opsežnije kliničke studije kako bi se utvrdilo odsustvo mogućnosti iritacije nakon ponovljene/dugotrajne primene mikroemulzionih formulacija.

Poslednja, **peta faza ispitivanja** pružila je uvid u biofarmaceutske karakteristike razvijenih nosača, na osnovu kojih se može analizirati njihova efikasnost u dermalnoj isporuci takrolimusa kao slabo rastvorne lekovite supstance velike molekulske mase.

- Na osnovu *in vitro* studije oslobađanja takrolimusa iz formulacija, može se zaključiti da je najbrže oslobađanje postignuto korišćenjem mikroemulziona U/V formulacije ICV 60, zatim iz bikontinuiranih mikroemulzija i nanostrukturiranih lipidnih čestica, potom iz nanoemulzije, dok je referentna mast ispoljila najsporije oslobađanje takrolimusa. Dok je kod mikroemulzija i nanoemulzije oslobađanje najbolje opisano kinetikom nultog reda, kod koje oslobađanje ne zavisi od koncentracije supstance u

nosaču, oslobađanje iz nanostrukturiranih lipidnih čestica zavisilo je od procesa degradacije nanočestica, odnosno od promene u dimenziji i obliku nanočestica, te je shodno tome najbolje opisano korišćenjem Hixson Crowell matematičkog modela.

- Dve od tri ispitivane mikroemulzije pokazale su superiorniju penetraciju takrolimusa u kožu uha svinje nakon dvočasovnog tretmana u poređenju sa primenjenom referentnom mašću. Interesantno je napomenuti i to da značajno veća količina lecitina i izopropanola u bikontinuiranoj formulaciji ICV 35 nije dovela do bolje penetracije takrolimusa u *stratum corneum* u poređenju sa U/V mikroemulzijom ICV 60. Zapravo, u ovom slučaju je efekat prisustva vode u formulaciji i posledična intenzivnija hidratacije kože bio dominantniji u poređenju sa narušavanjem barijere *stratum corneum*-a primenom pojačivača penetracije. Takođe, poređenjem etanola i izopropanola kao pojačivača penetracije, uočen je trend bolje penetracije iz bikontinuiranih emulzija koje su formulisane sa etanolom.
- Praćenjem količine takrolimusa u *stratum corneum*-u koja je postignuta nakon dvočasovnog tretmana nanostrukturiranim lipidnim česticama i nanoemulzijom, može se zaključiti da su obe formulacije ispoljile bolju penetraciju u poređenju sa referentnom mašću. Takođe, nanostrukturirani lipidni nosač omogućio je veću isporuka takrolimusa u folikule dlaka, što je od velikog značaja budući da se u njima supstanca može akumulirati i postepeno oslobađati u dublje slojeve kože, odnosno može se postići produženi efekat terapije.
- Za razliku od dvočasovne studije penetracije takrolimusa u *stratum corneum*, 24-časovna studija permeacije takrolimusa kroz kožu uha svinje pune debljine pokazala je najveću permeaciju i akumulaciju takrolimusa korišćenjem referentne masti i mikroemulzije, nešto manju korišćenjem nanostrukturiranih lipidnih čestica, a značajno manja brzina permeacije postignuta je upotrebom nanoemulzije.
- Iako svi rezultati ukazuju na najbolju penetraciju, permeaciju i akumulaciju takrolimusa u koži iz U/V mikroemulzije u poređenju sa nanostrukturiranim lipidnim česticama i nanoemulzijom, važno je naglasiti da to u određenoj meri nosi sa sobom i rizike od apsorpcije takrolimusa i ispoljavanja sistemskih neželjnih efekata, što bi detaljnije trebalo istražiti u odgovarajućim kliničkim eksperimentalnim postavkama. Imajući to u vidu, kao i njihovu odličnu stabilnost, razvijene mikroemulzije bi mogle biti odgovarajući nosači i za druge lekovite supstance kod kojih je željana transdermalna isporuka i postizanje sistemskog efekta.
- Važan zaključak ove doktorske disertacije je i neophodnost kritičkog razmatranja rezultata, budući da su rezultati *in vitro* ispitivanja penetracije i *in vitro* ispitivanja permeacije kontradiktorni kada je u pitanju korišćena referentna mast. Iznenađujuće velika brzina permeacije iz referentne masti najverovatnije je posledica prenatlažene okluzije kože, koju nije realno očekivati u eventualnoj kliničkoj eksperimentalnoj postavci, gde mast relativno brzo biva uklonjena sa kože.

Sveukupno, možemo zaključiti da su sva tri tipa uspešno razvijenih i okarakterisanih naprednih nosača ispoljila veliki potencijal u dermalnoj isporuci takrolimusa kao slabo rastvorne lekovite supstance velike molekulske mase, pri čemu se nanoemulzija izdvaja kao najmanje pogodna za širu upotrebu usled nestabilnosti koja dovodi do narušavanja sistema već nakon 3 meseca skladištenja. Budući da su sve formulacije vodene disperzije, njihovo nanošenje i razmazivanje moglo bi biti mnogo prihvatljivije od strane pacijenata u poređenju sa dostupnom mašću sa takrolimusom. Dodatno bi trebalo ispitati mogućnost korišćenja ovih naprednih nosača u oboljenjima kao što je psorijaza, gde je veliki izazov prevazići kožnu barijeru u cilju isporuke takrolimusa.

6 LITERATURA

1. Abd E, Namjoshi S, Mohammed Y H, Roberts M S, Grice J E. (2016) Synergistic Skin Penetration Enhancer and Nanoemulsion Formulations Promote the Human Epidermal Permeation of Caffeine and Naproxen, *J. Pharm. Sci.*, 105(1), 212-220.
2. Abd E, Benson H A E, Roberts M S, Grice J E. (2018) Follicular Penetration of Caffeine from Topically Applied Nanoemulsion Formulations Containing Penetration Enhancers: In vitro Human Skin Studies, *Skin Pharmacol. Physiol.*, 31(5), 252-260.
3. Abd E, Benson H A E, Roberts M S, Grice J E. (2018b) Minoxidil Skin Delivery from Nanoemulsion Formulations Containing Eucalyptol or Oleic Acid: Enhanced Diffusivity and Follicular Targeting, *Pharmaceutics*, 10(1), 19.
4. Aboofazeli R, Lawrence M J. (1993) Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. I. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-alcohol-isopropyl myristate, *Int. J. Pharm.*, 93(1), 161-175.
5. Aboofazeli R, Lawrence C B, Wicks S R, Lawrence M J. (1994) Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. III. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-isopropyl myristate and either an alkanolic acid, amine, alkanediol, polyethylene glycol alkyl ether or alcohol as cosurfactant, *Int. J. Pharm.*, 111(1), 63-72.
6. Aboofazeli R, Patel N, Thomas M, Lawrence M J. (1995) Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. IV. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-alcohol and oil; The influence of oil, *Int. J. Pharm.*, 125(1), 107-116.
7. Aboofazeli R. (2010) Nanometric-scaled emulsions (nanoemulsions), *Iran. J. Pharm. Sci.*, 9(4), 325-326.
8. Alexander A, Dwivedi S, Ajazuddin, Giri T K, Saraf S, Saraf S, Tripathi D K. (2012) Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery, *J. Control. Release*, 164(1), 26-40.
9. Andrade L M, Silva L A D, Krawczyk-Santos A P, Amorim I, Rocha P, Lima E M, Anjos J L V, Alonso A, Marreto R N, Taveira S F. (2017) Improved tacrolimus skin permeation by co-encapsulation with clobetasol in lipid nanoparticles: Study of drug effects in lipid matrix by electron paramagnetic resonance, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 119, 142-149.
10. Arora R, Katiyar S S, Kushwah V, Jain S. (2017) Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carrier-based nanotherapeutics in treatment of psoriasis: a comparative study, *Expert Opin. Drug Deliv.*, 14(2), 165-177.
11. Avramiotis S, Papadimitriou V, Hatzara E, Bekiari V, Lianos P, Xenakis A. (2007) Lecithin organogels used as bioactive compounds carriers. A microdomain properties investigation, *Langmuir*, 23(8), 4438-4447.
12. Azeem A, Ahmad F J, Khar R K, Talegaonkar S. (2009) Nanocarrier for the transdermal delivery of an antiparkinsonian drug, *AAPS PharmSciTech*, 10(4), 1093-1103.
13. Baspinar Y, Borchert H-H. (2012) Penetration and release studies of positively and negatively charged nanoemulsions: Is there a benefit of the positive charge?, *Int. J. Pharm.*, 430(1), 247-252.
14. Becker J r C, Houben R, Vetter C S, Bröcker E B. (2006) The carcinogenic potential of tacrolimus ointment beyond immune suppression: a hypothesis creating case report, *BMC cancer*, 6, 7-7.
15. Bellefroid C, Lechanteur A, Evrard B, Piel G. (2019) Lipid gene nanocarriers for the treatment of skin diseases: Current state-of-the-art, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 137, 95-111.
16. Beloqui A, Solinis M A, Rodriguez-Gascon A, Almeida A J, Preat V. (2016) Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics, *Nanomedicine*, 12(1), 143-161.

17. Berthomieu C, Hienerwadel R. (2009) Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, *Photosynth. Res.*, 101(2-3), 157-170.
18. Bhise K, Kashaw S K, Sau S, Iyer A K. (2017) Nanostructured lipid carriers employing polyphenols as promising anticancer agents: Quality by design (QbD) approach, *Int. J. Pharm.*, 526(1-2), 506-515.
19. Borhade V B, Nair H A, Hegde D D. (2009) Development and characterization of self-microemulsifying drug delivery system of tacrolimus for intravenous administration, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 35(5), 619-630.
20. Boyd B J, Bergström C A S, Vinarov Z, Kuentz M, Brouwers J, Augustijns P, Brandl M, Bernkop-Schnürch A, Shrestha N, Prémat V, Müllertz A, Bauer-Brandl A, Jannin V. (2019) Successful oral delivery of poorly water-soluble drugs both depends on the intraluminal behavior of drugs and of appropriate advanced drug delivery systems, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 137, 104967.
21. Brune A, Miller D W, Lin P, Cotrim-Russi D, Paller A S. (2007) Tacrolimus ointment is effective for psoriasis on the face and intertriginous areas in pediatric patients, *Pediatr. Dermatol.*, 24(1), 76-80.
22. Bruschi M L. (2015) Mathematical models of drug release, U: Marcos Luciano Bruschi (ed.) *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*. 1st. Woodhead Publishing, 63-86.
23. Butani D, Yewale C, Misra A. (2016) Topical Amphotericin B solid lipid nanoparticles: Design and development, *Colloids Surf. B*, 139, 17-24.
24. Cassidy H, Brennan J, Slattery C, Ryan M, McMorro T. (2016) Tacrolimus Modulates TGF- β Signaling to Induce Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Renal Proximal Tubule Epithelial Cells, *J. Clin. Med.*, 5, 50.
25. Castellsague J, Kuiper J G, Pottegård A, Anveden Berglind I r, Dedman D, Gutierrez L, Calingaert B, van Herk-Sukel M P, Hallas J, Sundstrom A, Gallagher A M, Kaye J A, Pardo C, Rothman K J, Perez-Gutthann S. (2018) A cohort study on the risk of lymphoma and skin cancer in users of topical tacrolimus, pimecrolimus, and corticosteroids (Joint European Longitudinal Lymphoma and Skin Cancer Evaluation - JOELLE study), *Clin. Epidemiol.*, 10, 299-310.
26. Censi R, Di Martino P. (2015) Polymorph Impact on the Bioavailability and Stability of Poorly Soluble Drugs, *Molecules*, 20(10), 18759-18776.
27. Chaiyana W, Anuchapreeda S, Somwongin S, Marsup P, Lee K-H, Lin W-C, Lue S-C. (2020) Dermal Delivery Enhancement of Natural Anti-Ageing Compounds from *Ocimum sanctum* Linn. Extract by Nanostructured Lipid Carriers, *Pharmaceutics*, 12(4), 309.
28. Changez M, Varshney M, Chander J, Dinda A K. (2006) Effect of the composition of lecithin/n-propanol/isopropyl myristate/water microemulsions on barrier properties of mice skin for transdermal permeation of tetracaine hydrochloride: in vitro, *Colloids Surf. B*, 50(1), 18-25.
29. Charoenputtakun P, Li S K, Ngawhirunpat T. (2015) Iontophoretic delivery of lipophilic and hydrophilic drugs from lipid nanoparticles across human skin, *Int. J. Pharm.*, 495(1), 318-328.
30. Cirri M, Maestrini L, Maestrelli F, Mennini N, Mura P, Ghelardini C, Di Cesare Mannelli L. (2018) Design, characterization and in vivo evaluation of nanostructured lipid carriers (NLC) as a new drug delivery system for hydrochlorothiazide oral administration in pediatric therapy, *Drug delivery*, 25(1), 1910-1921.
31. Clarys P, Alewaeters K, Lambrecht R, Barel A O. (2000) Skin color measurements: comparison between three instruments: the Chromameter(R), the DermaSpectrometer(R) and the Mexameter(R), *Skin. Res. Technol.*, 6(4), 230-238.
32. Cordery S F, Pensado A, Chiu W S, Shehab M Z, Bunge A L, Delgado-Charro M B, Guy R H. (2017) Topical bioavailability of diclofenac from locally-acting, dermatological formulations, *Int. J. Pharm.*, 5173(17), 30571-30579.

33. Council of Europe. (2020) *European Pharmacopoeia*, 10th ed. Strasbourg: Council of Europe.
34. Czajkowska-Kosnik A, Szekalska M, Winnicka K. (2019) Nanostructured lipid carriers: A potential use for skin drug delivery systems, *Pharmacol. Rep.*, 71(1), 156-166.
35. Dale M M, Rang H P, Dale M M. (2007) *Rang & Dale's pharmacology*. Edinburgh: Churchill Livingstone.
36. Das S, Chaudhury A. (2010) Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery, *AAPS PharmSciTech*, 12(1), 62-76.
37. Date A A, Vador N, Jagtap A, Nagarsenker M S. (2011) Lipid nanocarriers (GeluPearl) containing amphiphilic lipid Gelucire 50/13 as a novel stabilizer: fabrication, characterization and evaluation for oral drug delivery, *Nanotechnology*, 22(27), 0957-4484.
38. El Maghraby G M. (2008) Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: effects of cosurfactants, *Int. J. Pharm.*, 355(1-2), 285-292.
39. Erdogan M, Wright J R, Jr., McAlister V C. (2002) Liposomal tacrolimus lotion as a novel topical agent for treatment of immune-mediated skin disorders: experimental studies in a murine model, *Br. J. Dermatol.*, 146(6), 964-967.
40. Euvrard S, Ulrich C, Lefrancois N. (2004) Immunosuppressants and skin cancer in transplant patients: focus on rapamycin, *Dermatol. Surg.*, 30(4 Pt 2), 628-633.
41. Ezzati Nazhad Dolatabadi J, Valizadeh H, Hamishehkar H. (Solid Lipid Nanoparticles as Efficient Drug and Gene Delivery Systems: Recent Breakthroughs, *Adv. Pharm. Bull.*, 5(2), 151-159.
42. Fanun M, Papadimitriou V, Xenakis A. (2011) Characterization of cephalixin loaded nonionic microemulsions, *J. Colloid Interface Sci.*, 361(1), 115-121.
43. Fleischer A B, Jr. (1999) Treatment of atopic dermatitis: role of tacrolimus ointment as a topical noncorticosteroidal therapy, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 104(3 Pt 2), 70055-70052.
44. Freeman A K, Linowski G J, Brady C, Lind L, Vanveldhuisen P, Singer G, Lebwohl M. (2003) Tacrolimus ointment for the treatment of psoriasis on the face and intertriginous areas, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 48(4), 564-568.
45. Furue M, Takeuchi S. (2009) Topical tacrolimus as treatment of atopic dermatitis, *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, 2, 161-166.
46. Gabriel D, Mugnier T, Courthion H, Kranidioti K, Karagianni N, Denis M C, Lapteva M, Kalia Y, Moller M, Gurny R. (2016) Improved topical delivery of tacrolimus: A novel composite hydrogel formulation for the treatment of psoriasis, *J. Control Release*, 242, 16-24.
47. Gadhav D G, Tagalpallewar A A, Kokare C R. (2019) Agranulocytosis-Protective Olanzapine-Loaded Nanostructured Lipid Carriers Engineered for CNS Delivery: Optimization and Hematological Toxicity Studies, *AAPS PharmSciTech*, 20(1), 018-1213.
48. Gainza G, Bonafonte D C, Moreno B, Aguirre J J, Gutierrez F B, Villullas S, Pedraz J L, Igartua M, Hernandez R M. (2015) The topical administration of rhEGF-loaded nanostructured lipid carriers (rhEGF-NLC) improves healing in a porcine full-thickness excisional wound model, *J. Control. Release*, 197, 41-47.
49. Garti N, Aserin A, Tiunova I, Fanun M. (2000) A DSC study of water behavior in water-in-oil microemulsions stabilized by sucrose esters and butanol, *Colloids Surf., A*, 170(1), 1-18.
50. Goebel A B, Wohlrab J, Neubert R H. (2009) Quantification of Tacrolimus in Human Skin Samples and Ointment by LC-MS, *Chromatographia*, 70(3-4), 581-584.
51. Goebel A S, Neubert R H, Wohlrab J. (2011) Dermal targeting of tacrolimus using colloidal carrier systems, *Int. J. Pharm.*, 404(1-2), 159-168.
52. Golwala P, Rathod S, Patil R, Joshi A, Ray D, Aswal V K, Bahadur P, Tiwari S. (2020) Effect of cosurfactant addition on phase behavior and microstructure of a water dilutable microemulsion, *Colloids Surf. B*, 186(110736), 17.

53. Gorzelanny C, Mess C, Schneider S W, Huck V, Brandner J M. (2020) Skin Barriers in Dermal Drug Delivery: Which Barriers Have to Be Overcome and How Can We Measure Them?, *Pharmaceutics*, 12(7).
54. Gosenca M, Bester-Rogac M, Gasperlin M. (2013) Lecithin based lamellar liquid crystals as a physiologically acceptable dermal delivery system for ascorbyl palmitate, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 50(1), 114-122.
55. Hadgraft J, Lane M E. (2016) Drug crystallization - implications for topical and transdermal delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.*, 13(6), 817-830.
56. Hafeez F, Maibach H. (2013) Occlusion effect on in vivo percutaneous penetration of chemicals in man and monkey: partition coefficient effects, *Skin Pharmacol. Physiol.*, 26(2), 85-91.
57. Hamdani J, Moes A J, Amighi K. (2003) Physical and thermal characterisation of Precirol and Compritol as lipophilic glycerides used for the preparation of controlled-release matrix pellets, *Int. J. Pharm.*, 260(1), 47-57.
58. Han F, Li S, Yin R, Liu H, Xu L. (2008) Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, 315(1), 210-216.
59. Haque T, Lane M E, Sil B C, Crowther J M, Moore D J. (2017) In vitro permeation and disposition of niacinamide in silicone and porcine skin of skin barrier-mimetic formulations, *Int. J. Pharm.*, 520(1-2), 158-162.
60. Hartmann A. (2016) Back to the roots - dermatology in ancient Egyptian medicine, *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, 14(4), 389-396.
61. Hathout R M, Mansour S, Mortada N D, Geneidi A S, Guy R H. (2010) Uptake of microemulsion components into the stratum corneum and their molecular effects on skin barrier function, *Mol. Pharm.*, 7(4), 1266-1273.
62. Hathout R M, Elshafeey A H. (2012) Development and characterization of colloidal soft nano-carriers for transdermal delivery and bioavailability enhancement of an angiotensin II receptor blocker, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 82(2), 230-240.
63. Heuschkel S, Goebel A, Neubert R H. (2008) Microemulsions - modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery, *J. Pharm. Sci.*, 97(2), 603-631.
64. Hoar T P, Schulman J H. (1943) Transparent Water-in-Oil Dispersions: the Oleopathic Hydro-Micelle, *Nature*, 152(3847), 102-103.
65. Hoeller S, Klang V, Valenta C. (2008) Skin-compatible lecithin drug delivery systems for fluconazole: effect of phosphatidylethanolamine and oleic acid on skin permeation, *J. Pharm. Pharmacol.*, 60(5), 587-591.
66. Hoppel M, Ettl H, Holper E, Valenta C. (2014) Influence of the composition of monoacyl phosphatidylcholine based microemulsions on the dermal delivery of flufenamic acid, *Int. J. Pharm.*, 475(1-2), 156-162.
67. Ilic T, Savic S, Batinic B, Markovic B, Schmidberger M, Lunter D, Savic M. (2018) Combined use of biocompatible nanoemulsions and solid microneedles to improve transport of a model NSAID across the skin: In vitro and in vivo studies, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 125, 110-119.
68. Imran M, Iqubal M K, Imtiyaz K, Saleem S, Mittal S, Rizvi M M A, Ali J, Baboota S. (2020) Topical nanostructured lipid carrier gel of quercetin and resveratrol: Formulation, optimization, in vitro and ex vivo study for the treatment of skin cancer, *Int. J. Pharm.*, 587(119705), 119705.
69. Isailović T, Ethordevic S, Marković B, Randelović D, Cekić N, Lukić M, Pantelić I, Daniels R, Savić S. (2016) Biocompatible Nanoemulsions for Improved Aceclofenac Skin Delivery: Formulation Approach Using Combined Mixture-Process Experimental Design, *J. Pharm. Sci.*, 105(1), 308-323.
70. Ita K. (2016) Progress in the use of microemulsions for transdermal and dermal drug delivery, *Pharm. Dev. Technol.*, 22(4), 467-475.

71. Jain S, Addan R, Kushwah V, Harde H, Mahajan R R. (2019) Comparative assessment of efficacy and safety potential of multifarious lipid based Tacrolimus loaded nanoformulations, *Int. J. Pharm.*, 562, 96-104.
72. Jensen L B, Petersson K, Nielsen H M. (2011) In vitro penetration properties of solid lipid nanoparticles in intact and barrier-impaired skin, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 79(1), 68-75.
73. Kalaitzaki A, Papanikolaou N E, Karamaouna F, Dourtoglou V, Xenakis A, Papadimitriou V. (2015) Biocompatible colloidal dispersions as potential formulations of natural pyrethrins: a structural and efficacy study, *Langmuir*, 31(21), 5722-5730.
74. Kalaitzaki A, Xenakis A, Papadimitriou V. (2015) Highly water dilutable microemulsions: a structural study, *Colloid Polym. Sci.*, 293(4), 1111-1119.
75. Kaur A, Sharma G, Gupta V, Ratho R K, Katare O P. (2017) Enhanced acyclovir delivery using w/o type microemulsion: preclinical assessment of antiviral activity using murine model of zosteriform cutaneous HSV-1 infection, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 46(2), 346-354.
76. Kaur R, Ajitha M. (2019) Transdermal delivery of fluvastatin loaded nanoemulsion gel: Preparation, characterization and in vivo anti-osteoporosis activity, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 136, 104956.
77. Khan S, Shaharyar M, Fazil M, Baboota S, Ali J. (2016) Tacrolimus-loaded nanostructured lipid carriers for oral delivery - Optimization of production and characterization, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 108, 277-288.
78. Khurana S, Jain N K, Bedi P M. (2013) Nanoemulsion based gel for transdermal delivery of meloxicam: physico-chemical, mechanistic investigation, *Life Sci.*, 92(6-7), 383-392.
79. Kim Y-C, Ludovice P J, Prausnitz M R. (2007) Transdermal delivery enhanced by magainin pore-forming peptide, *J. Control. Release*, 122(3), 375-383.
80. Kim Y-C, Late S, Banga A K, Ludovice P J, Prausnitz M R. (2008) Biochemical enhancement of transdermal delivery with magainin peptide: modification of electrostatic interactions by changing pH, *Int. J. Pharm.*, 362(1-2), 20-28.
81. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Ochiai T. (1987) FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro, *J. Antibiot.*, 40(9), 1256-1265.
82. Kiselmann C, Dobler D, Schmidts T, Eicher A C, Möbs C, Pfützner W, Runkel F. (2018) Development of a skin-friendly microemulsion for dermal allergen-specific immunotherapy, *Int. J. Pharm.*, 550(1-2), 463-469.
83. Klang V, Matsko N, Zimmermann A-M, Vojnikovic E, Valenta C. (2010) Enhancement of stability and skin permeation by sucrose stearate and cyclodextrins in progesterone nanoemulsions, *Int. J. Pharm.*, 393(1), 153-161.
84. Klang V, Schwarz J C, Matsko N, Rezvani E, El-Hagin N, Wirth M, Valenta C. (2011) Semi-solid Sucrose Stearate-Based Emulsions as Dermal Drug Delivery Systems, *Pharmaceutics*, 3(2), 275-306.
85. Klang V, Valenta C. (2011) Lecithin-based nanoemulsions, *J. Drug Del. Sci. Tech.*, 21(1), 55-76.
86. Klang V, Schwarz J C, Lenobel B, Nadj M, Aubock J, Wolzt M, Valenta C. (2012) In vitro vs. in vivo tape stripping: validation of the porcine ear model and penetration assessment of novel sucrose stearate emulsions, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 80(3), 604-614.
87. Klang V, Schwarz J C, Valenta C. (2015) Nanoemulsions in Dermal Drug Delivery, U: Nina Dragicevic & Howard I. Maibach (ed.) *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Drug Manipulation Strategies and Vehicle Effects*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 255-266.
88. Klossek M L, Marcus J, Touraud D, Kunz W. (2013) The extension of microemulsion regions by combining ethanol with other cosurfactants, *Colloids Surf., A*, 427, 95-100.

89. Kommareddi N S, O'Connor K C, John V T. (1994) EPR characterizations of alpha-chymotrypsin active site dynamics in reversed micelles at enhanced gas pressures and after subjection to clathrate formation conditions, *Biotechnol. Bioeng.*, 43(3), 215-224.
90. Kovacevic A, Savic S, Vuleta G, Müller R H, Keck C M. (2011) Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on size, physical stability and particle matrix structure, *Int. J. Pharm.*, 406(1), 163-172.
91. Kumar S, Sinha V R. (2015) Design, Development and Characterization of Topical Microemulsions of 5-Fluorouracil for the Treatment of Non Melanoma Skin Cancer and its Precursor Lesions, *Anticancer Agents Med. Chem.*, 16(2), 259-268.
92. Kumar S, Zakrewsky M, Chen M, Menegatti S, Muraski J A, Mitragotri S. (2015) Peptides as skin penetration enhancers: Mechanisms of action, *J. Control. Release*, 199, 168-178.
93. Kyllönen H, Remitz A, Mandelin J M, Elg P, Reitamo S. (2004) Effects of 1-year intermittent treatment with topical tacrolimus monotherapy on skin collagen synthesis in patients with atopic dermatitis, *Br. J. Dermatol.*, 150(6), 1174-1181.
94. Lademann J, Richter H, Teichmann A, Otberg N, Blume-Peytavi U, Luengo J, Weiss B, Schaefer U F, Lehr C M, Wepf R, Sterry W. (2007) Nanoparticles--an efficient carrier for drug delivery into the hair follicles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 66(2), 159-164.
95. Lademann J, Jacobi U, Surber C, Weigmann H J, Fluhr J W. (2009) The tape stripping procedure - evaluation of some critical parameters, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 72(2), 317-323.
96. Lademann J, Richter H, Schanzer S, Knorr F, Meinke M, Sterry W, Patzelt A. (2011) Penetration and storage of particles in human skin: perspectives and safety aspects, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 77(3), 465-468.
97. Lampen A, Christians U, Guengerich F P, Watkins P B, Kolars J C, Bader A, Gonschior A K, Dralle H, Hackbarth I, Sewing K F. (1995) Metabolism of the immunosuppressant tacrolimus in the small intestine: cytochrome P450, drug interactions, and interindividual variability, *Drug Metab. Dispos.*, 23(12), 1315-1324.
98. Lane M E. (2013) Skin penetration enhancers, *Int. J. Pharm.*, 447(1-2), 12-21.
99. Lapteva M, Mondon K, Moller M, Gurny R, Kalia Y N. (2014) Polymeric micelle nanocarriers for the cutaneous delivery of tacrolimus: a targeted approach for the treatment of psoriasis, *Mol. Pharm.*, 11(9), 2989-3001.
100. Lawrence M J, Rees G D. (2000) Microemulsion-based media as novel drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 45(1), 89-121.
101. Lee S G, Jeong J H, Lee K M, Jeong K H, Yang H, Kim M, Jung H, Lee S, Choi Y W. (2014) Nanostructured lipid carrier-loaded hyaluronic acid microneedles for controlled dermal delivery of a lipophilic molecule, *Int. J. Nanomedicine*, 9, 289-299.
102. Leuner C, Dressman J. (2000) Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50(1), 47-60.
103. Limon D, Tallo Dominguez K, Garduno-Ramirez M L, Andrade B, Calpena A C, Perez-Garcia L. (2019) Nanostructured supramolecular hydrogels: Towards the topical treatment of Psoriasis and other skin diseases, *Colloids Surf. B*, 181, 657-670.
104. Lipinski C A, Lombardo F, Dominy B W, Feeney P J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 46(1-3), 3-26.
105. Liu J, Hu W, Chen H, Ni Q, Xu H, Yang X. (2007) Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery, *Int. J. Pharm.*, 328(2), 191-195.
106. Lopes L B. (2014) Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions, *Pharmaceutics*, 6(1), 52-77.
107. Malecic N, Young H. (2016) Tacrolimus for the management of psoriasis: clinical utility and place in therapy, *Psoriasis (Auckland, N.Z.)*, 6, 153-163.

108. Mason T G, Wilking J N, Meleson K, Chang C B, Graves S M. (2007) Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 19, 079001.
109. Mishra V, Bansal K K, Verma A, Yadav N, Thakur S, Sudhakar K, Rosenholm J M. (2018) Solid Lipid Nanoparticles: Emerging Colloidal Nano Drug Delivery Systems, *Pharmaceutics*, 10(4).
110. Mohammad Soleymani S, Salimi A. (2019) Enhancement of Dermal Delivery of Finasteride Using Microemulsion Systems, *Adv. Pharm. Bull.*, 9(4), 584-592.
111. Montenegro L, Lai F, Offerta A, Sarpietro M G, Micicchè L, Maccioni A M, Valenti D, Fadda A M. (2016) From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 32, 100-112.
112. Montenegro L, Parenti C, Turnaturi R, Pasquinucci L. (2017) Resveratrol-Loaded Lipid Nanocarriers: Correlation between In Vitro Occlusion Factor and In Vivo Skin Hydrating Effect, *Pharmaceutics*, 9(4).
113. Moreno M A, Ballesteros M P, Frutos P. (2003) Lecithin-based oil-in-water microemulsions for parenteral use: pseudoternary phase diagrams, characterization and toxicity studies, *J. Pharm. Sci.*, 92(7), 1428-1437.
114. Morrow D I, Garland M J, McCarron P A, Woolfson A D, Donnelly R F. (2007) Innovative drug delivery strategies for topical photodynamic therapy using porphyrin precursors, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 26(2), 105-116.
115. Müller-Goymann C C. (2004) Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 58(2), 343-356.
116. Müller R H, Radtke M, Wissing S A. (2002) Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54, S131-S155.
117. Münch S, Wohlrab J, Neubert R H H. (2017) Dermal and transdermal delivery of pharmaceutically relevant macromolecules, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 119, 235-242.
118. Nam S-H, Ying Ji X, Park J-S. (2011) Investigation of Tacrolimus Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Topical Drug Delivery, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 32(3).
119. Nazarzadeh E, Anthonypillai T, Sajjadi S. (2013) On the growth mechanisms of nanoemulsions, *J. Colloid Interface Sci.*, 397, 154-162.
120. Nguyen A V, Soulika A M. (2019) The Dynamics of the Skin's Immune System, *Int. J. Mol. Sci.*, 20(8), 1811.
121. Nieva-Echevarría B, Manzanos M J, Goicoechea E, Guillén M D. (2014) 2,6-Di-Tert-Butyl-Hydroxytoluene and Its Metabolites in Foods, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 14(1), 67-80.
122. OECD. (2004) *Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071087-en>.
123. Oliveira C A, Gouvêa M M, Antunes G R, Freitas Z M F d, Marques F v F d C, Ricci-Junior E. (2018) Nanoemulsion containing 8-methoxypsoralen for topical treatment of dermatoses: Development, characterization and ex vivo permeation in porcine skin, *Int. J. Pharm.*, 547(1), 1-9.
124. Olson K A, West K, McCarthy P L. (2014) Toxic tacrolimus levels after application of topical tacrolimus and use of occlusive dressings in two bone marrow transplant recipients with cutaneous graft-versus-host disease, *Pharmacotherapy*, 34(6), 3.
125. Pan Y, Nilges M J. (2014) Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy: Basic Principles, Experimental Techniques and Applications to Earth and Planetary Sciences, *Rev. Mineral. Geochem.*, 78(1), 655-690.

126. Papadimitriou V, Pispas S, Syriou S, Pournara A, Zoumpanioti M, Sotiroidis T G, Xenakis A. (2008) Biocompatible microemulsions based on limonene: formulation, structure, and applications, *Langmuir*, 24(7), 3380-3386.
127. Pardeike J, Hommoss A, Muller R H. (2009) Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products, *Int. J. Pharm.*, 366(1-2), 170-184.
128. Park J, Kadasala N R, Abouelmagd S A, Castanares M A, Collins D S, Wei A, Yeo Y. (2016) Polymer-iron oxide composite nanoparticles for EPR-independent drug delivery, *Biomaterials*, 101, 285-295.
129. Pascual J C, Fleisher A B. (2004) Tacrolimus ointment (Protopic) for atopic dermatitis, *Skin Therapy Lett.*, 9(9), 1-5.
130. Patel P, Patel H, Panchal S, Mehta T. (2012) Formulation strategies for drug delivery of tacrolimus: An overview, *Int. J. Pharm. Investig.*, 2(4), 169-175.
131. Patel P V, Patel H K, Panchal S S, Mehta T A. (2013) Self micro-emulsifying drug delivery system of tacrolimus: Formulation, in vitro evaluation and stability studies, *Int. J. Pharm. Investig.*, 3(2), 95-104.
132. Patzelt A, Mak W C, Jung S, Knorr F, Meinke M C, Richter H, Ruhl E, Cheung K Y, Tran N, Lademann J. (2017) Do nanoparticles have a future in dermal drug delivery?, *J. Control. Release*, 246, 174-182.
133. Pestana K C, Formariz T P, Franzini C M, Sarmiento V H, Chiavacci L A, Scarpa M V, Egito E S, Oliveira A G. (2008) Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B, *Colloids Surf., B*, 66(2), 253-259.
134. Peterka T R, Lusin T T, Bergles J, Ham Z, Grahek R, Urleb U. (2019) Forced degradation of tacrolimus and the development of a UHPLC method for impurities determination, *Acta Pharm.*, 69(3), 363-380.
135. Plessis J, Stefaniak A, Eloff F, John S, Agner T, Chou T C, Nixon R, Steiner M, Franken A, Kudla I, Holness L. (2013) International guidelines for the in vivo assessment of skin properties in non-clinical settings: Part 2. transepidermal water loss and skin hydration, *Skin Res. Technol.*, 19(3), 265-278.
136. Podlogar F, Gasperlin M, Tomsic M, Jamnik A, Rogac M B. (2004) Structural characterisation of water-Tween 40/Imwitor 308-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods, *Int. J. Pharm.*, 276(1-2), 115-128.
137. Pople P V, Singh K K. (2010) Targeting tacrolimus to deeper layers of skin with improved safety for treatment of atopic dermatitis, *Int. J. Pharm.*, 398(1-2), 165-178.
138. Praça F S G, Medina W S G, Eloy J O, Petrilli R, Campos P M, Ascenso A, Bentley M V L B. (2018) Evaluation of critical parameters for in vitro skin permeation and penetration studies using animal skin models, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 111, 121-132.
139. Prausnitz M, Elias P, Franz T, Schmuth M, Tsai J, Menon G, Holleran W, Feingold K. (2012) Skin barrier and transdermal drug delivery., U: (ed.) *Dermatology*. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders.
140. Prausnitz M R, Langer R. (2008) Transdermal drug delivery, *Nat. Biotechnol.*, 26(11), 1261-1268.
141. Prow T W, Grice J E, Lin L L, Faye R, Butler M, Becker W, Wurm E M, Yoong C, Robertson T A, Soyer H P, Roberts M S. (2011) Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 63(6), 470-491.
142. Puglia C, Sarpietro M G, Bonina F, Castelli F, Zammataro M, Chiechio S. (2011) Development, Characterization, and *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation of Benzocaine- and Lidocaine-Loaded Nanostructured Lipid Carriers, *J. Pharm. Sci.*, 100, 1892-1899.
143. Radtke M, Patzelt A, Knorr F, Lademann J r, Netz R R. (2017) Ratchet effect for nanoparticle transport in hair follicles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 116, 125-130.
144. Rancan F, Gao Q, Graf C, Troppens S, Hadam S, Hackbarth S, Kembuan C, Blume-Peytavi U, Rühl E, Lademann J, Vogt A. (2012) Skin penetration and cellular uptake of amorphous

- silica nanoparticles with variable size, surface functionalization, and colloidal stability, *ACS Nano*, 6(8), 6829-6842.
145. Raney S G, Franz T J, Lehman P A, Lionberger R, Chen M L. (2015) Pharmacokinetics-Based Approaches for Bioequivalence Evaluation of Topical Dermatological Drug Products, *Clin. Pharmacokinet.*, 54(11), 1095-1106.
 146. Remington J P, Allen J, Loyd V. (2013) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 22nd ed. London: Pharmaceutical Press.
 147. Rizwan M, Aqil M, Talegaonkar S, Azeem A, Sultana Y, Ali A. (2009) Enhanced transdermal drug delivery techniques: an extensive review of patents, *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.*, 3(2), 105-124.
 148. Ruth H S, Attwood D, Ktistis G, Taylor C J. (1995) Phase studies and particle size analysis of oil-in-water phospholipid microemulsions, *Int. J. Pharm.*, 116(2), 253-261.
 149. Rzhavskiy A S, Singh T R R, Donnelly R F, Anissimov Y G. (2018) Microneedles as the technique of drug delivery enhancement in diverse organs and tissues, *J. Control. Release*, 270, 184-202.
 150. Safaya M, Rotliwala Y C. (2020) Nanoemulsions: A review on low energy formulation methods, characterization, applications and optimization technique, *Mater. Today Proceedings*, 27, 454-459.
 151. Sahle F F, Metz H, Wohlrab J, Neubert R H H. (2012) Polyglycerol fatty acid ester surfactant-based microemulsions for targeted delivery of ceramide AP into the stratum corneum: Formulation, characterisation, in vitro release and penetration investigation, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 82(1), 139-150.
 152. Sahle F F, Metz H, Wohlrab J, Neubert R H. (2013) Lecithin-based microemulsions for targeted delivery of ceramide AP into the stratum corneum: formulation, characterizations, and in vitro release and penetration studies, *Pharm. Res.*, 30(2), 538-551.
 153. Sahu S, Katiyar S S, Kushwah V, Jain S. (2018) Active natural oil-based nanoemulsion containing tacrolimus for synergistic antipsoriatic efficacy, *Nanomedicine*, 13(16), 1985-1998.
 154. Sala M, Diab R, Elaissari A, Fessi H. (2018) Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications, *Int. J. Pharm.*, 535(1-2), 1-17.
 155. Salminen H, Helgason T, Aulbach S, Kristinsson B, Kristbergsson K, Weiss J. (2014) Influence of co-surfactants on crystallization and stability of solid lipid nanoparticles, *J. Colloid Interface Sci.*, 426, 256-263.
 156. Sanches B M A, Ferreira E I. (2019) Is prodrug design an approach to increase water solubility?, *Int. J. Pharm.*, 568, 118498.
 157. *Sažeteka karakteristika o leku - Protopic[®] mast, 0,1%* (2012) dostupno na: <http://www.alims.gov.rs/ciril/files/lekovi/smpc/515-01-0428-11-001.pdf> (poslednji pristup: 01.02. 2017.).
 158. SCCS/1358/10. (2010) *Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients*. Scientific Committee on Consumer Safety, European Commission, Health & Consumers Directorate.
 159. Schulman J H, Stoeckenius W, Prince L M. (1959) Mechanism of Formation and Structure of Micro Emulsions by Electron Microscopy, *J. Phys. Chem.*, 63(10), 1677-1680.
 160. Schwarz J C, Klang V, Hoppel M, Mahrhauser D, Valenta C. (2012) Natural microemulsions: formulation design and skin interaction, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 81(3), 557-562.
 161. Schwarz J C, Klang V, Karall S, Mahrhauser D, Resch G P, Valenta C. (2012) Optimisation of multiple W/O/W nanoemulsions for dermal delivery of aciclovir, *Int. J. Pharm.*, 435(1), 69-75.

162. Shah V P, Elkins J S, Williams R L. (1999) Evaluation of the test system used for in vitro release of drugs for topical dermatological drug products, *Pharm. Dev. Technol.*, 4(3), 377-385.
163. Shah V P, Yacobi A, Radulescu F S, Miron D S, Lane M E. (2015) A science based approach to topical drug classification system (TCS), *Int. J. Pharm.*, 491(1-2), 21-25.
164. Shamma R N, Aburahma M H. (2014) Follicular delivery of spironolactone via nanostructured lipid carriers for management of alopecia, *Int. J. Nanomedicine*, 9, 5449-5460.
165. Shekunov B Y, Chattopadhyay P, Tong H H, Chow A H. (2007) Particle size analysis in pharmaceuticals: principles, methods and applications, *Pharm. Res.*, 24(2), 203-227.
166. Sheshala R, Anuar N K, Abu Samah N H, Wong T W. (2019) In Vitro Drug Dissolution/Permeation Testing of Nanocarriers for Skin Application: a Comprehensive Review, *AAPS PharmSciTech*, 20(5), 019-1362.
167. Shinde U A, Parmar S J, Easwaran S. (2019) Metronidazole loaded nanostructured lipid carriers to improve skin deposition and retention in the treatment of rosacea, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 6, 1-30.
168. Singh Y, Meher J G, Raval K, Khan F A, Chaurasia M, Jain N K, Chourasia M K. (2017) Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery, *J. Control. Release*, 252, 28-49.
169. Skak N, Hansen L, inventors; Veloxis Pharmaceuticals A/S, assignee. Stabilized tacrolimus composition. European patent 2575769 B1. 2016 Jun 15.
170. Soriano-Ruiz J L, Calpena-Capmany A C, Cañadas-Enrich C, Febrer N B-d, Suñer-Carbó J, Souto E B, Clares-Naveros B. (2019) Biopharmaceutical profile of a clotrimazole nanoemulsion: Evaluation on skin and mucosae as anticandidal agent, *Int. J. Pharm.*, 554, 105-115.
171. Subramanian N, Ghosal S K, Moulik S P. (2005) Enhanced in vitro percutaneous absorption and in vivo anti-inflammatory effect of a selective cyclooxygenase inhibitor using microemulsion, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 31(4-5), 405-416.
172. Talaat S M, Elnaggar Y S R, Abdalla O Y. (2019) Lecithin Microemulsion Lipogels Versus Conventional Gels for Skin Targeting of Terconazole: In Vitro, Ex Vivo, and In Vivo Investigation, *AAPS PharmSciTech*, 20(4), 019-1374.
173. Tan G, Xu P, Lawson L B, He J, Freytag L C, Clements J D, John V T. (2010) Hydration effects on skin microstructure as probed by high-resolution cryo-scanning electron microscopy and mechanistic implications to enhanced transcutaneous delivery of biomacromolecules, *J. Pharm. Sci.*, 99(2), 730-740.
174. Tan X, Feldman S R, Chang J, Balkrishnan R. (2012) Topical drug delivery systems in dermatology: a review of patient adherence issues, *Expert Opin. Drug Deliv.*, 9(10), 1263-1271.
175. Tartaro G, Mateos H, Schirone D, Angelico R, Palazzo G. (2020) Microemulsion Microstructure(s): A Tutorial Review, *Nanomaterials*, 10(9).
176. Teeranachai-deekul V, Boonme P, Souto E B, Müller R H, Junyaprasert V B. (2008) Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC, *J. Control. Release*, 128(2), 134-141.
177. Tettey-Amlalo R N O. (2008) *Application of Dermal Microdialysis and Tape Stripping Methods to Determine the Bioavailability and/or Bioequivalence of Topical Ketoprofen Formulations*. Doktorska disertacija. Faculty of Pharmacy, Rhodes University.
178. Todosijević M. (2017) *Formulacija, fizičko-hemijska karakterizacija i biološka ispitivanja biokompatibilnih mikroemulzija za dermalnu i transdermalnu isporuku aceklofenaka*. Doktorska disertacija. Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu.
179. Todosijević M N, Cekić N D, Savić M M, Gašperlin M, Randelović D V, Savić S D. (2014) Sucrose ester-based biocompatible microemulsions as vehicles for aceclofenac as a model

- drug: formulation approach using D-optimal mixture design, *Colloid Polym. Sci.*, 292(12), 3061-3076.
180. Todosijević M N, Savić M M, Batinić B B, Marković B D, Gašperlin M, Ranđelović D V, Lukić M Z, Savić S D. (2015) Biocompatible microemulsions of a model NSAID for skin delivery: A decisive role of surfactants in skin penetration/irritation profiles and pharmacokinetic performance, *Int. J. Pharm.*, 496(2), 931-941.
 181. Tupal A, Sabzichi M, Ramezani F, Kouhsoltani M, Hamishehkar H. (2016) Dermal delivery of doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles for the treatment of skin cancer, *J. Microencapsul*, 33(4), 372-380.
 182. Undre N A, Moloney F J, Ahmadi S, Stevenson P, Murphy G M. (2009) Skin and systemic pharmacokinetics of tacrolimus following topical application of tacrolimus ointment in adults with moderate to severe atopic dermatitis, *Br. J. Dermatol.*, 160(3), 665-669.
 183. Uner M, Yener G I n. (2007) Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives, *Int. J. Nanomedicine*, 2(3), 289-300.
 184. Vasconcelos T f, Marques S, das Neves J, Sarmiento B. (2016) Amorphous solid dispersions: Rational selection of a manufacturing process, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 100, 85-101.
 185. Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, McMichael J, Lever J, Burckart G, Starzl T. (1995) Clinical pharmacokinetics of tacrolimus, *Clin. Pharmacokinet.*, 29(6), 404-430.
 186. Wang Y, Wang X, Song Y, Hao J. (2019) Design and Development of Lidocaine Microemulsions for Transdermal Delivery, *AAPS PharmSciTech*, 20(2), 018-1263.
 187. Wiedersberg S, Leopold C S, Guy R H. (2008) Bioavailability and bioequivalence of topical glucocorticoids, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 68(3), 453-466.
 188. Williams A C, Barry B W. (2004) Penetration enhancers, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 56(5), 603-618.
 189. Wolf M, Klang V, Stojcic T, Fuchs C, Wolzt M, Valenta C. (2018) NLC versus nanoemulsions: Effect on physiological skin parameters during regular in vivo application and impact on drug penetration, *Int. J. Pharm.*, 549(1-2), 343-351.
 190. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau J C, Wong J K. (2016) The dynamic anatomy and patterning of skin, *Exp. Dermatol.*, 25(2), 92-98.
 191. Yamanaka M, Yokota S, Iwao Y, Noguchi S, Itai S. (2014) Development and evaluation of a tacrolimus cream formulation using a binary solvent system, *Int. J. Pharm.*, 464(1-2), 19-26.
 192. Yoshida H, Tamura S, Toyoda T, Kado K, Ohnishi N, Ibuki R. (2004) In vitro release of Tacrolimus from Tacrolimus ointment and its speculated mechanism, *Int. J. Pharm.*, 270(1-2), 55-64.
 193. Young B, Lowe J, Stevens A, Heath J, Deakin P. (2006) *Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas*. Edinburgh: Churchill Livingstone.
 194. Yu K, Wang Y, Wan T, Zhai Y, Cao S, Ruan W, Wu C, Xu Y. (2018) Tacrolimus nanoparticles based on chitosan combined with nicotinamide: enhancing percutaneous delivery and treatment efficacy for atopic dermatitis and reducing dose, *Int. J. Nanomedicine*, 13, 129-142.
 195. Zhang J, Michniak-Kohn B. (2011) Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs: ketoprofen, lidocaine, and caffeine, *Int. J. Pharm.*, 421(1), 34-44.
 196. Zhang J, Michniak-Kohn B B. (2018) Investigation of microemulsion and microemulsion gel formulations for dermal delivery of clotrimazole, *Int. J. Pharm.*, 536(1), 345-352.
 197. Zhao J, Piao X, Shi X, Si A, Zhang Y, Feng N. (2016) Podophyllotoxin-Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Skin Targeting: In Vitro and In Vivo Studies, *Molecules*, 21(11).

198. Zhou H, Yue Y, Liu G, Li Y, Zhang J, Gong Q, Yan Z, Duan M. (2010) Preparation and characterization of a lecithin nanoemulsion as a topical delivery system, *Nanoscale res. lett.*, 5(1), 224-230.
199. Zidan A S, Rahman Z, Sayeed V, Raw A, Yu L, Khan M A. (2011) Crystallinity evaluation of tacrolimus solid dispersions by chemometric analysis, *Int. J. Pharm.*, 423(2), 341-350.
200. Zonneveld I M, Rubins A, Jablonska S, Dobozy A, Ruzicka T, Kind P, Dubertret L, Bos J D. (1998) Topical tacrolimus is not effective in chronic plaque psoriasis. A pilot study, *Arch. Dermatol.*, 134(9), 1101-1102.

7 PRILOZI

7.1 Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije

Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

1. Savić V, Ilić T, Nikolić I, Marković B, Čalija B, Cekić N, Savić S. Tacrolimus-loaded lecithin-based nanostructured lipid carrier and nanoemulsion with propylene glycol monocaprylate as a liquid lipid: Formulation characterization and assessment of dermal delivery compared to referent ointment. *International Journal of Pharmaceutics* 2019; 569: 118624.

2. Savić V, Todosijević M, Ilić T, Lukić M, Mitsou E, Papadimitriou V, Avramiotis S, Marković B, Cekić N, Savić S. Tacrolimus loaded biocompatible lecithin-based microemulsions with improved skin penetration: Structure characterization and *in vitro/in vivo* performances. *International Journal of Pharmaceutics* 2017; 529 (1-2): 491-505.

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

1. Savić V, Nikolić I, Marković B, Cekić N, Savić S. Comparative *in vitro* release of tacrolimus from lecithin-based nanostructured lipid carrier and nanoemulsion. 3rd European Conference on Pharmaceutics, April 1-2 2019, Bologna, Italy

2. Savić V, Nikolić I, Todosijević M, Savić S, Cekić N, Savić S. Assessment of critical parameters in developing of NLCs stabilized with soybean lecithin and polysorbate 80. 11th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, September 22-24, 2016, Beograd, Serbia.

3. Savić V, Todosijević M, Ilić T, Marković B, Čalija B, Cekić N, Savić S. Biocompatible lecithin-based microemulsions for topical application of tacrolimus. 11th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, September 22-24, 2016, Beograd, Serbia.

4. Savić V.; Đorđević S; Todosijević M; Isailović T; Cekić N; Čalija B, Savić S. Formulation and characterization of NLCs stabilized with soya lecithin and polysorbate 80 - Effects of lipid composition. 10th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, April 4-7, 2016, Glasgow, United Kingdom.

5. Todosijević M, Savić V, Savić M, Randelović D, Gašperlin M, Batinić B, Isailović T, Marković B, Savić S. Aceclofenac loaded bicontinuous microemulsions: *in vitro* release, tape stripping and pharmacokinetic study. 1st European Conference on Pharmaceutics: Drug Delivery, April 13-14, 2015, Reims, France.

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

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

Saopštenja sa skupa nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)

- 1. Savić V**, Todosijević M, Cekić N, Savić S. Preformulaciona/formulaciona ispitivanja mikroemulzija stabilizovanih lecitinom kao nosača za takrolimus. VI Kongres farmaceuta Srbije, Oktobar 15-19, 2014, Beograd, Srbija, p. 374-376.
2. Todosijević M, Cekić N, **Savić V**, Lukić M, Nikolić I, Paunović N, Savić S. Mikroemulzije kao potencijalni nosači za transdermalnu isporuku aceklofenaka: uticaj tipa surfaktanta i kosurfaktanta. VI Kongres farmaceuta Srbije, Oktobar 15-19, 2014, Beograd, Srbija, p. 372-373.

7.2 Biografija autora

Mag. farm. Vedrana Savić rođena je 29. septembra 1989. godine u Leskovcu. Osnovnu školu "Kosta Stamenković" i Gimnaziju u Leskovcu, prirodno-matematički smer, završila je kao nosilac diplome „Vuk Karadžić“. Od 2006. do 2016. godine aktivno je učestvovala u radu Istraživačke stanice Petnica kao saradnik na programu Biomedicina.

Školske 2008/2009. godine upisala je integrisane osnovne i master akademske studije na Univerzitetu u Beogradu–Farmaceutskom fakultetu, program Farmacija, koje je završila 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,51 (devet i 51/100), odbranivši eksperimentalni završni rad pod nazivom "*Tape stripping* vs. vazokonstriktorni test: alternativne ili komplementarne *in vivo* metode ispitivanja dermalne raspoloživosti hidrokortizona?" sa ocenom 10. Doktorske akademske studije na Univerzitetu u Beogradu–Farmaceutskom fakultetu, izborni modul Farmaceutska tehnologija upisala je školske 2013/2014. godine.

Tokom 2013/2014. godine obavila je pripravnički staž u okviru Apoteke „Božur“ u Beogradu, a decembra 2014. godine položila je stručni ispit. U periodu od 2013-2014. godine Vedrana Savić je bila zaposlena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Univerziteta u Beogradu Farmaceutskog fakulteta kao istraživač pripravnik, na projektu iz oblasti tehnološkog razvoja: „Razvoj mikro- i nanosistema kao nosača za lekove sa antiinflamatornim delovanjem i metoda za njihovu karakterizaciju“ (TR 34031), Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Dodatno je učestvovala u izvođenju praktične nastave na obaveznom predmetu Farmaceutska tehnologija 1.

U periodu 2016 - 2019. godine Vedrana Savić je bila zaposlena u proizvodnom odeljenju bolničke apoteke u Trondheimu, Norveška, gde je radila na poslovima formulacije, izrade i kontrole magistralnih i galenskih lekova za parenteralnu, oralnu i topikalnu primenu, kao i u pripremi standardnih operativnih procedura i instrukcija u cilju obezbeđivanja kvaliteta. Od 2019. godine Vedrana Savić je odgovorno lice za kvalitet i puštanje serije lekova u promet pri bolničkoj apoteci Rikshospitalet u Oslu. Dodatno je član upravnog odbora Stručne grupe za proizvodnju u okviru Norveškog udruženja bolničkih farmaceuta.

7.3 Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Vedrana Savić

Broj indeksa: 11/13

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

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

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

Potpis autora

U Beogradu, _____

Vedrana Savić

7.4 Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Vedrana Savić

Broj indeksa: 11/13

Studijski program: Farmaceutska tehnologija

Naslov rada: **Dermalna isporuka takrolimusa - uporedna formulaciona i pretklinička istraživanja mikroemulzija, nanoemulzija i nanostrukturiranih lipidnih čestica kao naprednih nosača za slabo rastvorne lekovite supstance**

Mentor: prof. dr Snežana Savić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu.**

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

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

U Beogradu, _____

Potpis autora



7.5 Izjava o korišćenju

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

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

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

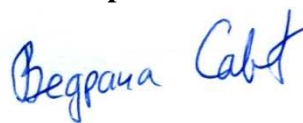
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

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

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

U Beogradu, _____

Potpis autora

—  —

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.