

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Sonja R. Vučen

**FORMULACIJA I KARAKTERIZACIJA
RASTVORLJIVIH MIKROIGALA ZA
KONTROLISANU TRANSDERMALNU
ISPORUKU KETOPROFENA
INKAPSULARINOG U POLIMERNE
NANOČESTICE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Sonja R. Vučen

**FORMULATION AND
CHARACTERIZATION OF
DISSOLVABLE MICRONEEDLES FOR
CONTROLLED TRANSDERMAL
DELIVERY OF KETOPROFEN
ENCAPSULATED IN POLYMERIC
NANOPARTICLES**

PhD Thesis

Belgrade, 2013

MENTOR

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

ČLANOVI KOMISIJE

Dr Nenad Ignjatović, naučni savetnik,
Institut tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti u Beogradu

Dr Jela Milić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

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

Dr Slobodan Petrović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Tehnološko-metalurški fakultet

Datum odbrane:

Ova doktorska disertacija je urađena pod mentorstvom prof. dr Gordane Vuleta, kojoj istinski zahvaljujem na ukazanom povjerenju, bezrezervnoj podršci, velikom strpljenju i ličnom angažovanju tokom izrade ove doktorske disertacije, i mog cjelokupnog profesionalnog i naučno-istraživačkog rada do sada. Prva faza eksperimenata rađena je na Institutu tehničkih nauka SANU i Farmaceutskom fakultetu u Beogradu, dok su eksperimenti druge i treće faze rađeni u Irskoj, na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Korku.

Najiskrenu zahvalnost dugujem prof. dr Jeli Milić na ogromnom razumjevanju i podršci, uvijek korisnim savjetima i spremnosti da pomogne, od samih početaka, kada je i bilo najteže. Nesebično zalaganje i posebno veliki doprinos prof. Milić je, zajedno sa mentorom, pružila u toku pripremanja prve radne verzije disertacije, na čemu sam joj neizmjereno zahvalna.

Prof. dr Nenadu Ignjatoviću veoma zahvaljujem na saradnji i značajnoj pomoći tokom dobijanja i interpretacije rezultata u okviru prve faze eksperimenata. Srdačno se zahvaljujem i prof. dr Snežani Savić na korektnoj dugogodišnjoj saradnji i spremnosti da prenese svoja iskustva, koja su mi pomogla u istraživanju. Prof. dr Slobodanu Petrović se iskreno zahvaljujem na korisnim sugestijama i savjetima tokom čitanja ove doktorske disertacije. Veliku zahvalnost dugujem i doc. dr Abina Crean i doc. dr Anne Moore, koje su mi pružile priliku i usmjeravale moje naučno usavršavanje tokom cijelog boravka u Irskoj.

Veliko hvala upućujem i svim profesorima, stručnom osoblju i kolegama sa studijskog programa farmacija Medicinskog fakulteta u Banjoj Luci i Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, kao i kolegama sa Instituta tehničkih nauka SANU i Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Korku, na podršci i konkretnoj pomoći tokom mog rada i boravka u svim pomenutim institucijama.

Najveću zahvalnost dugujem suprugu Dušanu na ogromnoj ljubavi, razumjevanju, bezrezervnoj podršci i konkretnoj pomoći tokom izrade ove doktorske disertacije.

Neizmjereno se zahvaljujem svojim roditeljima, sestrama i najmlađim Nježićima, za svu ljubav i podršku koju mi pružaju.

Sadržaj

SADRŽAJ SLIKA	1
SADRŽAJ TABELA	6
REZIME	8
ABSTRACT	12
1. TEORIJSKI DIO	16
1.1. Nanotehnologija i nanomedicina	17
1.1.1. Biodegradabilni polimeri i njihova primjena u medicini i farmaciji	20
1.1.2. Biodegradacija i biokompatibilnost polimljične kiseline (PLA)	22
1.2. Teorijski aspekti isporuke lijeka u/kroz kožu	24
1.2.1. Struktura kože	27
1.2.2. Putevi transporta kroz kožu	30
1.2.3. Ketoprofen – kandidat za intradermalnu/transdermalnu primjenu	33
1.2.4. Metode optimizacije isporuke lijeka u/kroz kožu	35
1.2.5. Polimerne nanočestice – nosači za intradermalnu/transdermalnu isporuku lijeka	38
1.3. Mikroigle – savremeni sistemi za isporuku lijekova	42
1.3.1. Metode za izradu mikroigala	45
1.3.2. Vrste mikroigala i mehanizmi isporuke lijeka	47
1.3.3. Faktori koji utiču na penetraciju mikroigala u kožu	50
1.3.4. Primjena mikroigala za intradermalnu i transdermalnu isporuku lijeka....	52
1.3.5. Bezbjednost primjene mikroigala	56
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	58
3. EKSPERIMENTALNI DIO	61
3.1. Materijali za izradu polimernih nanočestica i rastvorljivih mikroigala	62
3.1.1. Izrada polimernih nanočestica sa inkapsuliranim ketoprofenom	62
3.1.2. Izrada rastvorljivih mikroigala	62
3.2. Metode za izradu polimernih nanočestica i rastvorljivih mikroigala	62
3.2.1. Metode za izradu polimernih nanočestica i inkapsulaciju lijeka	62
3.2.2. Metoda za kvantitativno određivanje ketoprofena	65

3.2.3. Metode za analizu karakteristika dobijenih nanočestica sa inkapsuliranim lijekom	67
3.2.4. Metode za izradu rastvorljivih mikroigala	72
3.2.5. Metode za analizu karakteristika dobijenih rastvorljivih mikroigala	79
3.2.6. Metode za analizu stabilnosti dobijenih polimernih nanočestica i rastvorljivih mikroigala sa inkapsuliranim lijekom	81
3.2.7. Metode <i>ex vivo</i> studija penetracije/permeacije polimernih nanočestica i rastvorljivih mikroigala sa inkapsuliranim lijekom	82
3.2.8. Metode statističke obrade dobijenih rezultata	87
4. REZULTATI I DISKUSIJA	88
4.1. Formulacija i karakterizacija polimernih nanočestica sa inkapsuliranim ketoprofenom	89
4.1.1. Razvoj i validacija HPLC metode za identifikaciju inkapsuliranog ketoprofena	89
4.1.2. Optimizacija procesa inkapsulacije ljekovite supstance u polimerne nanočestice	94
4.1.3. Morfološke i površinske karakteristike PDLLA nanočestica sa inkapsuliranim ketoprofenom	97
4.1.4. Fizičko-hemijska karakterizacija PDLLA nanočestica	101
4.1.5. Termalna analiza PDLLA nanočestica	105
4.1.6. Brzina oslobađanja lijeka iz polimernih nanočestica u <i>in vitro</i> uslovima	106
4.2. Formulacija i karakterizacija rastvorljivih mikroigala	110
4.2.1. Karakterizacija polaznih formulacija za izradu rastvorljivih mikroigala	110
4.2.2. Izrada rastvorljivih mikroigala procesom atomizacije i raspršivanja tečnosti	113
4.2.3. Karakterizacija rastvorljivih mikroigala	125
4.3. Studije stabilnosti	133
4.3.1. Stabilnost polimernih nanočestica sa inkapsuliranim ketoprofenom	133
4.3.2. Stabilnost rastvorljivih mikroigala	141
4.4. <i>Ex vivo</i> studije intradermalne/transdermalne isporuke ketoprofena	148
5. ZAKLJUČCI	161
6. LITERATURA	166
7. PRILOZI	179

7.1. Publikovani i saopštteni radovi koji čine dio doktorske disertacije	180
7.2. Biografija autora	182
7.3. Izjava o autorstvu	183
7.4. Izjava o istovjetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije	184
7.5. Izjava o korišćenju	185

Sadržaj slika

Slika 1-1. Strukturne formule izomera laktida.

Slika 1-2. Metode za sintezu polimljične kiseline – PLA.

Slika 1-3. Shematski prikaz sinteze poli(mljične kiseline) polimerizacijom otvorenog prstena.

Slika 1-4. Shematski prikaz hidrolitičke degradacije polimljične kiseline.

Slika 1-5. Prednosti i nedostaci transdermalne isporuke lijekova.

Slika 1-6. Anatomska građa kože – shematski i histološki prikaz.

Slika 1-7. Morfologija epidermisa – shematski prikaz.

Slika 1-8. Putevi prolaska lijeka kroz kožu i detaljan prikaz procesa raspodjele i difuzije permeanta kroz intercelularne lipide SC-a: (a) difuzija kroz središte dvostrukog sloja lipida, (b) difuzija kroz dvostruki sloj neposredno pored polarnih glava, i (c) difuzija kroz polarna područja.

Slika 1-9. Strukturna formula ketoprofena.

Slika 1-10. Prikaz metoda za poboljšanje intradermalne i transdermalne isporuke lijeka.

Slika 1-11. Veličina mikroigala u poređenju sa (a) kovanicom, i (b) hipodermalnom iglom.

Slika 1-12. Shematski prikaz različitih tipova mikroigala: (a) neobložene mikroigle, (b) obložene mikroigle, (c) rastvorljive mikroigle, i (d) šuplje mikroigle.

Slika 1-13. Pristupi isporuke lijeka primjenom mikroigala različitog dizajna: (a) *'poke and patch'* pristup pomoću čvrstih mikroigala, (b) *'coat and poke'* pristup pomoću obloženih čvrstih mikroigala, (c) *'poke and release'* pristup pomoću rastvorljivih mikroigala, i (d) *'poke and flow'* pristup pomoću šupljih mikroigala.

Slika 1-14. Shematski prikaz niza mikroigala i njihovih geometrijskih osobina: a – dužina mikroigle, b – rastojanje između vrhova mikroigala, c – rastojanje između baza mikroigala, d – širina baze mikroigle.

Slika 1-15. BD Soluvia™ – sistem za transdermalnu isporuku influenza vakcine upotrebom šuplje mikroigle.

Slika 1-16. Macroflux metalne mikroprojekcije obložene lijekom sa ugrađenim adhezivnim flasterom.

Slika 1-17. Sistem za isporuku paratireoidnog hormona pomoću aplikatora za višekratnu upotrebu proizvođača Zosano-Pharma (ZP PTH patch).

Slika 3-1. Shematski prikaz izrade PDLLA nanočestica.

Slika 3-2. Ilustracija *in vitro* brzine oslobađanja ketoprofena iz PDLLA nanočestica pomoću Slide-a-Lyzer kasete za dijalizu.

Slika 3-3. PDMS kalupi korišteni za dobijanje rastvorljivih mikroigala.

Slika 3-4. Shematski prikaz kvašenja i kontaktnog ugla između ispitivanog materijala i tečnih formulacija.

Slika 3-5. PG X goniometar.

Slika 3-6. Düsen-Schlick 970-S8 dvofluidna mlaznica korišćena za dobijanje rastvorljivih mikroigala.

Slika 3-7. Shematski prikaz aparature za dobijanje rastvorljivih mikroigala tehnikom raspršivanja pod kontrolisanim pritiskom. A, B, C i D su kontrolisani faktori procesa izrade.

Slika 3-8. Faze u procesu izrade rastvorljivih mikroigala.

Slika 3-9. DS2-11 Imada digitalni mjerač sile.

Slika 3-10. Priprema uzoraka kože svinje.

Slika 3-11. Franz-ova difuziona ćelija: (a) prednja strana, i (b) gornja strana.

Slika 3-12. SEM mikrografija ImmuPatch čvrstih silikonskih mikroigala proizvedenih u Tyndall institutu, Irska.

Slika 3-13. MagNa-Lyser uređaj za homogenizaciju bioloških tkiva.

Slika 4-1. Hromatogram uzoraka placebo i PDLLA-KET nanočestica.

Slika 4-2. Linearnost HPLC metode: (a) kalibraciona kriva ketoprofena, i (b) pripadajući hromatogrami.

Slika 4-3. Analiza značajnosti faktora na efikasnost inkapsulacije ketoprofena u PDLLA nanočestice: (a) grafik vjerovatnoće normalne raspodjele, i (b) Pareto dijagram.

Slika 4-4. SEM mikrografije: (a) PDLLA nanočestica sa inkapsuliranim ketopropenom, i (b) placebo PDLLA nanočestica.

Slika 4-5. Usporedni prikaz veličina placebo PDLLA i PDLLA-KET sfera primjenom tehnika fotonkorelacione spektroskopije (PCS) i laserske difrakcije (LD). Sr.vrijednost \pm SD, n=3. Student T test * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ statistički značajne razlike u odnosu na placebo uzorke.

Slika 4-6. XRD difraktogram: (a) PDLLA polimera, (b) ketoprofena, i (c) PDLLA nanočestica sa inkapsuliranim ketopropenom.

Slika 4-7. FTIR spektar: (a) ketoprofena, i (b) PDLLA nanočestica sa inkapsuliranim ketoprofenom.

Slika 4-8. Profili DSC i TGA krivih: (a) placebo PDLLA nanočestice, i (b) PDLLA-KET nanočestice.

Slika 4-9. Profil oslobađanja ketoprofena u *in vitro* uslovima: (a) oslobađanje ketoprofena iz PDLLA nanočestica, (b) oslobađanje slobodnog lijeka, i (c) linearna regresija rezultata oslobađanja lijeka primjenom Korsmeyer-Peppas modela.

Slika 4-10. Shematski prikaz punjenja PDMS modula i uticaja površinskih karakteristika i viskoziteta tečnih formulacija na ovaj proces.

Slika 4-11. Kontaktni ugao između polaznih formulacija i površine PDMS kalupa: (a) izmjerene vrijednosti ugla i reprezentativni primjeri slika, (b) PDLLA-KET, i (c) PVA-KET. Sr. vrijednost \pm SD, n=10. Student T-test, $p>0.05$.

Slika 4-12. Vrijednosti viskoziteta polaznih formulacija korištenih za izradu rastvorljivih mikroigala na temperaturi od 20°C. Sr. vrijednost \pm SD, n=5.

Slika 4-13. Grafički prikaz efekata promjenljivih parametara sistema dobijenih analizom: (a) odnosa signal/šum (S/N), i (b) ANOVA testa. (A-rastojanje, B-pritisak, C-otvor, D-vrijeme).

Slika 4-14. Primjena DOE++ softverskog paketa za analizu značajnosti faktora: (a) grafik vjerovatnoće normalne raspodjele, i (b) Pareto dijagram.

Slika 4-15. Primjer mikrografija rastvorljivih mikroigala izrađenih od: (a) rastvora PVA koji sadrži ketoprofen, i (b) disperzije PDLLA-KET nanočestica.

Slika 4-16. Rastvorljive mikroigle izrađene od disperzije PDLLA-KET nanočestica primjenom serije od: (a) jednog, (b) dva, i (c) četiri raspršivanja.

Slika 4-17. Rastvorljive mikroigle izrađene od trehaloze sa dodatkom fluorescentnih sfera: (a) horizontalni, i (b) vertikalni slojevi.

Slika 4-18. Kriterijumi sa primjerom za evaluaciju morfoloških karakteristika rastvorljivih mikroigala.

Slika 4-19. Rezultati procjene izgleda i morfoloških karakteristika rastvorljivih mikroigala korištenih u okviru eksperimentalnog rada. Sr.vrijednost \pm SD, n=80.

Slika 4-20. Primjer mjerenja dimenzija rastvorljivih mikroigala primjenom ImageJ softverskog paketa.

Slika 4-21. Uticaj sile kompresije (pritiska) u iznosu od 8 N/cm^2 na fizičke dimenzije rastvorljivih mikroigala izrađenih od disperzije PDLLA-KET nanočestica i rastvora PVA koji sadrži ketoprofen (PVA-KET). Sr. vrijednost \pm SD, $n=15$, ANOVA post hoc Tukey test, ** $p<0,01$.

Slika 4-22. Redukcija visine rastvorljivih mikroigala prije i poslije primjene sile kompresije od 8 N/cm^2 .

Slika 4-23. Sadržaj ketoprofena u rastvorljivim mikroiglama izrađenim od disperzije PDLLA-KET nanočestica i rastvora PVA koji sadrži ketoprofen (PVA-KET). Sr. vrijednost \pm SD, $n=10$.

Slika 4-24. Vrijednosti veličina čestica i indeksa polidisperznosti uzoraka PDLLA-KET nanočestica u periodu od 90 dana. Sr. vrijednost \pm SD, $n=3$. ANOVA post hoc Tukey test statistički značajne razlike $p<0,001$: *** u odnosu na dan izrade, *** u odnosu na uzorke analizirane nakon 30 dana, *** u odnosu na uzorke analizirane nakon 60 dana, *** između uzoraka izloženih različitim uslovima nakon istog vremenskog perioda.

Slika 4-25. Vrijednosti zeta potencijala uzoraka PDLLA-KET nanočestica u periodu od 90 dana. Sr. vrijednost \pm SD, $n=3$. ANOVA post hoc Tukey test, * $p<0,05$ statistički značajne razlike u odnosu na dan izrade.

Slika 4-26. Vrijednosti efikasnosti inkapsulacije ketoprofena u uzorcima PDLLA-KET nanočestica u periodu od 90 dana. Sr. vrijednost \pm SD, $n=3$. ANOVA post hoc Tukey test, * $p<0,05$ statistički značajne razlike u odnosu na dan izrade.

Slika 4-27. Mikrografije rastvorljivih mikroigala izrađenih od PDLLA-KET nanočestica: (a) na dan izrade, i nakon (b) 30 dana, (c) 60 dana, i (d) 90 dana.

Slika 4-28. Fizička stabilnost (izgled oblika i vrha) rastvorljivih mikroigala izrađenih od PDLLA-KET nanočestica nakon inkubacije na: (a) temperaturi od $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, i relativnoj vlažnosti vazduha od $75\% \pm 5\%$, i (b) temperaturi od $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ i relativnoj vlažnosti vazduha od $40\% \pm 5\%$. Sr. vrijednost \pm SD, $n=10$. ANOVA, $p>0,05$.

Slika 4-29. Sadržaj ketoprofena u ispitivanim uzorcima rastvorljivih mikroigala izrađenih od PDLLA-KET nanočestica u periodu od 90 dana. Sr. vrijednost \pm SD, $n>5$. ANOVA, $p>0,05$.

Slika 4-30. Primjer hromatograma ketoprofena uzoraka rastvorljivih mikroigala izrađenih od PDLLA-KET i čuvanih pod uslovima ubrzanog starenja u periodu od 90 dana.

Slika 4-31. Mehaničke osobine rastvorljivih mikroigala izrađenih od PDLA-KET nanočestica na dan izrade i nakon inkubacije pod različitim uslovima u toku 90 dana. Sr. vrijednost \pm SD, n=10. ANOVA, $p>0,05$.

Slika 4-32. Rezultati penetracije/permeacije ketoprofena poslije primjene disperzije PDLA-KET nanočestica: (a) kumulativna količina ketoprofena koja je permeirala u akceptorski medijum po jedinici površine kože svinje (Q/A) u toku 24 sata, i (b) količina ketoprofena deponovana u različitim slojevima kože svinje nakon 24 sata. Sr. vrijednost \pm SD, n=3.

Slika 4-33. Mikrografije uzoraka kože svinje nakon aplikacije rastvorljivih mikroigala sa: (a) PDLA-KET nanočesticama – DMN 1, i (b) PVA-KET – DMN 2.

Slika 4-34. Vrijednosti ukupne količine ketoprofena primjenjenog u formi nosača DMN 1 i DMN 2 i deponovanog u uzorcima kože svinje u toku 24 h. Sr. vrijednost \pm SD, n=3. ANOVA post hoc Tukey test, * $p<0,05$ statistički značajne razlike u odnosu na DMN 2.

Slika 4-35. Uporedni prikaz: (a) vrijednosti količine ketoprofena deponovanog u uzorcima kože svinje, i izgleda (b) DMN 1, i (c) DMN 2 mikroigala 24 h nakon aplikacije. Sr. vrijednost \pm SD, n=3. ANOVA post hoc Tukey test, *** $p<0,001$, ** $p<0,01$ statistički značajne razlike SC-a i dermisa u odnosu na epidermis. ** $p<0,01$, * $p<0,05$ statistički značajne razlike DMN 1 u odnosu na DMN 2.

Sadržaj tabela

Tabela 1-1. Biomaterijali za izradu nanostrukturnih sistema i njihova primjena u nanomedicini.

Tabela 1-2. Parametri koji se razmatraju pri izboru kandidata za transdermalnu isporuku lijeka.

Tabela 1-3. Poređenje efikasnosti različitih pristupa za intradermalnu/transdermalnu isporuku lijeka.

Tabela 1-4. Podjela, definicija i shematski prikaz nanosfera i nanokapsula.

Tabela 1-6. Materijali i metode za izradu mikroigala.

Tabela 1-7. Sistemi mikroigala koje se trenutno nalaze na tržištu ili su u fazi kliničkih ili prekliničkih ispitivanja.

Tabela 1-8. Neki primjeri *in vivo* studija bezbjednosti primjene mikroigala.

Tabela 3-1. Zavisni parametri u procesu dobijanja PDLLA-KET nanočestica.

Tabela 3-2. Prikaz matematičkih modela korištenih za ispitivanje mehanizma oslobađanja ketoprofena inkapsuliranog u PDLLA nanočestice.

Tabela 3-3. Vrijednosti kontrolisanih faktora procesa i njihovi nivoi.

Tabela 3-4. Plan izvođenja eksperimenata prema L9 ortogonalnog matrici Taguchi eksperimentalnog dizajna.

Tabela 3-5. Kriterijumi za evaluaciju morfoloških karakteristika rastvorljivih mikroigala (interni propisi, Farmaceutski fakultet, UCC, Irska).

Tabela 3-6. Parametri i metode za ispitivanje stabilnosti PDLLA-KET nanočestica i rastvorljivih mikroigala.

Tabela 4-1. Rezultati tačnosti za različite koncentracije standardnog rastvora ketoprofena.

Tabela 4-2. Rezultati preciznosti za različite koncentracije standardnog rastvora ketoprofena.

Tabela 4-3. Efikasnost inkapsulacije ketoprofena za različite vrijednosti zavisnih parametara u procesu dobijanja PDLLA nanočestica.

Tabela 4-4. Površinske karakteristike i raspodjela veličina čestica placebo PDLLA i PDLLA nanočestica sa inkapsuliranim ketoprofenom određene PCS metodom .

Tabela 4-5. Matematički model i parametri oslobađanja ketoprofena inkapsuliranog u PDLLA nanočestice.

Tabela 4-6. Rezultati eksperimenata L9 ortogonalne matrice Taguchi dizajna: srednja vrijednost DMN 1 niza i odnos signal/šum (S/N).

Tabela 4-7. Odnos signal/šum (S/N) za promjenljive parametre u izradi nizova rastvorljivih mikroigala.

Tabela 4-8. Fizičke karakteristike PDMS kalupa i mikroigala izrađenih od disperzije PDLA-KET nanočestica (DMN 1) i rastvora PVA koji sadrži ketoprofen (DMN 2).

Tabela 4-9. Vrijednosti fluksa, lag-vremena i koeficijenta permeacije (K_p) u *ex vivo* studijama permeacije PDLA-KET nanočestica kroz uzorke kože svinje.

FORMULACIJA I KARAKTERIZACIJA RASTVORLJIVIH
MIKROIGALA ZA KONTROLISANU TRANSDERMALNU
ISPORUKU KETOPROFENA INKAPSULARINOG U POLIMERNE
NANOČESTICE

REZIME

U širokoj oblasti nanotehnologija, nanomedicina predstavlja disciplinu koja se veoma brzo razvija i pruža obećavajuće mogućnosti za značajno poboljšanje medicinske dijagnostike i terapije. Posebno značajan istraživački interes u nanomedicini usmjeren je ka ispitivanju širokog spektra biomedicinskih nanomaterijala, razvijenih za izradu nosača dijagnostičkih sredstava i lijekova. Među brojnim biomaterijalima neorganskog i organskog porijekla, polimeri su pronašli široku upotrebu u formulaciji nanosistema za kontrolisanu i ciljanu isporuku lijekova. Poli-D,L-mliječna kiselina (PDLLA) je sintetski polimer koji je odobren za kliničku primjenu, budući da se njegovi biokompatibilni degradacioni proizvodi metabolišu i uklanjaju iz organizma ciklusom limunske kiseline. Koloidni nosači ljekovitih supstanci izrađeni od ovog polimera intenzivno se istražuju zbog svoje male veličine koja omogućava permeaciju lijeka kroz biološke barijere i njegovu produženu isporuku u ciljna tkiva. Pored sposobnosti da kontrolišu oslobađanje lijeka, polimerne nanočestice takođe poboljšavaju isporuku lijekova slabo rastvornih u vodi, smanjuju pojavu neželjenih efekata, pružaju mogućnost stabilizacije i zaštite inkorporirane ljekovite supstance od hemijske i enzimske degradacije, omogućavaju njenu bolju penetraciju i efikasniju akumulaciju na ciljnim mjestima. Imajući u vidu sve navedene aspekte, kao model supstancu u ovom radu izabran je ketoprofen, slabo rastvoran lijek u vodi koji ima kratko poluvrijeme eliminacije i ispoljava veliki broj neželjenih efekata nakon (per)oralne primjene. Osim primjene nanonosača ljekovitih supstanci, još jedan pristup za poboljšanje transdermalne isporuke lijeka je fizičko premošćavanje stratum corneum-a (SC) primjenom mikroigala. Neinvazivnom i bezbolnom primjenom mikroigala formiraju se mikrokanali u koži, koji obezbjeđuju intradermalni i transdermalni transport ljekovite supstance. Na temelju prethodnih razmatranja, osnovni cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je razvoj i karakterizacija polimernih nanočestičnih sistema za produženo

oslobađanje ketoprofena. Osim toga, istražena je i mogućnost primjene metode atomizacije i raspršivanja tečnosti za izradu rastvorljivih mikroigala sa lijekom inkapsuliranim u PDLLA nanočestice. Postavljena je hipoteza da kombinacija ova dva različita pristupa, rastvorljivih mikroigala sa ketoprofenom inkapsuliranim u polimerne nanočestice, dovodi do poboljšanja penetracije i produžene intradermalne/transdermalne isporuke lijeka.

Shodno cilju istraživanja, eksperimentalni rad u okviru doktorske disertacije je podjeljen u tri cjeline. Prvo su modifikacijom metode izmještanja solvensa izrađene PDLLA nanočestice, u koje je inkapsuliran ketoprofen (PDLLA-KET). Potom je primjenom različitih tehnika karakterizacije analizirana raspodjela veličina dobijenih PDLLA-KET nanočestica, njihova morfologija, površinske i termalne karakteristike, interakcije lijeka i polimera, sadržaj lijeka, njegovo oslobađanje iz polimernog nosača i stabilnost. U drugoj cjelini, ispitana je mogućnost primjene metode atomizacije i raspršivanja tečnosti za izradu rastvorljivih mikroigala sa lijekom inkapsuliranim u PDLLA nanočestice. Sa ciljem karakterizacije dobijenih rastvorljivih mikroigala, ispitivane su njihove morfološke i mehaničke osobine, kao i ujednačenost sadržaja ljekovite supstance. *Ex vivo* studije penetracije polimernih nanočestica i rastvorljivih mikroigala sa inkapsuliranim lijekom, sprovedene su u okviru poslednje faze eksperimentalnog rada korišćenjem difuzionih Franz-ovih ćelija i uzoraka kože svinje ukupne debljine. Osnovni cilj ove faze istraživanja bio je ispitivanje mogućnosti uspješne penetracije rastvorljivih mikroigala dobijenih metodom raspršivanja i produženo snabdjevanje dubljih slojeva kože ljekovitom supstancom. Prvo je poboljšanje permeacije lijeka kroz kožu ispitano primjenom disperzije PDLLA-KET nanočestica na kožu prethodno tretiranu sa ImmuPatch silikonskim mikroiglama, a potom i primjenom izrađenih rastvorljivih mikroigala sa PDLLA-KET nanočesticama.

Dobijeni rezultati su pokazali da su formirane uniformne PDLLA sfere nanometarskih dimenzija sa visokim procentom inkapsuliranog lijeka (75%). Nakon inicijalnog naglog otpuštanja ketoprofena, PDLLA nanočestice su obezbjedile produženo oslobađanje lijeka tokom 7 dana. Mehanizam oslobađanja ketoprofena bio je zasnovan na Korsmeyer–Peppas modelu i Fick-ovoj difuziji. Pokazano je takođe da nova metoda dobijanja rastvorljivih mikroigala atomizacijom i raspršivanjem tečnih uzoraka smanjuje efekte njihovog površinskog napona i viskoziteta pri punjenju kalupa.

Ova tehnika je uspješno primjenjena za izradu nizova rastvorljivih mikroigala sa PDLLA-KET nanočesticama, koji su predstavljali vjernu reprodukciju originalnog silikonskog kalupa. Izrađene su mikroigle oštih vrhova, sa rigidnom i nefleksibilnom piramidalnom strukturom i velikom sposobnošću otpora kompresiji i lomljenju. Pokazano je i da metoda atomizacije i raspršivanja tečnosti može biti prilagođena za dobijanje nizova rastvorljivih mikroigala sa lamelarnim ili horizontalnim slojevima. Sprovedene su i kratkoročne studije stabilnosti polimernih nanočestica i rastvorljivih mikroigala sa inkapsuliranim ketoprofenom, čiji rezultati su pokazali fizičku i hemijsku stabilnost ispitivanih uzoraka u toku 3 mjeseca. Nakon primjene silikonskih mikroigala na kožu svinje, polimerne nanočestice sa inkapsuliranim ketoprofenom dovele su do uspješne isporuke lijeka u kožu, poboljšanja fluksa lijeka i smanjenja lag-vremena tokom 24 h. U svjetlu ovih rezultata, nizovi rastvorljivih mikroigala sa PDLLA-KET nanočesticama primjenjeni su na kožu svinje u *ex vivo* uslovima. Uspješna penetracija svih rastvorljivih mikroigala u nizu (ukupno 144) potvrđena je jasno uočljivim udubljenjima u koži. Rezultati su pokazali uspješno oslobađanje i deponovanje lijeka u uzorcima kože.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je kombinovana primjena dva različita pristupa u ovom radu dovela do poboljšane intradermalne i transdermalne isporuke ketoprofena u kožu. Formulirani su efikasni i neinvazivni sistemi za produženu isporuku lijeka, koji su potvrdili da rastvorljive mikroigle mogu biti izrađene metodom atomizacije i raspršivanja tečnih formulacija slobodnog ketoprofena, ili lijeka inkapsuliranog u PDLLA nanočestice. Postignuto je uspješno produženo oslobađanje lijeka iz oba ispitivana farmaceutska oblika (tečna disperzija i rastvorljive mikroigle) i njegova isporuka u kožu svinje u *ex vivo* uslovima. Zaključeno je da strategija isporuke polimernih nanočestica sa inkapsuliranim lijekom putem nizova rastvorljivih mikroigala predstavlja veliki potencijal za poboljšanu i produženu isporuku lijeka putem kože. Iako obećavajući rezultati dobijeni u ovom radu zahtjevaju dalju potvrdu u prekliničkim *in vivo* studijama, razvojem rastvorljivih mikroigala kao novih sistema za isporuku ketoprofena u/kroz kožu, moguće je postići veliki doprinos poboljšanju adherence pacijenta i terapijske efikasnosti lijeka, što je konačan cilj u razvoju svakog farmaceutskog oblika.

Ključne riječi: polimerne nanočestice, rastvorljive mikroigle, atomizacija i raspršivanje tečnosti, koža, transdermalna isporuka lijeka, ketoprofen.

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska tehnologija

UDK broj: 615.262.1 : 57.085 (043.3)

612.791 : 678.84 (043.3)

FORMULATION AND CHARACTERIZATION OF DISSOLVABLE
MICRONEEDLES FOR CONTROLLED TRANSDERMAL DELIVERY
OF KETOPROFEN ENCAPSULATED IN POLYMERIC
NANOPARTICLES

ABSTRACT

In the broad field of nanotechnology, nanomedicine is a fast growing discipline which offers promising possibilities to significantly improve medical diagnosis and therapy. The major research interest in nanomedicine has particularly focused on wide spectrum of novel biomedical nanomaterials developed for formulation of carriers for diagnostics and drug delivery. Among numerous biomaterials based on inorganic or organic matter, polymers are considered to be widely used in formulation of nanosystems for controlled and targeted drug delivery. Poly(D, L-lactic acid) (PDLLA) is a synthetic polymer approved for clinical use since its degradation products are biocompatible, metabolisable and removable from the body by the citric acid cycle. Colloidal drug carriers based on this polymer are extensively investigated because of their small particle size that allows permeation through biological barriers and drug delivery to the body over prolonged periods of time. In addition to their ability to control drug release, polymeric nanoparticles are also capable to improve the delivery of water-insoluble drugs, reduce the drug-associated side effects, protect the compounds from inactivation, increase the intracellular penetration and enhance a higher drug-target accumulation. Considering all these aspects, ketoprofen was selected as a model drug as it has low water solubility, short half-life and exhibits numerous side-effects after oral application. In addition to nanocarriers, another transdermal delivery approach that has been applied is the use of microneedles, as a physical method for overcoming the stratum corneum (SC) barrier. Microneedles provide a minimally invasive, painless way of creating microchannels in the skin which can allow intradermal and transdermal drug transport. Based on these considerations, the principal objective of this work was to develop and characterize a novel polymeric nanoparticulate systems that are capable of controlled and prolonged ketoprofen release. In addition, the potential of atomised spray technique to fabricate dissolvable microneedles with drug-loaded PDLLA nanoparticles

was investigated. It was hypothesised that a combination approach of topically applied drug-loaded polymeric nanocarriers presented in dissolvable microneedle patch might lead to further enhanced penetration and controlled intradermal/ transdermal delivery of ketoprofen.

According to the aim of the study, the experimental work was divided into three phases. First, ketoprofen-loaded PDLLA nanoparticles (PDLLA-KET) were designed by modified solvent displacement method. Different techniques were employed in order to characterize PDLLA-KET nanoparticles, with regard to their particle size distribution, morphology, surface properties, thermal behaviour, drug-polymer interactions, drug content, drug release and stability. The focus in the second phase of this work was to determine the applicability of an atomised spray technique to fabrication of dissolvable microneedles loaded with PDLLA-KET nanoparticles. In order to characterize the obtained microneedle patches, we investigated their morphological and mechanical properties, as well as uniformity of drug content. *Ex vivo* skin penetration studies were performed within a scope of last experimental phase using the Franz-type diffusion cells and full thickness porcine skin. The main goal of this experiment was to determine if spray-fabricated dissolvable microneedle loaded with PDLLA-KET reliably penetrate the skin and supply its deep layers with drug over a prolonged period of time. Improvement in drug permeation through the skin was first investigated by applying PDLLA-KET nanoparticle dispersion on the skin treated with ImmuPatch silicon microneedles. The drug permeation study was also performed using the dissolvable microneedles loaded with PDLLA-KET nanoparticles.

The results showed that uniform ketoprofen loaded PDLLA nanosized spheres were prepared with high drug encapsulation efficiency (75%). After an initial burst release, the PDLLA nanoparticles were capable of prolonging and controlling ketoprofen release over 7 days of exposure. Korsmeyer–Peppas model along with Fickian diffusion mechanism were recognised as the most suitable models to describe the ketoprofen release from PDLLA nanospheres. We also demonstrated that atomised spray technique, as a novel microneedle fabrication method, minimises the effects of the liquid surface tension and viscosity when filling moulds. This method was successfully used to fabricate PDLLA-KET nanoparticle-loaded dissolvable microneedle arrays which had complete fidelity to the master silicon template. The microneedles had sharp

tips, rigid and inflexible pyramidal structure and a great ability to withstand compression and fracture. It was also demonstrated that this spraying method can be adapted to produce novel laminate-layered as well as horizontally-layered dissolvable microneedle arrays. The results of a short term stability studies revealed that both ketoprofen-loaded polymeric nanoparticles and dissolvable microneedles were physically and chemically stable after 3 months. Following application of silicon microneedle arrays, ketoprofen-loaded polymeric nanospheres were able to enhance drug flux through porcine skin, to reduce its transport lag time and to supply the skin with drug over 24 hours. In the light of these results, dissolvable microneedle patches loaded with PDLLA-KET nanoparticles were applied to the porcine skin *ex vivo*. All of the microneedles on the patch (144 in total) were seen to penetrate into the skin, as evidenced by clearly visibly indentations in the skin. The results showed that drug was successfully released and deposited in the skin samples.

Due to the obtained results, it can be concluded that combination of two different approaches applied in this work has led to improved intradermal and transdermal ketoprofen delivery. Effective and non-invasive administration systems for sustained drug delivery were developed, confirming that both the drug and PDLLA-KET nanoparticles can be loaded into the microneedles formed by the atomising spray process. Ketoprofen was successfully released from both dosage forms (liquid dispersion and dissolvable microneedle patch) and delivered in the porcine skin *ex vivo* over a prolonged period of time. It can be concluded that drug loaded polymeric nanoparticles and dissolvable microneedle arrays employed in the presented delivery strategy have a great potential for enhanced and controlled drug delivery via skin. Although the promising findings of this work require further confirmation in preclinical *in vivo* studies, ketoprofen loaded dissolvable microneedles can be considered as an effective administration systems capable to achieve a better patient adherence and improved therapeutic efficacy of this drug, which is the ultimate goal in the development of every dosage form.

Keywords: polymeric nanoparticles, dissolvable microneedles, atomising spray, skin, transdermal drug delivery, ketoprofen.

Scientific field: Pharmacy

Specific scientific field: Pharmaceutical technology

UDK number: 615.262.1 : 57.085 (043.3)

612.791 : 678.84 (043.3)

1. TEORIJSKI DIO

1.1. Nanotehnologija i nanomedicina

Nanotehnologija predstavlja interdisciplinarnu oblast nauke o materijalima koja je posvećena dizajniranju, proizvodnji, karakterizaciji i primjeni struktura, sredstava i sistema sa najmanje jednom novom i/ili naprednijom osobinom i funkcijom (1). Promjene fizičkih i hemijskih osobina materijala nastaju kao posljedica kontrolisane manipulacije veličine i oblika na nanometarskom nivou u smislu smanjenja broja atoma koji čine materijal, odnosno drugačijeg rasporeda i međurastojanja za površinske atome (2, 3). Značaj i uticaj nanotehnologije na oblast biomedicinskih istraživanja i kliničke primjene biomaterijala ogleda se u nekoliko aspekata, uključujući manipulaciju površinskih karakteristika i produkciju materijala veličina koje su slične biološkim entitetima (npr. ćelije, organele itd.) (1, 4, 5).

Iako se oblast nanotehnologije i dalje smatra mladom naukom, nanočestice su, kao nosači za isporuku lijekova, razvijene još prije 40 godina (6). Od tog vremena, došlo je do velikog napretka u oblasti inženjeringa materijala na nivou nanovelicina, kao i u procjeni potencijala ovih nanonosača za unapređenje terapije i zdravlja uopšte. Tako su svoju primjenu i klinički značaj u oblasti dijagnostike i liječenja našli različiti nanouređaji poput bioloških mikro- i nano-električnih mehaničkih sistema (BioMEMS i BioNEMS), u koje se ubrajaju biomolekularni senzori, genski vektori, nanočipovi, mikroigle za isporuku lijekova, nanoroboti. Primjeri ovih sistema koji su u razvoju ili se već nalaze na tržištu su implantirani senzori za regulaciju pritiska (Endosure wireless AAA pressure sensor, cardio MEMS, Atlanta, SAD), kateteri sa sensorima protoka (Vermetra, Pittsburgh, SAD) ili genski vektori (Affymetrix, Santaclara, SAD) (1).

Nanomedicina je oblast koja ima za cilj proučavanje strukture, funkcije i dejstva različitih nanosistema kao bioloških materijala i njihove široke primjene od biomedicinskih snimanja do isporuke lijekova i terapeutika (7). Posebno veliki interes u širokoj oblasti nanomedicine je u ispitivanju i razvijanju nanonosača za racionalnu i ciljanu isporuku lijekova (8). Nanonosači su sistemi nanometarskih veličina, koji se sastoje od različitih materijala kao što su prirodni ili sintetski polimeri, lipidi ili fosfolipidi, peptidi, polisaharidi, organometalna jedinjenja, itd. Brojne studije su pokazale mogućnost ovih nosača da kontrolišu mehanizam otpuštanja-oslobađanja lijeka, poboljšaju njegovu stabilnost, kao i zaštitu od fagocita i prevremene degradacije, što ujedno vodi ka boljoj biološkoj raspoloživosti i potencijalnom poboljšanju terapijske

efikasnosti (1, 9). Poznato je da nanostrukturirani nosači imaju potencijal da mijenjaju/poboljšavaju farmakodinamički i farmakokinetički profil lijeka, poboljšavajući tako njegovu terapijsku efikasnost (1, 10). Pristupi za postizanje ovih ciljeva zasnivaju se na izboru materijala i metoda za izradu nanonosača određenih geometrijskih i površinskih karakteristika (11).

Biomedicinski materijali (biomaterijali) su počeli da se koriste još sredinom prošlog vijeka, i prije nego što je sam termin „biomaterijali“ postojao. Polimetil metakrilat (PMMA) bio je prvi biomaterijal upotrebljen u stomatologiji još 1937. godine, a potom i u ortopediji dvadeset godina kasnije, kada je britanski hirurg John Charnely koristio PMMA i nerđajući čelik za totalnu zamjenu kuka (2). Uopšteno, biomaterijali obuhvataju široku klasu materijala koji se koriste za zamjenu i reparaciju živog tkiva i organa, u terapijske ili estetske svrhe. Mnogobrojni biomaterijali, kao što su stentovi, membrane, hirurški konci, intraokularna i kontaktna sočiva, danas se svakodnevno koriste kao protetska sredstva u raznim granama hirurgije (dentalnoj, ortopedskoj, kardiovaskularnoj, oftalmološkoj i rekonstitutivnoj), kao i u terapiji nekih oboljenja (medicinska sredstva i farmaceutski oblici za kontrolisano otpuštanje lijeka). Opšti uslovi za primjenu svih biomaterijala su biokompatibilnost, netoksičnost, mehanički kontinuitet sa okolnim tkivom i ekonomičnost (12). Osim opštih uslova, postoje i posebni uslovi za materijale namjenjene za specifičnu primjenu, kao što su bioaktivnost (za ubrzavanje rasta prelomljene kosti ili regeneraciju pokidanog nerva), biodegradacija (hirurški konci i kapsule za kontrolisano otpuštanje lijeka u organizmu), otpornost na infekcije (kateteri, trombootpornost – vještačke arterije i srčani zalisci), propustljivost i difuzibilnost (različite membrane vještačkih organa i medicinskih sredstava) (2).

Postoje brojni kriterijumi na osnovu kojih se vrši podjela biomaterijala. Najčešće se biomaterijali dijele na osnovu hemijskog sastava, i to na biološke, polimerne, materijale na bazi različitih metala, silikona ili ugljenika. Podjela biomaterijala može da se izvrši i prema mjestu njihove krajnje upotrebe na ortopedske, dentalne, kardiovaskularne, oftalmološke, dermatološke itd. Prema tipu odgovora tkiva razlikujemo bioaktivne, bioinertne i bioresorbilne, dok se prema načinu aplikacije biomaterijali mogu koristiti u obliku praška, bloka, cementa, prevlake (2). U Tabeli 1-1

dat je pregled biomaterijala koji se koriste za formulaciju različitih nanosistema za isporuku lijekova, i u nanomedicini uopšte.

Tabela 1-1. Biomaterijali za izradu nanostrukturnih sistema i njihova primjena u nanomedicini. (1, 2, 12)

Materijali		Primjena u nanomedicini	Vrste nanososača za isporuku lijeka
Biološki materijali		Nosači za isporuku lijeka Inženjerstvo tkiva	Vezikularni nosači Nanočestice Nanotube
Polimerni materijali	Prirodni	Mekotkivni implantati Prevlake krvnih sudova Rekonstruktivna hirurgija	Vezikularni nosači Nanosfere Nanočestice Micele Dendrimeri
	Sintetski biodegradabilni	Nosači za isporuku lijeka Hirurški konci Nosači za meko i koštano tkivo Kardiovaskularni umeci	
	Sintetski ne-biodegradabilni	Trajni nadomjesci (krvni sudovi, meka tkiva) Ortopedski umetci i zglobovi	
Neorganski materijali	Metali	Nosači za isporuku lijeka Ortopedske žice Zubni implantati Osovine zglobnih implantata	Nanočestice Nanokapsule
	Silikon	Nosači za isporuku lijeka Rekonstruktivna hirurgija Cjevčice	Porozne nanočestice
Materijali zasnovani na ugljeniku	Ugljenik	Nosači za isporuku lijeka	Nanotube Fulereni Nanovlakna

Od svih materijala, najširu upotrebu pronašli su sintetski polimeri zbog njihovih prednosti u poređenju sa drugim jedinjenjima, te se oni danas koriste u svim oblastima ljudske aktivnosti, pa tako i u medicini i farmaciji. U oblasti nauke o polimerima znanja se stiču prije svega proučavanjem prirodnih polimera i njihovih kompleksnih struktura i funkcija. Međutim za razliku od prirodnih polimera, čija se mnogo kompleksnija

struktura karakteriše većim brojem različitih ponavljajućih jedinica, danas se saznanja o polimerima uglavnom stižu istraživanjem mnogo jednostavnijih sintetskih polimera koji se u najvećem broju slučajeva sastoje najviše od dvije ili tri različite konstitutivne jedinice – monomera. Osnovni cilj istraživanja u ovoj oblasti jeste dobijanje materijala sa osobinama koje se mogu modifikovati i kontrolisati u skladu sa potrebama njegove primjene (13). Budući da su biološki sistemi i procesi kompleksni i još uvijek nedovoljno razjašnjeni, ovaj cilj je veoma teško postići. Primjena sintetskih polimera u biomedicinske svrhe često je samo prilagođavanje već postojećih, i u neke druge svrhe korištenih polimera. Za sintezu novih jedinjenja prilagođenih specifičnim zahtjevima primjene, kao što su vremenski-ograničene primjene, inženjerstvo tkiva i kontrolisana isporuka lijekova, ključnu ulogu ima hemija polimera. Naime, struktura lanca, sastav osnovnih i bočnih grupa i molekulska masa su faktori koji utiču na osobine sintetisanih polimera (13). Do danas su istraženi mnogobrojni načini poboljšanja osobina sintetskih polimera. Tako se na primjer površinske karakteristike polimernog biomaterijala mogu modifikovati korišćenjem polietilenglikola (PEG) sa ciljem sprečavanja adsorpcije proteina i izbjegavanja aktivacije komplementa, ali i prevencije adhezije krvnih pločica i tromboze (14, 15). Posebna pažnja posvećuje se i kompozitnim sistemima, kao što je kompozit kopolimera mliječne i glikolne kiseline (PLGA) sa hidroksiapatitom koji je sintetisan kao zamjena prirodnoj kosti (8, 16).

1.1.1. Biodegradabilni polimeri i njihova primjena u medicini i farmaciji

Biodegradabilni polimeri danas zaokupljaju najveću pažnju istraživača u oblasti polimernih biomaterijala. Kada je riječ o njihovoj primjeni u nanomedicini, u potpunosti su zamijenili nedegradabilne (dugotrajne) materijale. Biodegradabilni polimeri ne zaostaju u organizmu i njihova primjena pruža mogućnost kontrole biološkog odgovora organizma na ljekovitu supstancu. Međutim, biodegradabilnost ne podrazumjeva i netoksičnost. Stoga su biodegradabilni polimeri koji se razgrađuju na male, netoksične molekule idealni kandidati za izradu polimernih nanočestica kao nosača ljekovitih supstanci (17, 18). Osim biodegradabilnosti, polimerni biomaterijali za primjenu u nanomedicini moraju biti i biokompatibilni, što podrazumjeva njihovu netoksičnost, da ne izazivaju imuni odgovor organizma i ne dovode do mutacija, i biofunktionalni odnosno da posjeduju odgovarajuće fizičko-hemijske i biološke osobine, da su pogodni za procesiranje i sterilizaciju, stabilni prilikom skladištenja, itd (13).

Iako postoji veliki broj sintetskih polimera različitog hemijskog sastava i strukture, samo nekoliko njih ispunjava ove zahtjeve. Polimerni materijali kao što su polimljična kiselina (PLA), poliglikolna kiselina (PGA), kopolimer poli(laktid-koglikolid) (PLGA), poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), odobreni su od Svjetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization*, WHO) i Američke uprave za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*, FDA) kao materijali koji se mogu koristiti u medicini i farmaciji za izradu sistema za kontrolisanu isporuku različitih lijekova (antikancerogene supstance, nesteroidni antiinflamatorni lijekovi, antihipertenzivi, imunomodulatori, hormoni, vitamini i makromolekuli – nukleinske kiseline, proteini, peptidi, antitijela) (19-21).

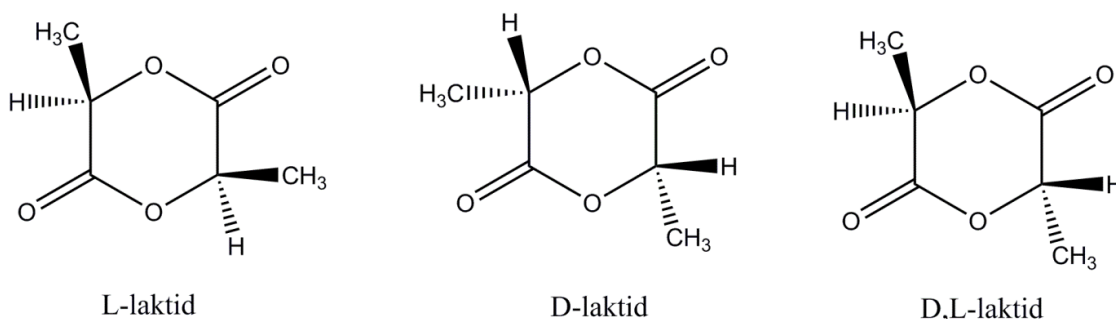
Osim sintetskih, i prirodni materijali kao što su celuloza, kolagen, fibrin, albumini i polisaharidi, su biodegradabilni (22). Budući da je period njihove degradacije uglavnom veoma dug, veliki dio istraživačkog interesa je usmjeren ka dobijanju modifikovanih prirodnih polimera. Jedan od načina modifikacije prirodnih polimera je dodavanjem polarnih grupa koje su nestabilnije i pospješuju degradaciju polimera (23).

Eksperimentalni radovi, koji su dokazali opravdanu primjenu polimernih mikročestica u cilju kontrolisane isporuke lijekova poslužili su da istraživački interes danas uglavnom bude usmjeren na primjenu PLA, PLGA i PCL čestica nanovelčina (24-26). Osobine nanonosača ovih alifatičnih poliesterata, kao i njihova razgradnja u *in vitro* uslovima zavise od metode izrade, osobina samog polimera (molekulska masa, hemijska struktura, prisustvo defekata u lancu, odnos homopolimernih komponenti u kopolimeru, odnos amorfnosti i kristaliničnosti, polidisperznost), kao i od fizičkih, hemijskih i bioloških parametara odnosno fizioloških uslova koji utiču na osobine polimera (pH, temperatura, jonska jačina, prisustvo jona i makromolekula polisaharida, proteina, ćelijske membrane) (27-29). U zavisnosti od pobrojanih faktora, vrijeme degradacije može iznositi od nekoliko nedelja do čak nekoliko godina. Proces degradacije zasnovan je na raskidanju hidrolitički nestabilnih veza u strukturi polimera i karakteristika je jedinjenja tipa estara, anhidrida i amida (30, 31). U toku degradacije, dolazi do kidanja polimernih lanaca i smanjenja molekulske mase polimera. Degradacija indukuje eroziju materijala, koja je takođe definisana gubitkom mase materijala usljed kidanja polimernih lanaca (13, 32). Smatra se da u *in vivo* uslovima

polimer brže degradira usljed prisustva različitih enzima kada dolazi do enzimski katalizovane degradacije (33, 34).

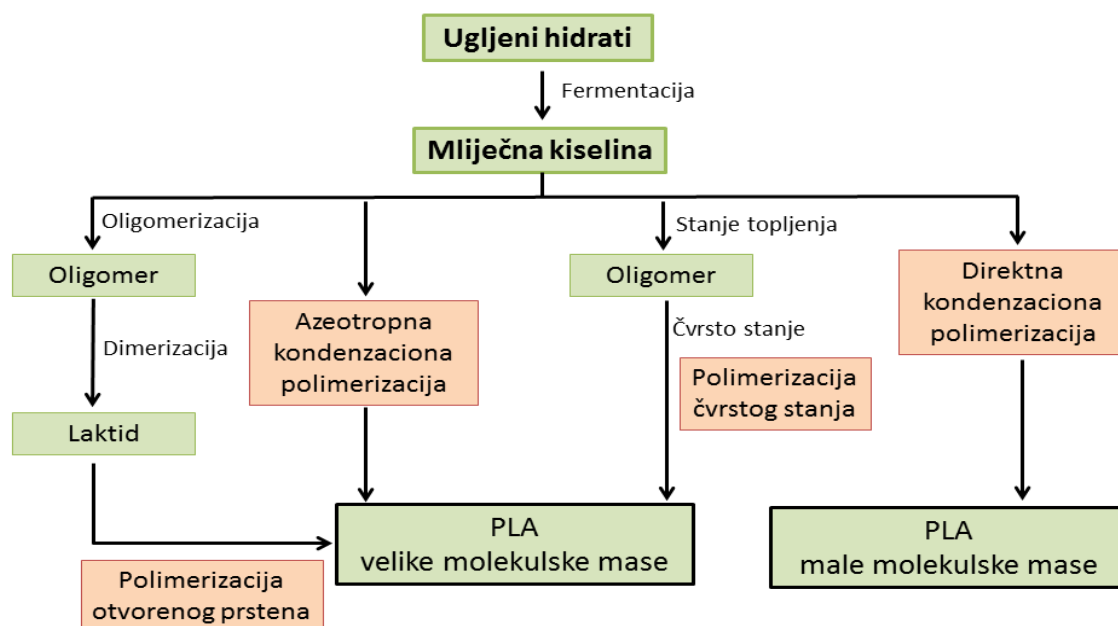
1.1.2. Biodegradacija i biokompatibilnost polimljične kiseline (PLA)

Polimljična kiselina ili polilaktid (PLA) je svoju široku primjenu stekla na polju medicine, gdje se koristi kao biomaterijal za hirurške konce, proteze, srčane zaliske, koštane nosače, itd. (33). Fizičke i hemijske osobine PLA su uslovljene prisustvom metil grupa na dva asimetrična ugljenika u strukturi, te se razlikuju L-, D- i D,L-izomeri ovog polimera (Slika 1-1). Enantiomeri poli-L-laktid (PLLA) i poli-D-laktid (PDLA) se dobijaju u bakteriološkim sistemima izborom odgovarajućeg mikroorganizma. Polilaktid koji se dobija hemijskim procesom predstavlja smještu D- i L-izomera (PDLLA). PLLA je semikristalan, dok je PDLLA amorfan polimer. Zbog veće kristaliničnosti, uređenije i kompaktnije strukture, PLLA ima i bolje mehaničke karakteristike, ali i duži period degradacije. Na mehanička svojstva utiče i molekulska masa, pa se sa povećanjem molekulske mase poboljšavaju i mehaničke osobine polilaktida (35).

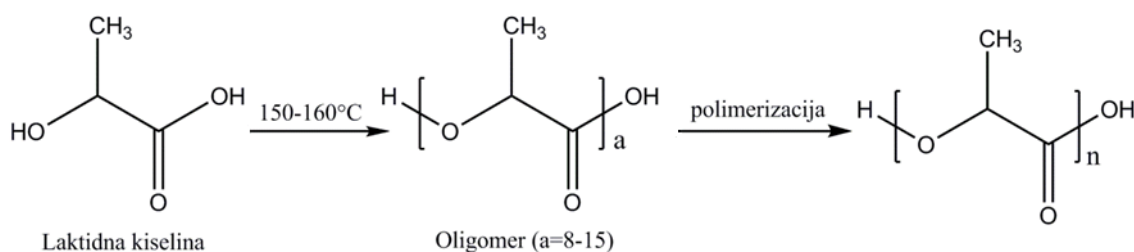


Slika 1-1. Strukturne formule izomera laktida.

U literaturi su opisane različite metode za sintezu PLA. Za dobijanje PLA visoke molekulske mase koriste se azeotropna kondenzaciona polimerizacija, polimerizacija u čvrstom stanju i polimerizacija otvorenog prstena, dok se direktnom kondenzaciona polimerizacijom dobija PLA niske molekulske mase (Slika 1-2). Polimerizacija otvorenog prstena je najzastupljenija metoda sinteze, zbog mogućnosti precizne kontrole strukture i variranja karakteristika PLA (35). Shematski prikaz ove metode predstavljen je na Slici 1-3.



Slika 1-2. Metode za sintezu polimljične kiseline – PLA. (35)

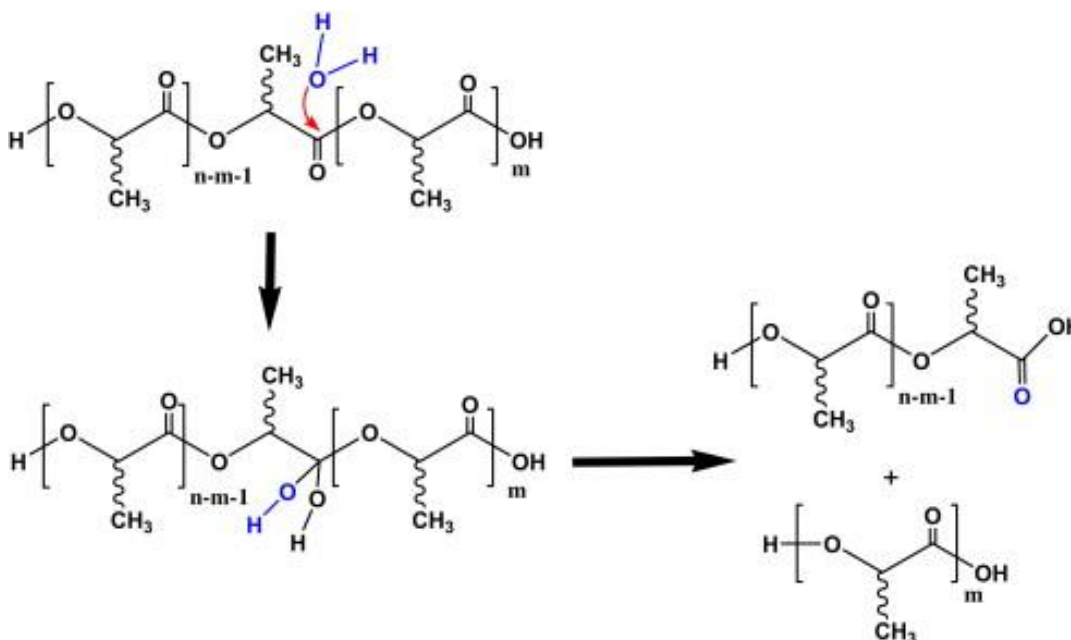


Slika 1-3. Shematski prikaz sinteze polimljične kiseline polimerizacijom otvorenog prstena.

(35)

PLA je komercijalno dostupan polimer u različitim oblicima, koji je poznat po svojoj procesibilnosti, biokompatibilnosti i biodegradabilnosti (36). Kao i svi alifatični estri, PLA degradira hidrolitičkim cijepanjem estarskih veza u lancu ili pod uticajem enzima. Tokom cijepanja lanaca u procesu hidrolize, na krajevima dolazi do formiranja karboksilnih grupa koje potom ubrzavaju dalju hidrolizu, odnosno autokatalizuju hidrolizu estarskih veza (Slika 1-4) (37). Krajnji produkti degradacije su ugljen-dioksid i voda koji se nesmetano uključuju u metabolizam tkiva (Krebsov ciklus) i na taj način

otklanaju iz organizma. Ukoliko se PLA koristi kao nosač u sistemima za isporuku lijekova, poželjno je da ima manju molekulsku masu, čime bi se obezbjedilo kraće vrijeme degradacije polimera i bolje karakteristike kontrolisanog otpuštanja ljekovite supstance (38).



Slika 1-4. Shematski prikaz hidrolitičke degradacije polimljične kiseline. (39)

Američka uprava za hranu i lijekove je uvrstila PDLA u bazu podataka za inaktivne ekscipijense i odobrila njegovu primjenu u farmaciji (praškovi za injekcije i liofilizate za subkutanu ili intramuskularnu primjenu, nosač za isporuku lijekova u periodontalnoj terapiji). Evropska Direktiva 67/548/EEC takođe svrstava PDLA u grupu nerizičnih ekscipijenasa, a monografija ovog polimera se nalazi u Priručniku za farmaceutske ekscipijense (40).

1.2. Teorijski aspekti isporuke lijeka u/kroz kožu

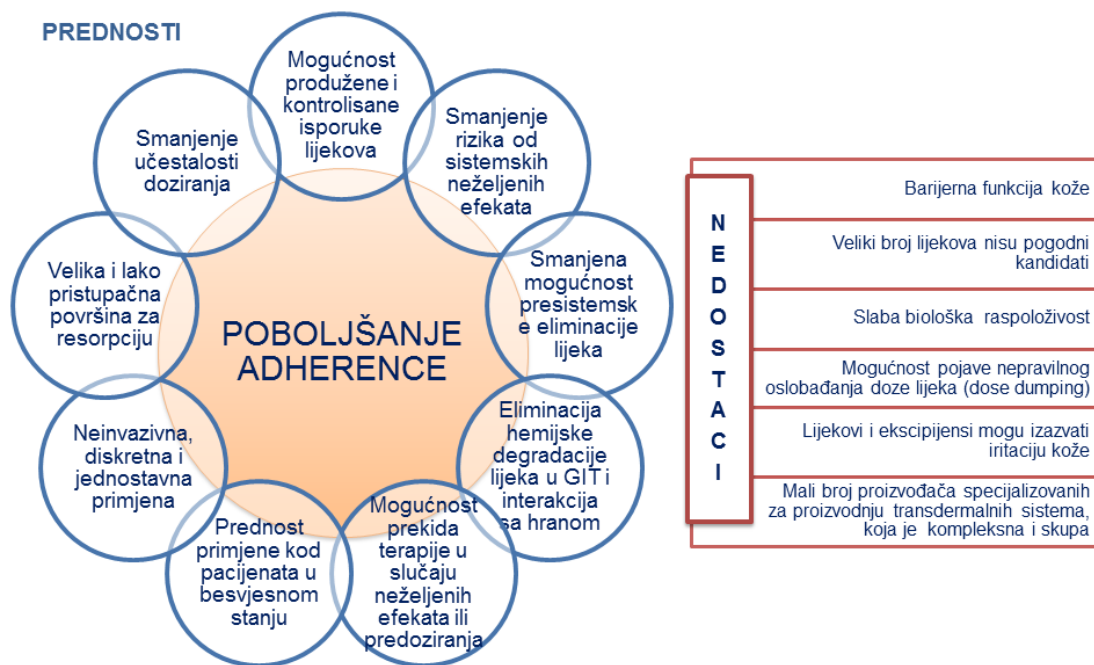
Primjena lijekova na kožu datira od prije nekoliko hiljada godina kada su još drevni grci upotrebljavali balzame koji su se sastojali od smješe vode, maslinovog ulja i olovo-oksida. Maslinovo ulje se koristilo kao vlažeće i okluzivno sredstvo, dok je olovo (II)-oksid imalo adstringentno djelovanje (41). Sve do kraja 19. vijeka, koža se smatrala nepermeabilnom barijerom. Međutim, 1893. godine Bourget i saradnici su svojim istraživanjima dokazali da se reumatoidni artritis može liječiti lokalnim salicilatima (41,

42). U ranom 20. vijeku došlo se do otkrića da lipofilni agensi povećavaju permeabilnost kože. Da je *stratum corneum* (SC) osnovna barijera za hemijsku penetraciju i permeaciju otkriveno je sredinom 1953. godine kada je Blank u svojim eksperimentima određivao permeabilnost vode koristeći tehniku adhezivnih traka (eng. *tape stripping*), prvi put predstavljenu od strane Wolf-a i njegovih saradnika još 1939. godine (41). Rezultati ovih eksperimenata pokazali su da je gubitak vode ostao nepromjenjen sve dok nije otklonjen i poslednji sloj SC-a, na osnovu čega se došlo do zaključka da upravo ovaj spoljašnji sloj epidermisa predstavlja osnovnu barijeru za permeabilnost kože (41, 43). Scheuplein i sar. su ispitivali permeabilnost mnogih supstanci u kožu u *in vitro* uslovima i detaljno opisali troslojnu strukturu kože kroz koju se peremacija lijekovitih supstanci dešava Fick-ovom difuzijom. Njihovi rezultati su takođe pokazali da je SC osnovna barijera za fluks lijeka kroz kožu. (41, 44).

Do sredine 20. vijeka, ljekari su propisivali topikalne preparate isključivo za liječenje kožnih oboljenja. Koža kao put isporuke lijekova u sistemsku cirkulaciju nije komercijalno ni naučnoistraživački korišćena sve do 1954. godine kada je pokazano da se angina može kontrolisati primjenom masti sa nitroglicerinom (42). Ova mast je ujedno bila i prvi komercijalni preparat formulisan za transdermalnu isporuku lijeka u sistemsku cirkulaciju. Trideset godina kasnije, u ranim 80-tim godinama prošlog vijeka, FDA je odobrila prve transdermalne flastere sa nitroglicerinom i skopolaminom kao lijekovitim supstancama (45). Nakon toga na tržištu su se pojavili lijekoviti flasteri koji su sadržavali klonidin, fentanil, levonorgestrel, lidokain, estradiol, testosteron i nikotin (45-47). Do danas, veliki broj transdermalnih sistema za isporuku različitih lijekova, hormona, proteina itd, nalazi se u fazi istraživanja i kliničkih studija.

Sa terapijskog aspekta, razlikujemo isporuku lijeka na površinu kože (uglavnom kozmetički preparati ili antiseptici), u različite slojeve kože – lokalna isporuka lijeka (npr. neoplazme, inflamatorna oboljenja ili mikrobne infekcije kože), i u sistemsku cirkulaciju – transdermalna isporuka lijeka ili perkutana resorpcija. Iako je još uvijek većina preparata koji se aplikuju na kožu namjenjena za lokalnu isporuku lijeka, u proteklih 30 godina istraživački interes usmjeren je na razvoj formulacija za transdermalnu isporuku lijekova, koja predstavlja alternativu za konvencionalne sistemske i oralne puteve primjene (41). U prilog ovome je i činjenica da je 1990. godine istraživanje naučne baze Pubmed pokazalo svega 295 radova koji su sadržavali

termin “transdermal“, u poređenju sa preko 30000 naučnih radova koliko ova baza sadrži danas (41).



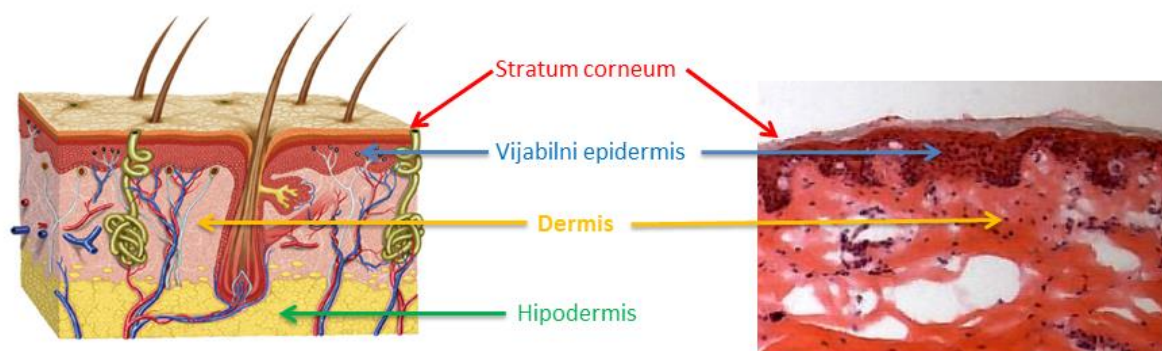
Slika 1-5. Prednosti i nedostaci transdermalne isporuke lijekova.

Transdermalna primjena pruža određene prednosti u odnosu na oralnu i parenteralnu primjenu, a za pojedine lijekove predstavlja i najpogodniji put za isporuku lijekova. Najznačajnije prednosti i nedostaci transdermalnog načina isporuke lijekova prikazane su na Slici 1-5. U poređenju sa primjenom lijekova *per os*, transdermalni način primjene eliminiše interakcije lijeka sa hranom, kao i njegovu hemijsku degradaciju u gastrointestinalnom traktu. Ovaj način primjene smanjuje neželjene efekte i presistemsku eliminaciju lijeka (eng. *first pass effect*), a pogodan je i kod pacijenata u besvjesnom stanju, kao neinvazivan način primjene u poređenju sa parenteralnim putem isporuke lijeka. Međutim, nemaju svi lijekovi mogućnost transporta kroz kožu, a brzina penetracije i permeacije lijeka u/kroz kožu zavisi od godina starosti, rase, mjesta primjene na koži i bolesti kože. Ipak, glavni ograničavajući faktor isporuke lijekova u/kroz kožu predstavljaju barijerne karakteristike kože, odnosno *stratum corneum*-a (21).

1.2.1. Struktura kože

Koža je najveći organ koji čini više od 10% ukupne tjelesne mase i predstavlja zaštitnu barijeru za prolaz supstanci u organizam. Osim zaštitne, koža ima i druge važne funkcije koje su od vitalnog značaja za život ljudi, a to su homeostatska i senzorna uloga. Koža omogućava održavanje tjelesne temperature i stalnog sastava tjelesnih tečnosti, prenosi senzorne informacije u nervni sistem i učestvuje u imunološkoj odbrani organizma. U donjem dijelu epidermalnog sloja koža se sastoji od visoko specijalizovanih Langerhansovih ćelija koje imaju značajnu ulogu u imunološkom sistemu kože, a u svojoj funkciji usko su povezane s odbrambenim sistemom cijelog tijela.

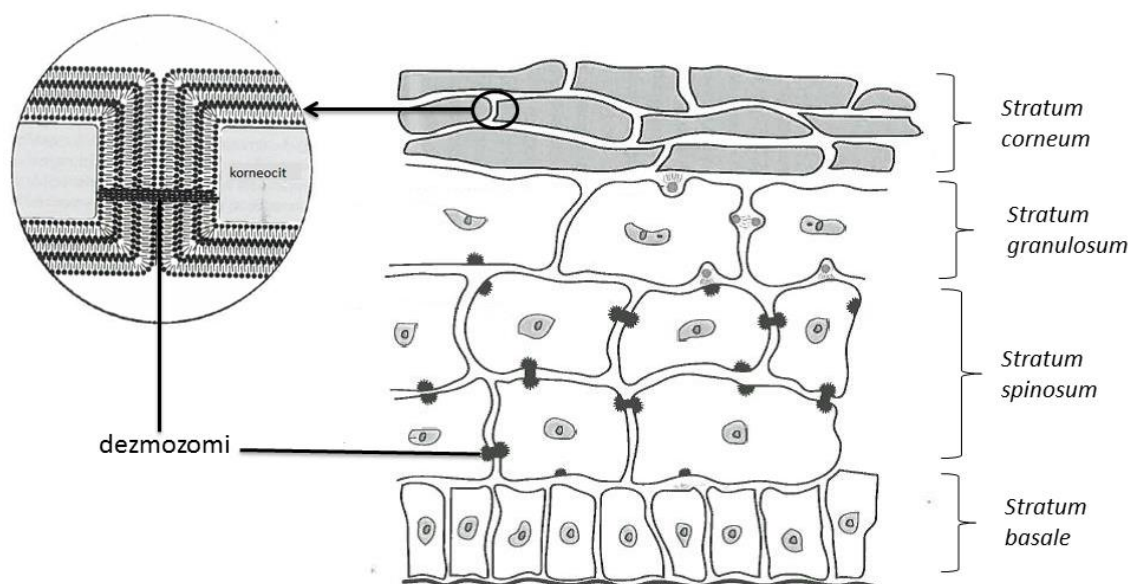
Anatomski, kožu čine četiri glavna sloja: *stratum corneum*, vijabilni epidermis, dermis i hipodermis (subkutano tkivo) (Slika 1-6). Iako SC predstavlja dio epidermisa, smatra se posebnim slojem kože zbog svojih specifičnih barijernih osobina. SC se sastoji od 15-25 zbijenih slojeva orožalih, nevijabilnih ćelija – korneocita, debljine 0,3-0,7 μm , što daje ukupnu debljinu ovog sloja kože u nehidratisanom stanju od oko 10-25 μm (48). Osim hidratacije, debljina SC zavisi i od dijela tijela (tabani i dlanovi imaju mnogo veću debljinu SC koja se kreće od 400-600 μm). Svaka ćelija ovog spoljašnjeg sloja kože sadrži snopove nerastvornog keratina (~70%) i lipida (~20%) obavijenih ćelijskom membranom. Brojne studije pokazale su da korneociti imaju lipidnu opnu koja se sastoji od N-(ω -hidroksiacil) sfingozina kovalentno vezanih za bočne glutaminske lance proteina opne (49, 50). Ova lipidna opna predstavlja skelet za formiranje intercelularnih lipidnih lamela, koji sa dezmozomima (korneozomima) čine sadržaj intercelularnog prostora i obezbjeđuju kohezivnost korneocita (Slika 1-7). Poznato je da u sastav intercelularnih lipida ulaze holesterol (~35 %), ceramidi 1-9 (~50 %) i masne kiseline (~15 %) (51). Upravo zbog ovog specifičnog sastava i jedinstvenog strukturnog uređenja intercelularnih lipida, permeabilnost SC za vodu je 1000 puta manja od većine drugih bioloških membrana (52). Osim toga, ove izuzetno struktuirane i veoma stabilne strukture formiraju efikasnu barijeru za hemijsku penetraciju i permeaciju (53).



Slika 1-6. Anatomska građa kože – shematski i histološki prikaz. (54)

Ćelije SC-a potiču iz vijabilnog epidermisa i prije deskvamacije podliježu brojnim promjenama. Epidermis se sastoji od nekoliko ćelijskih slojeva u različitom stepenu diferencijacije (Slika 1-7). Diferencijacija keratinocita u pravcu stvaranja orožale ćelije počinje u bazalnom sloju (*stratum basale*), koji predstavlja najdublji sloj epidermisa. Cilindrične ćelije bazalnog sloja predstavljaju matične ćelije od kojih diobom nastaju keratinociti. Dalje ćelije napreduju kroz *stratum spinosum* koji se sastoji od više slojeva krupnih poligonalnih ćelija međusobno povezanih dezmozomima. Dezmozomi u epidermisu su odgovorni za povezivanje keratinskog citoskeleta svake ćelije i na taj način stvaraju tkivo koje je veoma otporno na pritisak. Diferencijacija keratinocita se dalje nastavlja u slojevima *stratum granulosum* i *stratum lucidum* do *stratum corneum*-a (55). Površinski slojevi SC se konstantno uklanjaju, a kompletno obnavljanje dešava se svake dvije do četiri nedelje (56). Osim germinativnih ćelija - keratinocita, koje čine oko 95% epidermisa, u ovom sloju kože prisutne su i specijalizovane ćelije poput melanocita, Merkelovih i Langerhansovih ćelija, koje su odgovorne za već spomenute različite funkcije kože.

Dermis je rastresito vezivno tkivo koje zauzima najveći dio kože i predominantno se sastoji od kolagenih i elastičnih vezivnih vlakana. Mreža kolagenih vlakana obezbjeđuje potporu epidermisu, dok su elastična vlakna odgovorna za tonus i elastičnost kože. Osim toga u dermisu se nalaze i mreže krvnih sudova i nervnih završetaka, koje imaju ključnu ulogu u regulaciji temperature i bola.



Slika 1-7. Morfolologija epidermisa – shematski prikaz. (55)

U gornjem, papilarnom dijelu dermisa kolagena vlakna su mala i raspoređena slobodno ili vertikalno u odnosu na dodirnu površinu sa epidermisom, dok dublji, retikularni region sadrži gusto pakovana kolagena vlakna raspoređena uglavnom horizontalno u pravcima zvanim Langerove linije (53, 57).

Najdublji sloj kože je hipodermis (*subcutis*) kojeg čine lobulusi masnog tkiva odvojeni vezivnim tkivom. Debljina hipodermisa varira u zavisnosti od površine tijela i individualnih razlika, a osim što predstavlja toplotnu izolaciju organizma i depo energetskog materijala, vezuje kožu za mišiće i kosti i omogućava njenu pokretljivost (55).

Kao što je već spomenuto na početku ovog odjeljka, jedno od glavnih ograničenja za uspješnu transdermalnu isporuku lijekova je upravo barijerna funkcija kože odnosno, barijerna svojstva SC-a. Izrazito složena struktura lipidnog matriksa je pokazatelj kompleksnosti procesa penetracije lijeka u kožu. Međutim i druge strukture kože doprinose otporu koji koža kao barijera pruža penetraciji egzogenih supstanci (58). Tako se pri razmatranju procesa penetracije/permeacije lijeka u/kroz kožu moraju uzeti u obzir i mehaničke osobine kože odnosno svakog njenog sloja. Ovo je posebno značajno jer se sama barijerna svojstva SC-a mogu otkloniti npr. primjenom mikroigala, ali to istovremeno ne znači da su sve barijere koje koža pruža otklonjene. Mehaničke

osobine SC-a i vijabilnog epidermisa zavise od uslova okoline, poput vlažnosti i temperature. Osim toga, primjena različitih vlažećih sredstava ili emolijena također utiču na povećanu hidrataciju SC-a, značajno modifikujući i njegove mehaničke osobine. Ipak, glavnu mehaničku funkciju kože obezbjeđuje dermis. Zahvaljujući izduživanju kolagenih vlakana, retikularni dermis je u stanju da se proširi i do 25%, ali isto tako i da se skupi usljed bočnog pomjeranja amorfne osnove koja djeluje kao viskozni gel materijal koji, čak ni pod velikim pritiskom, ne može da "iscuri" iz dermisa. Stalni pritisak na retikularni dermis dovodi do savijanje struktura koje leže iznad ovog sloja, a samim tim i površine kože, međutim mreža elastičnih vlakana obezbjeđuje potpuni oporavak oblika i arhitekture tkiva nakon deformacije. Budući da papilarni sloj čini svega oko 10% od ukupne debljine dermisa, mreža elastičnih vlakana koja se ovdje nalazi ima prvenstveno zaštitnu ulogu (štiti krvne sudove od mehaničkih oštećenja (56). Uticaj mehaničkih svojstava različitih slojeva kože i proučavanje njihove interakcije sa objektima mikronskih veličina poput mikroigala od posebnog je značaja za efikasnu transdermalnu isporuku lijeka. Osim mehaničkih svojstava kože, na pomenute interakcije utiče i oblik mikroigala, kao i njihova dužina u odnosu na debljinu pojedinih slojeva kože, što će detaljno biti razmatrano u poglavlju 1.3 (59).

1.2.2. Putevi transporta kroz kožu

Nakon primjene lijeka na kožu, prvo se odvija proces **penetracije** odnosno ulaska u kožu, a potom njene **permeacije** kroz jedan sloj kože u naredni i naposljetku do **resorpcije**, odnosno preuzimanja lijeka u vaskularni sistem (krvotok i/ili limfotok). Najznačajniji faktori koji utiču na ova tri osnovna procesa perkutane resorpcije lijeka su: struktura kože, fizičko-hemijske osobine i koncentracija ljekovite supstance, kao i fizičko-hemijske osobine sistema u koji je ljekovita supstanca inkorporirana (58). Osim strukture kože, na perkutanu resorpciju utiču i drugi biološki faktori, kao što su varijacije anatomskog mjesta, intra- i inter-individualne varijacije, polne, starosne i rasne varijacije, metabolizam kože, kao i različita oboljenja i patološka stanja (55).

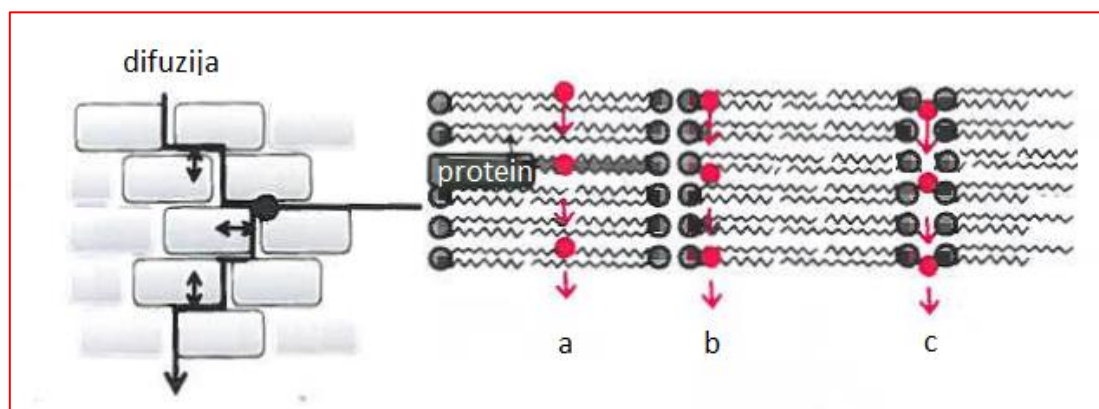
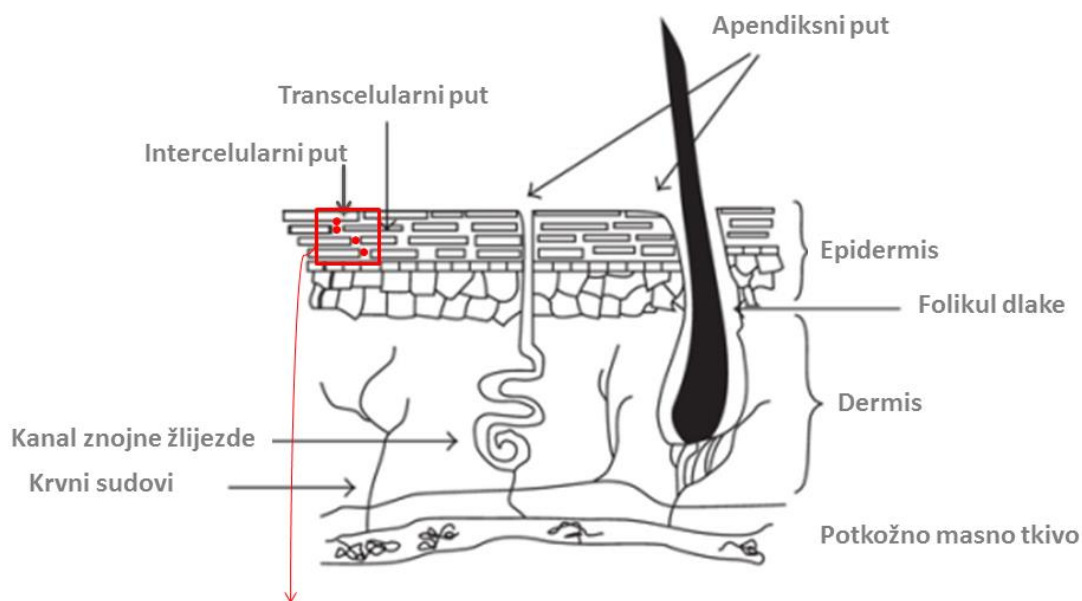
Mnogi radovi su potvrdili postojanje tri glavna puta kojim lijek može difundovati kroz intaktni SC: intercelularni, transcelularni i apendiksni put (Slika 1-8) (41). Prolazak lijeka kroz privjeske ili dodatke kože (apendiksni put) omogućavaju kanali folikula dlaka, znojnih ili lojnih žlijezda. Iako ovaj put obezbjeđuje direktnu penetraciju kroz SC, otežavaju ga brojni faktori. Prije svega, površina koju zauzimaju folikule dlaka

i znojni kanali je veoma mala (svega 0,1% ukupne površine kože) što ograničava površinu dostupnu za direktan kontakt primjenjene formulacije lijeka. Kanali znojnih žlijezda su ili prazni ili aktivno luče vodeni rastvor soli, što bi se moglo smatrati poželjnim za mnoge lijekove. Ipak, permeacija je ograničena jer se znoj luči u smjeru suprotnom difuzionom putu permeanta. S druge strane, kanali lojnih žlijezda su ispunjeni sebumom koji je bogat lipidima, što predstavlja barijeru za difuziju hidrofilnih lijekova (41). Smatra se da je ovaj put dominantan neposredno nakon primjene formulacije lijeka na kožu. Međutim, kada se uspostavi stanje ravnoteže difuzionog procesa lijeka, drugi putevi prolaska lijeka postaju dominantniji (44). Iako prolazak lijeka kroz pore ima generalno mali doprinos na ukupan fluks kroz kožu, smatra se da je ipak značajan za velike polarne molekule i jone (60).

Transcelularni put podrazmjeva prolazak lijeka kroz korneocite, koji zahvaljujući visoko hidratisanom keratinu omogućavaju prolazak hidrofilnih lijekova. Kao što je već objašnjeno, ove ćelije su okružene intercelularnim lipidnim lamelama, te proces difuzije lijeka ovim putem zahtjeva brojne korake raspodjeljivanja (eng. *partitioning*) i difuzije lijeka u/iz hidrofilnih korneocita, a potom u/iz višeslojnih dvostrukih lamela lipida. Brojne studije su pokazale da je ovaj put predominantan za visoko hidrofilne lijekove tek nakon što se postigne stanje ravnoteže fluksa (55).

Intercelularni put podrazumjeva difuziju lijeka kroz kontinuirani matriks intercelularnih lipida. Zbog malog volumena i veoma kompleksne strukture intercelularnog matriksa, opisane u prethodnom odjeljku, ovaj put prvobitno nije smatran potencijalno značajnim difuzionim putem.

Osim toga, dužina intercelularnog prolaska lijeka, je u suprotnosti sa direktnim putem prolaska lijeka transcelularno (41). Naime, procjenjeno je da intercelularnim putem voda putuje 50 puta dublje nego što je debljina SC-a (61). Sistematične studije proučavanja intercelularnog lipidnog matriksa SC-a dokazale su prisustvo lipidne i polarne putanje što otežava difuziju kako lipofilnih, tako i polarnih molekula koje moraju naizmjenično da se raspodjeljuju i difunduju kroz lipidna i polarna područja (Slika 1-8) (41). I pored svega, intercelularni put se smatra glavnim putem permeacije kroz SC, te se istraživački interes usmjerio ka pronalasku novih metoda koje bi omogućile efikasniji transport lijeka u kožu.



Slika 1-8. Putevi prolaska lijeka kroz kožu i detaljan prikaz procesa raspodjele i difuzije permeanta kroz intercelularne lipide SC-a: (a) difuzija kroz središte dvostrukog sloja lipida, (b) difuzija kroz dvostruki sloj neposredno pored polarnih glava, (c) difuzija kroz polarna područja.

Dominacija jednog od puteva u procesu transporta lijeka kroz kožu u najvećoj mjeri zavisi od same prirode ljekovite supstance – permeanta. Najvažniji faktori koji određuju prirodu jedne ljekovite supstance su njen particioni koeficijent, veličina molekule, jonizacija, rastvorljivost i tačka topljenja (55). Osim ovih faktora, i druge osobine molekule lijeka treba uzeti u obzir pri odabiru kandidata za transdermalnu isporuku. Imajući u vidu kompleksan sastav kože (lipidi, proteini, enzimi, itd) i različitu prirodu ljekovitih supstanci (slabe kiseline/baze, jonizaciju molekula, itd) postoji veliki broj potencijalnih interakcija između lijeka i tkiva kože. Eventualno vezivanje lijeka za

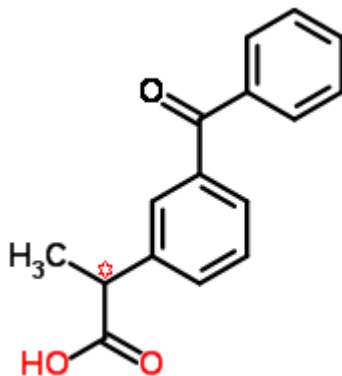
različite strukture u koži, bilo putem vodoničnih ili slabih Van der Waals-ovih veza, utiče na njegov fluks kroz kožu. Dodatno, na fluks lijeka kroz kožu može uticati i veličina čestica slabo rastvornih ljekovitih supstanci (suspenzije), kao i primjena enantiomera koji imaju nižu tačku topljenja i bolju rastvorljivost u poređenju sa racematima (atenolol, propranolol) (55).

Imajući u vidu sve navedeno, pravilan izbor lijeka kandidata za intradermalnu ili transdermalnu primjenu zahtjeva detaljna preformulaciona istraživanja, kako bi se formulisao farmaceutski oblik kojim će se postići optimalna farmakološka aktivnost lijeka i obezbjediti sigurnost njegove primjene.

1.2.3. Ketoprofen – kandidat za intradermalnu/transdermalnu isporuku

Ketoprofen je anjonski nesteroidni antiinflamatorni lijek (NSAIL), i pripada grupi najviše propisivanih lijekova u svijetu. Kao derivat propionske kiseline [(RS)2-(3-benzoilfenil)-propionska kiselina], ketoprofen je sintetisan u Parizu 1967. godine i prvi put primjenjen u kliničkoj praksi 1973 godine u Francuskoj i Velikoj Britaniji (62). Zahvaljujući prisustvu jednog asimetričnog ugljenikovog atoma u hemijskoj strukturi ketoprofena, razlikujemo S- i R- enantiomer ovog lijeka. U svojoj strukturi ketoprofen sadrži i slobodnu karboksilnu grupu, od koje potiče kiselost ove molekule (Slika 1-9). Ketoprofen je praktično nerastvorljiv u vodi, a tačka topljenja iznosi 94°C. Rastvorljivost ketoprofena se povećava sa povećanjem pH vrijednosti iznad konstante disocijacije (pKa). Vrijednost konstante disocijacije ketoprofena, koja ima važnu ulogu za jonizaciju, a time i za permeabilnost ovog lijeka, iznosi 4.23 u vodi i 5.02 u vodenim rastvorima čija je pH vrijednost 1.5 (63, 64) Particioni koeficijent (log P) ketoprofena određen na osnovu raspodjele u sistemu oktanol-voda, koji je široko prihvaćen kao model za lipidno-vodeni sistem, iznosi 3.2 (64). Mnoge studije potvrđuju da se ljekovite supstance čija je log P vrijednost između 1 i 3 dobro resorbuju (53, 64). Generalno, visokolipofilni molekuli imaju tendenciju da se zadržavaju u lipofilnim dijelovima ćelijskih membrana, dok visokopolarni molekuli imaju lošu biološku raspoloživost zbog nemogućnosti da penetriraju kroz biološke membrane. Stoga postoji korelacija između log P vrijednosti neke ljekovite supstance i njenog transporta (53). Kada je riječ o perkutanoj apsorpciji, a imajući u vidu strukturu SC detaljno opisanu u odjeljku 1.2.1., za ljekovite supstance poput ketoprofena koje imaju visoke vrijednosti particionog koeficijenta (log P > 3), najvjerovatniji put prolaska lijeka kroz SC bio bi intercelularni.

Međutim, u ovom slučaju postavlja se pitanje mogućnosti dalje raspodjele visokolipofilnih susptanci iz SC u pretežno vodenu sredinu vijabilnog epidermisa (55).



Slika 1-9. Strukturna formula ketoprofena.

Zahvaljujući svom analgetičkom, antipiretičkom i antiinflamatornom dejstvu ketoprofen se u kliničkoj praksi primjenjuje za otklanjanje, ublažavanje i kontrolu bola slabog do umjerenog intenziteta, kao i za liječenje upala koštanog sistema i mekih tkiva, te su glavne indikacije za ove lijekove reumatoidni artritis i osteoartritis. Svoje dejstvo, ketoprofen ostvaruje blokiranjem enzima ciklooksigenaze (COX) i inhibicijom sinteze i oslobađanja prostaglandina, koji se smatraju glavnim medijatorima bolova i upale. Ketoprofen još dodatno inhibira aktivnost bradikinina, migraciju polimorfonuklearnih leukocita i stabilizuje membranu lizozima, limitirajući na taj način intenzitet i širenje inflamatornog procesa. Biološka raspoloživost ketoprofena poslije oralne primjene je preko 90%, dok je resorpcija nakon intramuskularne i rektalne primjene slična i iznosi oko 70 - 90% u odnosu na ekvivalentnu oralnu dozu. Terapijska koncentracija ketoprofena u serumu nakon peroralne primjene postiže se već nakon 30 minuta, a najviša koncentracija nakon 1,5 - 2 sata. Poluvrijeme eliminacije ovog lijeka je 1.1 – 1.3 sata nakon oralne doze od 100 mg, i oko 2 sata nakon iste doze primjenjene intravenski (65). Zbog ovako kratkog poluremena eliminacije, učestalost doziranja je prepoznat kao jedan od osnovnih nedostataka ovog lijeka. Osim toga, upotreba ketoprofena i svih ostalih NSAIL je ograničena zbog ozbiljnih neželjenih efekata koje ovi lijekovi ispoljavaju ukoliko se primjenjuju oralnim putem. Pored oštećenja bubrega i srčanih smetnji, najučestaliji neželjeni efekti su ipak teška oštećenja gastrointestinalnog trakta

(GIT), koja rezultuju pojavom mukoznih lezija, ulceracija i krvarenja na sluznici želuca, duodenuma i drugih organa GIT-a (21, 66).

Tabela 1-2. Parametri koji se razmatraju pri izboru kandidata za transdermalnu isporuku lijeka. (64, 67)

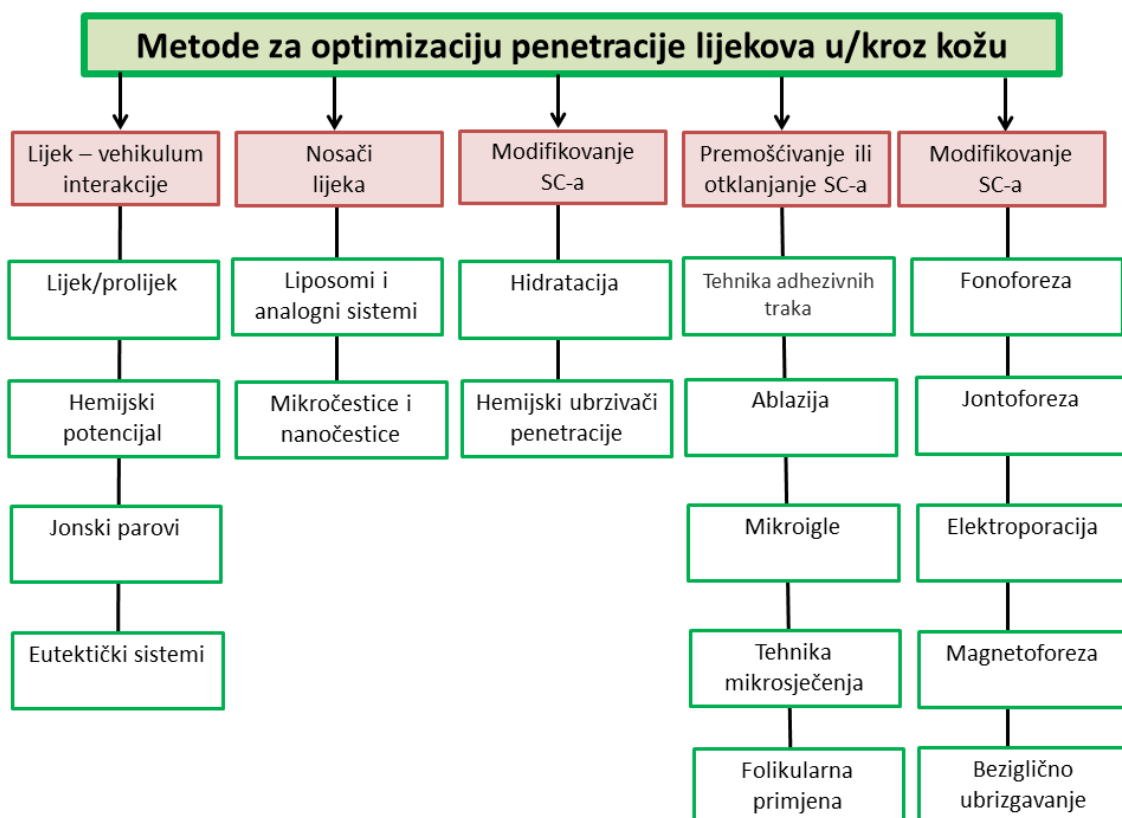
Parametar	Idealne osobine	Ketoprofen
Molarna masa	<400 g/mol	254,3 g/mol
Particioni koeficijent (logP)	1-4	3.2
Koeficijent permeabilnosti	>0,5 x 10 ⁻³	5,01 x 10 ⁻³
Poluvrijeme eliminacije	≤ 10 h	2 h
Oralna biološka raspoloživost	niska	visoka
Terapijska širina	uska	široka

U Tabeli 1-2 prikazani su najznačajniji fizičko-hemijski i farmakokinetički parametri koji su razmatrani prilikom izbora ketoprofena kao model supstance za transdermalnu primjenu. Iako ketoprofen odlikuju široka terapijska širina i visoka biološka raspoloživost nakon oralne primjene, ostali fizičko-hemijski i farmakokinetički parametri, kao i brojna neželjena dejstva, svrstavaju ovu ljekovitu supstancu u idealnog kandidata za intradermalnu i transdermalnu primjenu, što potvrđuju i brojna teorijska razmatranja i eksperimentalne studije (68-70).

1.2.4. Metode optimizacije isporuke lijeka u/kroz kožu

Proteklih nekoliko decenija intenzivno su proučavane različite fizičke i hemijske metode, kao i primjena terapijskih sistema za isporuku lijekova (eng. *drug delivery systems*), kako bi se savladala barijerna funkcija SC, ostvarilo kontrolisano oslobađanje lijeka i poboljšala efikasnost i selektivnost postojećih formulacija za transdermalnu primjenu (24, 27, 71). Mogući načini optimizacije intradermalne/transdermalne isporuke lijeka prikazani su na Slici 1-10 i uključuju modifikaciju interakcija između vehikuluma i lijeka (primjena odgovarajućeg lijeka/prolijeka, eutektičkih sistema, zasićenih rastvora), primjenu nosača ljekovitih supstanci (liposomi, nanočestice), modifikovanje svojstava SC-a (hidratacija, primjena hemijskih ubrzivača penetracije), premošćavanje barijere SC-a ili otklanjanje SC-a (mikroigle, ablazija, folikularna isporuka), kao i primjenu različitih fizičkih metoda (sonoforeza, jontoforeza,

elektroporacija, magnetoforeza, beziglični ubrizgivači) (72). Usporedni prikaz efikasnosti pojedinih metoda za optimizaciju transporta lijeka u/kroz kožu dat je u Tabeli 1-3. Bariya i sar.su ustanovili da određeni pristupi isporuke lijeka u/kroz kožu u velikoj mjeri poboljšavaju transport lijeka, ali istovremeno dovode do nedovoljnog oslobađanja lijeka ili pojave bola i iritacije kože (73).



Slika 1-10. Prikaz metoda za poboljšanje intradermalne i transdermalne isporuke lijeka. (41)

Od brojnih nosača za isporuku lijekova u/kroz kožu, najviše je proučavana primjena nanočestica (29, 74-76), nanoemulzija (77, 78), čvrstih lipidnih nanočestica (79-83), mikroemulzija (84-86), liposoma (87-90), i niosoma (91, 92). Liposomi su bili među prvim unapređenim nosačima koji su našli svoju upotrebu u formulacijama preparata za primjenu na koži, i kao takvi se danas već nalaze na tržištu (Clindasome®, 1% liposomski gel klindamicina, Hemofarm Koncern AD, Srbija). Oni predstavljaju netoksične, neinvazivne sisteme za isporuku hidrofilnih i lipofilnih molekula lijeka (91). Ipak, mala efikasnost inkapsulacije, brzo istiskivanje inkorporiranog sadržaja i

nestabilnost tokom skladištenja su nedostaci ovih sistema za isporuku lijekova (17). Svoj potencijal za poboljšanje isporuke lijekova preko kože pokazali su i različiti mikroemulzioni sistemi. U brojnim studijama ističe se njihova prednost u odnosu na uljane rastvore, liposome ili micidele, najvjerojatnije zahvaljujući dobroj rastvorljivosti liposolubilnih supstanci u mikroemulzionom vehikulumu. Osim toga, ekscipijensi koji ulaze u sastav mikroemulzija (izopropilmiristat, izopropilpalmitat, oleinska kiselina, fosfolipidi, propilenglikol) su poznati kao ubrzivači permeacije. Ovi nosači, kao i visoka koncentracija tenzida u mikroemulzionim sistemima, mogu da dovedu do iritacije kože što predstavlja jedan od glavnih nedostataka (17, 85).

Tabela 1-3. Poređenje efikasnosti različitih pristupa za intradermalnu/transdermalnu isporuku lijeka. (73)

Metoda	Poboljšan transport lijeka	Odložena isporuka lijeka	Primjena bez bola i iritacije kože
Hipodermalna igla	+++	++	+
Hemijski ubrzivači penetracije	+	+++	++
Jontoforeza	++	+++	+++
Elektroporacija	++	+++	++
Sonoforeza	++	+++	+++
Mikroigle	++	+++	+++
Beziglični ubrizgivači	+++	+	+

Niska efikasnost +. Srednja efikasnost ++. Visoka efikasnost +++.

Za razliku od mikročestica, koje kao nosači lijekova u preparatima za primjenu na koži imaju neznatan okluzivan efekat ili uopšte ne utiču na okluzivnost, čestice nanometarskih veličina povećavaju okluzivnost, a time i penetraciju inkorporiranog lijeka. Veliki istraživački interes je bio usmjeren na razvoj čvrstih lipidnih nanočestica (eng. *solid lipid nanoparticles*, SLN) i nanostrukturiranih lipidnih nosača (NLC) ljekovitih supstanci u preparatima za primjenu na kožu (79, 80, 82). Osnovne prednosti ovih sistema su: zaštita lijeka od hemijske degradacije, kontrolisano oslobađanje lijeka iz čvrstog lipidnog matriksa, formiranje filma na koži koji ispoljava okluzivan efekat i

moгуćnost jednostavne proizvodnje. Ipak, glavni nedostaci SLN su nizak kapacitet opterećenja lijekom, istovremeno prisustvo drugih koloidnih struktura (micela, lipozoma), kao i fizička nestabilnost tokom čuvanja ili primjene, usljed složenosti fizičkog stanja lipida (17, 82). Zbog navedenih nedostataka, ali i višesutruko skupljeg dobijanja lipida i izrade čvrstih lipidnih nanočestica, intenzivno se istražuju mogućnosti dobijanja novih polimera za izradu polimernih nanočestica, koji će odgovoriti postavljenim zahtjevima i omogućiti izradu i primjenu različitih polimernih nanonosaa za dermalnu i transdermalnu isporuku lijekova (93).

Budući da je predmet istraživanja ove doktorske disertacije primjena polimernih nanočestica kao nosaa lijekovite supstance, i mikroigala kao fizičke metode premošćavanja barijernih osobina kože, u daljem tekstu detaljnije su opisane samo ove dvije metode optimizacije transdermalne isporuke lijeka.


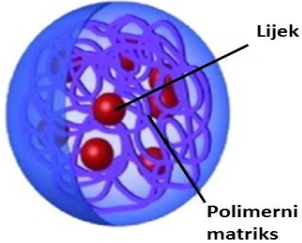

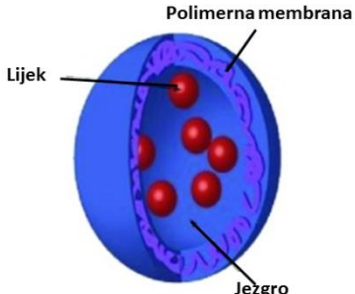

1.2.5. Polimerne nanočestice – nosači za intradermalnu/transdermalnu isporuku lijeka

Razvoj polimernih nanočestica, u svrhu kontrolisane i ciljane isporuke lijekova i prevazilaženja nedostataka tradicionalnih nosaa lijekovitih supstanci, započeo je sa ciljem kontrolisanog oslobađanja lijekovite supstance, koje obezbjeđuje ravnomjernu i efikasnu koncentraciju lijeka na ciljnom mjestu, redukuje učestalost doziranja i smanjuje mogućnost sporednih, neželjenih efekata (npr. toksični efekti nesteroidnih antinflatornih lijekova, citostatika, antimikrobnih lijekova) (21). Polimerne nanočestice karakterišu dobre osobine stabilnosti i mogućnosti zaštite inkorporirane lijekovite supstance od hemijske i enzimske degradacije. Nanoveličina ovih koloidnih nosaa povećava efikasnost i preciznost medicinske dijagnostike i terapije na nivou pojedinačnih molekula ili molekulskih struktura, omogućava bolju penetraciju i efikasniju akumulaciju lijekovite supstance na ciljnim mjestima (17, 18).

Polimerne nanočestice su koloidni sistemi prečnika manjeg od 1000 nm. Postoje različita tumačenja kada se govori o podjeli nanosistema u odnosu na njihovu veličinu. U okviru nanotehnologije uopšte, nanosistemima se smatraju samo oni sa veličinama ispod 100 nm, dok se sistemi veličina od 100-1000 nm klasifikuju kao submikronski sistemi (94). Međutim, mnoge studije su pokazale da je za isporuku lijekova idealan opseg veličina od 5-250 nm, jer nosači ovih veličina imaju tendenciju da posjeduju sličan niz osobina pogodnih sa fiziološkog i anatomskog aspekta isporuke lijekovite

supstance (95). U zavisnosti od načina sinteze, razlikuju se dvije vrste polimernih nanočestica: nanosfere, koje su matriksni sistemi i čiji cijeli volumen zauzima polimer, i nanokapsule, koje predstavljaju rezervoar sisteme, sastavljene od uljanog ili vodenog jezgra, okruženog polimernom membranom. Ljekovita supstanca može biti inkapsulirana u jezgro nanokapsule, dispergovana u polimerni matriks nanosfere ili adsorbovana na površinu nanočestice. Shematski prikaz i osnovne karakteristike nanosfera i nanokapsula dati su u Tabeli 1-4 (93).

Tabela 1-4. Podjela, definicija i shematski prikaz nanosfera i nanokapsula.

Nanodisperzni sistem	Sastav	Definicija	Shematski prikaz	
Nanosfere	polimeri	Polimerne nanočestice matriksnog tipa čiji cijeli volume zazima polimer, uglavnom nerastvorljiv u vodi		
Nanokapsule sa hidrofobnim jezgrom	polimeri i ulje	Polimerne nanočestice tipa rezervoara, čije uljano jezgro okružuje polimerna membrana		
Nanokapsule sa hidrofilnim jezgrom	polimeri i voda	Polimerne nanočestice tipa rezervoara, čije vodeno jezgro okružuje polimerna membrana		

Prve nanočestice koje su predložene kao nosači ljekovitih supstanci bile su izrađene od želatine i umreženog albumina. Međutim, variranje stepena čistoće polisaharida, stimulacija odgovora imunog sistema od strane proteina, kao i toksičnost sredstava za umrežavanje, bili su dovoljni razlozi da se istraživački interes ubrzo usmjeri ka upotrebi sintetskih polimera za razvoj nanočestica. Za tu svrhu prvobitno su korišteni bio-nedegradabilni polimeri akrilamida i metil metakrilata, koji su potom zamjenjeni biodegradabilnim sintetskim polimerima, dizajniranim prvenstveno za primjenu u medicini (PLA, PGA, PLGA, PCL) (21).

Na degradaciju polimernih nanočestica i njihovu adheziju i interakciju sa ćelijom, u velikoj mjeri utiču njihova veličina i oblik, koje su u direktnoj zavisnosti od vrste polimera i metode izrade nanočestica. Osim na degradaciju, morfološke osobine nanočestica utiču i na distribuciju lijeka, njegovu resorpciju i biološku raspoloživost nakon primjene (17, 29). Stoga su metode izrade i karakterizacije polimernih nanočestica od izuzetnog značaja za njihovu primjenu kao nosača ljekovitih supstanci do ciljnih tkiva i organa. Uporedo sa razvojem metoda za izradu polimernih nanočestica, došlo se i do zahtjeva koje ovi koloidni sistemi danas moraju ispunjavati, kako bi se mogli primjeniti kao nosači lijekova. Prvi zahtjev je bezbjednost, što za ove nosače podrazumjeva da su biokompatibilni, biodegradabilni i netoksični. Potom je važno da imaju odgovarajuću veličinu čestica koja će osigurati mogućnost različitih puteva primjene, visok kapacitet inkapsulacije lijeka i njegovo kontrolisano oslobađanje, tek u ciljnim tkivima. Takođe, zahtjeva se i odgovarajuća difuzija do ciljnih ćelija, kako bi se osigurala biološka distribucija koja će dovesti do ostvarivanja očekivanog terapijskog efekta (93).

Prve rezultate ispitivanja mogućnosti primjene polimernih nanočestica za ciljanu isporuku lijekova u/kroz kožu objavili su Alvarez-Roman i sar. (96). U *in vitro* studijama ovi autori su dokazali ostvarivanje produženog kontakta sa kožom, te značajno poboljšanje penetracije visoko lipofilne molekule oktilmetoksicinamata (OMC) inkorporirane u biodegradabilne PCL-nanočestice. Eksperimenti u kojima je upoređivana antimikrobna efikasnost hlorheksidina inkapsuliranog u PCL-nanokapsule u odnosu na rastvor hlorheksidin-diglukonata, dokazali su odloženo oslobađanje hlorheksidina iz PCL-nanokapsula i poboljšanje antimikrobne aktivnosti ove supstance protiv bakterije *Staphylococcus epidermidis*, usljed produženog kontakta nanonosaa lijeka sa uzročnikom, površinom kože i kožnim folikulama (97). Takođe, dokazana je i transdermalana isporuka minoksidila inkorporiranog u nanokapsule izrađene od diblok kopolimera poli(ϵ -kapolakton)-polietilenglikol. Rezultati *in vitro* istraživanja oslobađanja lijeka, na modelu kože svinje sa i bez dlaka koristeći Franz-ov tip difuzione ćelije, pokazali su poboljšanje penetracije minoksidila u epidermalne slojeve kože sa prisutnim dlakama, ukoliko je lijek inkapsuliran u nanočestice manje veličine (40 nm). S druge strane, veličina nanočestica nije bila ni u kakvoj zavisnosti sa penetracijom minoksidila kroz uzorak kože bez dlaka (98).

Pored pomenutih lijekova, veliki interes za transdermalnu primjenu postoji i za nesteroidne antiinflamatorne lijekove, koji ispoljavaju ozbiljne neželjene efekte kada se primjene oralno ili parenteralno. Osim toga, ovi lijekovi veoma teško penetriraju kroz kožu, te se njihova terapijska koncentracija u ciljnim dubokim subkutanim tkivima teško postiže. Kada se u konvencionalnom farmaceutskom obliku poveća količina lijeka koji se aplikuje na kožu doći će do povećanja njegove koncentracije u ciljnom, ali i ostalim tkivima, što je nepoželjno. Isto tako, hemijski ubrzivači penetracije mogu povećati difuziju lijeka u/kroz kožu, ali povećavaju i njegovu koncentraciju u sistemskoj cirkulaciji, što može da rezultuje pojavom neželjenih efekata (99). Zbog ovih razloga, kao i niza navedenih prednosti, primjena polimernih nanočestica kao nosača za lijekove iz grupe NSAID, predstavlja veoma dobro rješenje za njihovu isporuku u/kroz kožu.

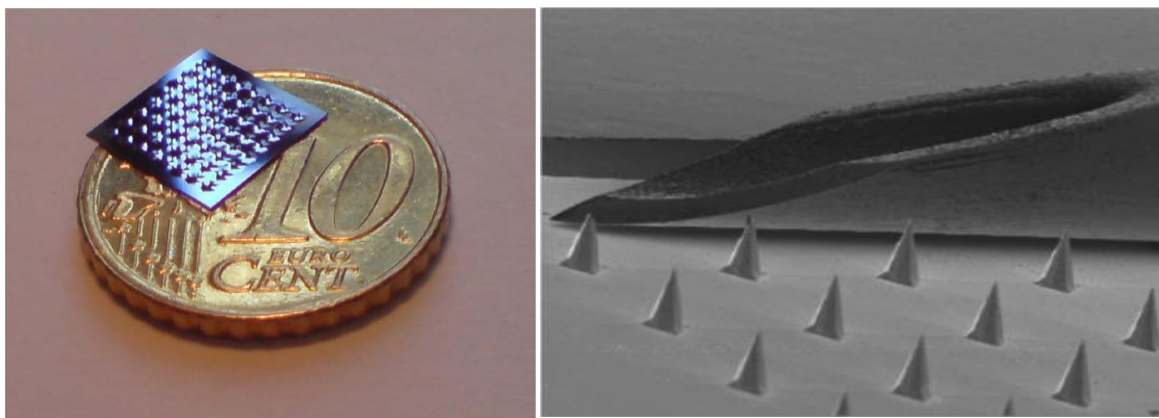
Iako su do sada u literaturi opisane brojne studije o različitim nosačima antiinflamatornih lijekova (liposomi, transfersomi, niosomi, mikročestice, nanočestice kao nosači za ibuprofen, diklofenak, indometacin, flurbiprofen, flufenaminsku kiselinu, ketoprofen, nimesulid) samo nekolicina njih je bila zasnovana na istraživanju primjene polimernih nanočestica za transdermalnu isporuku ovih lijekova (100-102). Luengo i sar. su proučavali uticaj PLGA nanočestica na penetraciju flufenaminske kiseline (FFA) u/kroz kožu (102). Dobijene PLGA nanočestice sa inkorporiranim lijekom su dispergovane u hidrogel podlozi sa hidroksipropilmetilcelulozom (HPMC). Primjena ovako formulisanog preparata na kožu u *in vitro* uslovima, pokazala je značajno poboljšanje transporta FFA u dublje slojeve kože i njegovo odloženo oslobađanje, u poređenju sa slobodnim lijekom rastvorenim u istoj podlozi. Takođe je dokazano da PLGA pokazuje pH uticaj na jonizaciju FFA, tako što kisela sredina smanjuje disocijaciju lijeka i povećava njegovu lipofilnost, a time i bolju penetraciju. Alvez i sar. su u svojoj studiji pokazali poboljšanje penetracije nimesulida u SC kao i u vijabilne slojeve kože, kada je ovaj lijek inkorporiran u PCL-nanonosače, u odnosu na slobodan lijek (100). Takođe, ovim eksperimentom je dokazana zavisnost i uticaj vrste nosača (nanokapsule, nanosfere, nanoemulzije) na penetraciju/permeaciju lijeka u/kroz kožu. Penetracija nanočestica i nanosfera sa nimesulidom iz hidrogelova u SC je bila slična, dok je nimesulid iz nanoemulzija inkorporiranih u hidrogelove, direktno permeirao u dermis, bez zadržavanja u SC. **Ketoprofen** je kao model supstanca poslužila Eerikainen

i sar. koji su ispitivali uticaj različitih polimera i interakcije polimer-lijek na stabilnost dobijenih nanočestica. U svojoj studiji, koristili su Eudragit L, Eudragit RS i Eudragit E, polimere koji su u širokoj upotrebi u farmaceutskoj industriji, za oblaganje/filmovanje tableta koje se raspadaju u želucu ili u duodenumu (103). Mogućnost transdermalne isporuke ketoprofena, do sada je ispitana samo sa transfersomima kao nosačima ovog lijeka. Cevc i sar. su uporedili *in vivo* transport i biodistribuciju ketoprofena primjenjenog na koži iz konvencionalnog gela sa slobodnim lijekom i gela sa transfersomima kao nosačima lijeka, u odnosu na oralni oblik ketoprofena (99). Rezultati ovog istraživanja su pokazali nisku biološku raspoloživost (<10%) i ograničenu selektivnost slobodnog lijeka primjenjenog iz konvencionalnog gela (Gabrilen® gel 2,5%, Kreussler Pharma GmbH, Njemačka). Naime, maksimalna koncentracija ketoprofena u subkutanom tkivu i plazmi postignuta je istovremeno ($t_{max} \sim 3-4$ h), te je njegovo poluvrijeme eliminacije sličano oralno primjenjenom ketoprofenu ($t_{1/2} \sim 2$ h). Nasuprot ovome, transfersomi kao elastični vezikularni nosači ketoprofena, dostavljaju ketoprofen selektivnije (u dublja tkiva) i efektivnije (bioraspoloživost je >50%, a $t_{max} \sim 1$ h), dok je eliminacija lijeka sporija ($t_{1/2} \sim 4-6$ h), zahvaljujući produženom oslobađanju lijeka iz nosača u ciljnom tkivu, ali i sprečavanju lokalnog klirensa od strane mukocilijarnog kapilarnog pleksusa (99). Takođe, povećanje doze lijeka i nosača po površini na koju se aplikuje, poboljšava isporuku ketoprofena u površinske i duboke mišiće ispod mjesta primjene, za razliku od sistemske koncentracije lijeka kada to nije slučaj (99). Dokazano poboljšanje terapije hroničnog bola kod osteoartritisa koljena, kada se kao nosači ketoprofena primjene transfersomi, opisano je i u multicentričnoj randomiziranoj kontrolisanoj studiji u okviru III faze kliničkog ispitivanja (104).

1.3. Mikroigle – savremeni sistemi za isporuku lijekova

Mikroigle predstavljaju čvrste ili šuplje kanile (cjevčice) čija dužina iznosi od 50-900 μm , a spoljašnji dijameter je uglavnom manji od 300 μm (Slika 1-11) (105). Kako bi odgovorili različitim zahtjevima terapije, a u cilju optimizacije stepena ili mjesta isporuke lijeka, mikroigle mogu biti različitog oblika, veličine i gustine po jedinici površine potporne ili adhezivne membrane (106).

Iako su mikroigle prvi put predstavljene još 1976. godine, tehnologija neophodna za izradu igala mikronskih dimenzija postala je dostupna tek početkom ovog vijeka, kada je započela masovna proizvodnja mikroelektičnih sredstava (73, 107). Prvi eksperimentalni rad o mikroiglama objavio je Hashimi sa saradnicima 1995. godine. Mikroigle korištene u ovom radu dobijene su tehnikom graviranja iz silikonskih pločica i korištene su za intracelularnu isporuku kalceina u *in vitro* uslovima (108). Rezultati ove *in vitro* studije su pokazali da mikroigle dužine 150 μm povećavaju permeabilnost kože za ispitivanu model supstancu i do četiri puta više (109).



Slika 1-11. Veličina mikroigala u poređenju sa: (a) kovanicom, i (b) hipodermalnom iglom.

(106)

Nakon što je uspješnost mikroigala u isporuci lijeka potvrđena, Kaushik je 2001. godine dokazao i potpuno bezbolnu primjenu mikroigala na ljudima (110). Naime, mikroigle za transdermalnu primjenu su dizajnirane tako da, stvarajući pore mikronskih dimenzija u SC-u, penetriraju kroz epidermis do dubine od 70-200 μm , pri čemu ne dopiru do nervnih završetaka u dermisu. Na ovaj način obezbjeđena je potpuno bezbolna primjena, što je jedna od osnovnih prednosti mikroigala u poređenju sa potkožnim iglama (111, 112). Pored bezbolne primjene, mikroigle imaju i niz drugih prednosti u poređenju sa drugim metodama za isporuku lijeka kroz kožu zbog čega se smatraju mnogo naprednijim i efikasnijim sistemima za poboljšanje transdermalnog transporta lijekovitih supstanci. Za razliku od konvencionalnih transdermalnih flastera, mikroigle imaju mogućnost da potpomognu isporuku lijekova koji ne podliježu pasivnoj

difuziji kroz SC i veličina molekule lijeka ne predstavlja ograničavajući faktor za primjenu mikroigala.

Tabela 1-5. Prednosti i nedostaci primjene mikroigala. (113)

Prednosti	Nedostaci
Ciljana isporuka malih molekula, makromolekula, vakcina, nukleinskih kiselina direktno u epidermis/dermis	Mogućnost lokalne inflamacija u slučaju prisustva visokih koncentracija lijeka u koži
Mogućnost kontrolisane isporuke lijeka	Mogućnost iritacija kože
Smanjenje učestalosti doziranja	Tehnika aplikacije
Izbjegavanje prvog prolaska kroz jetru i prolaska lijeka kroz gastrointestinalni trakt	Lomljenje vrha igle unutar kože
Neinvazivna i bezbolna primjena	Slabija preciznost doziranja u poređenju sa konvencionalnim iglama
Samoliječenje	Varijabilnost dubine penetracije u zavisnosti od individualnih razlika u debljini kože
Smanjena mogućnost povrede u poređenju sa konvencionalnim iglama	
Smanjenje skladištenja biološkog otpada	
Mogućnost kombinovane primjene sa drugim farmaceutskim oblicima, kao i drugim metodama za transdermalnu isporuku lijeka	
Mogućnost primjene različitog materijala za izradu – isplativa proizvodnja velikog obima	
Smanjenje troškova proizvodnje i distribucije	

Prednosti formulacije i primjene mikroigala su i ciljana isporuka lijeka u specifična tkiva kože, potencijalno smanjenje doze kao rezultat poboljšane efikasnosti lijeka, veoma dobra podnošljivost bez dugoročnog edema ili eritema, kao i efikasnija kontrola stepena isporuke ljekovite supstance u poređenju sa isporukom lijekova kroz SC. Tako na primjer, mikroigle pružaju mogućnost ciljane isporuke vakcina u

epidermalne ćelije koje učestvuju u imunom odgovoru (Langerhansove ćelije i dermalne dendritne ćelije), te se obezbjeđuje primjena manjih doza u poređenju sa intramuskularnom ili subkutanom injekcijom (106). Uz brojne prednosti, u Tabeli 1-5 prikazani su i neki nedostaci ovih sistema, od kojih je svakako najvažniji slabija preciznost doziranja u poređenju sa potkožnim iglama, kao i varijabilnost dubine penetracije koja zavisi od individualnih razlika u debljini SC-a i drugih slojeva kože (73). Takođe, važno je napomenuti da koža ipak predstavlja barijeru za mikroigle, ali više u pogledu mehaničkih svojstava nego sa aspekta intercelularne ili hemijske strukture kože. Iako je struktura kože veoma fleksibilna, otpor penetraciji mikroigala ipak postoji, isto kao i prema svim drugim stranim objektima mikronskih dimenzija.

1.3.1. Metode za izradu mikroigala

Osnovni kriterijumi na kojima se zasniva izbor materijala za izradu mikroigala su da se obezbjedi proizvodnja koja neće uticati na osjetljive i nestabilne biomolekule, željeno kontrolisano ili trenutno oslobađanje lijeka, kao i zadovoljavajuća mehanička jačina za penetraciju u kožu (73). Za proizvodnju mikroigala, koriste se različiti materijali kao što su silikon, metali, degradabilni ili nedegradabilni polimeri (Tabela 1-6) (114). Metalne mikroigle su lako lomljive, skupe i nisu biodegradabilne. Mikroigle na bazi polimera nemaju ove nedostatke, rastvorljive su i odlikuju se nižom cijenom proizvodnje i većom sigurnošću primjene u slučaju lomljenja vrha ili većeg dijela igle nakon penetracije u kožu (115).

Izrada čvrstih i šupljih mikroigala ili kalupa za proizvodnju rastvorljivih mikroigala podrazumjeva primjenu mikroelektričnih mehaničkih sistema (MEMS) o kojima je bilo riječi u uvodnom poglavlju. Sam proces proizvodnje se uglavnom sastoji iz 3 osnovna koraka: nanošenje, kalupljenje i graviranje. Nanošenje (eng. *deposition*) podrazumjeva formiranje tankog filma debljine između nekoliko nanometara i 100 mikrometara. Kalupljenje (eng. *patterning*) se odnosi na prenošenje kalupa na formirani film korišćenjem jedne od litografskih metoda (fotolitografija, litografija elektronskim snopom, litografija mikroskopijom atomske sile, itd), dok je graviranje (eng. *etching*) proces primjene jake kiseline ili kaustičnog sredstva sa ciljem urezivanja i formiranja dizajna na površini materijala pri čemu se razlikuje vlažno i suho graviranje. Primjena svakog koraka u procesu proizvodnje u velikoj mjeri zavisi od materijala i tipa mikroigala (73).

Tabela 1-6. Materijali i metode za izradu mikroigala. (73)

Materijali	Sintetski polimeri		Prirodni polimeri
	Biodegradabilni	Ne – biodegradabilni	
Silikon	PLA	PVA	CMC
Nerđajući čelik	PGA	Carbopol [®] 971 P-NF	Amilopektin
Titanijum	PLGA	Gantrez [®] AN-139 (PMVE/MA kopolimer)	Termoplaastični skrob
Mezoporozni silikon	Polikarbonati	Polieterimid	Dekstran, galaktoza, i hondroitin sulfat
		PVP	Maltoza

PLA–polilaktid. PGA–poliglikolid. PLGA–polilaktid-ko-glikolid. PVP–polivinilpirolidon. PVA–polivinilacetat. PMVE/MA–metilvinileter/anhidrid maleinske kiseline. CMC–karboksimetilceluloza

Kada je riječ o formulaciji rastvorljivih mikroigala, postoji nekoliko različitih pristupa koji uglavnom podrazumjevaju primjenu sile, poput pritiska, centrifuge, vakuuma ili kombinacije ovih procesa, koja je neophodna da bi se obezbijedilo potpuno punjenje mikropora matrice (116, 117). Park i sar. su formulisali mikroigle od biodegradabilnog polimera koristeći pri tome kalupe od SU-8-epoksi smole ili poliuretana (115). Pelete biodegradabilnog polimera su bile posute na kalupe različitog oblika, nakon čega je pod uticajem visoke temperature došlo prvo do topljenja polimera, koji je potom primjenom vakuuma ispunjavao šupljine kalupa. U posljednjem koraku, proces smrzavanja je korišćen za odvajanje dobijenog niza mikroigala od kalupa. Donelly i sar. su za proizvodnju rastvorljivih mikroigala koristili silikonske kalupe, dobijene tehnikom laserskog mikro-graviranja, koje su potom punili vodenim rastvorom polimera (105). Ostale tehnike dobijanja rastvorljivih mikroigala podrazumjevaju izlivanje, ubrizgavanje ili utiskivanje rastvorenih ili otopljenih tečnih formulacija polimera (PVA, PVP, PLGA, PLA, CMC) i/ili šećera (maltoza, trehaloza, saharoza) (73, 105). Međutim, procesi otapanja polimera podrazumjevaju primjenu visokih temperatura koje nisu pogodne za mnoge ljekovite supstance.

Najnovija istraživanja na polju formulacije rastvorljivih mikroigala rađena sa derivatima celuloze (hidroksipropilmetilceluloza - HPMC i karboksimetilceluloza - CMC) dokazala su uspješnu primjenu **tehnike atomizacije tečnog uzorka** odnosno

obrazovanja raspršene tečnosti (spreja) za oblaganje čvrstih silikonskih mikroigala (118). Međutim, još uvijek nisu vršena istraživanja primjene ove tehnike za dobijanje rastvorljivih mikroigala koristeći formulacije ljekovitih supstanci ili nanočestica sa inkapsuliranim ljekovitim supstancama, što može biti inovativan pristup formulaciji transdermalnih sistema za kontrolisanu isporuku lijeka.

1.3.2. Vrste mikroigala i mehanizmi isporuke lijeka

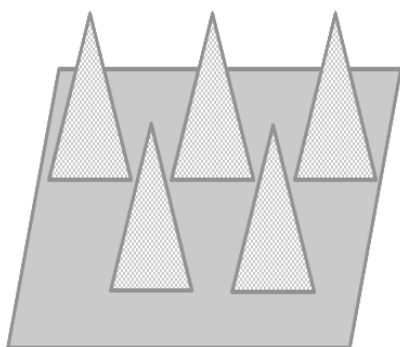
Uopšteno, sve mikroigle se mogu podijeliti na čvrste mikroigle, koje stvaraju prolazne mikropore u SC-u, i šuplje mikroigle, sa uskom kapilaram preko koje se ljekovite supstance mogu direktno ubrizgati u kožu. Formulacije ljekovitih supstanci, u obliku tečnih ili polučvrstih farmaceutskih oblika, mogu jednostavno biti primjenjene prije ili poslije same upotrebe čvrstih mikroigala, mogu biti nanešene u formi obloge na površinu čvrstih mikroigala (eng. *coated microneedles*), ili oblikovane u mikroigle koje se rastvaraju nakon aplikacije na kožu (eng. *dissolvable microneedles*, DMN) (119). Slika 1-12 daje shematski prikaz različitih tipova mikroigala.

U početnim fazama istraživanja, čvrste mikroigle su korištene kako bi se formiranjem pora u SC-u, premostila ova barijera i omogućila intradermalna ili transdermalna isporuka lijeka primjenom nekog drugog farmaceutskog oblika (krem, mast, gel, emulzije za primjenu na koži, transdermalni flasteri) (Slika 1-13.a). Ovaj pristup, u literaturi označen kao *'poke and patch'*, koristio se i kao neinvazivan metod za ekstrakciju intersticijalnog fluida sa ciljem mjerenja nivoa glukoze (120). Drugi pristup primjene čvrstih mikroigala, označen kao *'coat and poke'*, podrazumjeva nanošenje rastvora ljekovite supstance u vidu filma ili obloge na površinu mikroigala (eng. *dip-coating*), pri čemu se lijek oslobađa tek u određenom sloju kože nakon penetracije mikroigala u kožu (Slika 1-13.b). Treći pristup predstavljaju rastvorljive mikroigle, koje se sastoje isključivo od polimera i/ili šećera, a poslije primjene i rastvaranja u koži oslobađaju ljekovitu supstancu – *'poke and release'* pristup (Slika 1-13.c). Poslednji pristup prikazan je na Slici 1-13.d i odnosi se na isporuku tečnih preparata lijeka pomoću šupljih mikroigala – *'poke and flow'* (73).

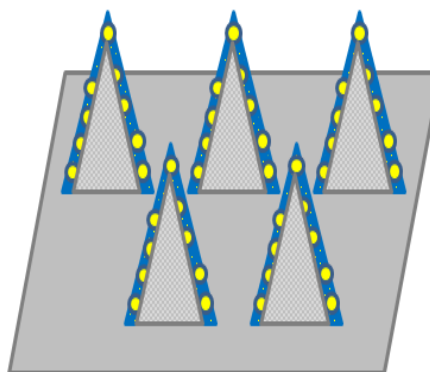
Od svih predstavljenih pristupa, rastvorljive mikroigle danas zaokupljaju najveću pažnju istraživača, prije svega jer se izrađuju od biodegradabilnih materijala. Naime, primjenom rastvorljivih mikroigala omogućena je dermalna isporuka isključivo lijeka ili formulacije ljekovite supstance bez prisustva rizičnih supstanci (npr. metal),

čime se rješava problem skupog skladištenja biokontaminiranog, nedegradabilnog otpada. Osim toga, materijali poput polusintetskih i sintetskih polimera i ugljenih hidrata smanjuju troškove izrade mikroigala i pružaju mogućnost modifikovanja vremena oslobađanja lijeka. Dodatno, u slučaju eventualnog lomljenja mikroigle u koži, nema opasnosti od infekcije i drugih komplikacija kao u slučaju mikroigala izrađenih od neorganskog materijala (106).

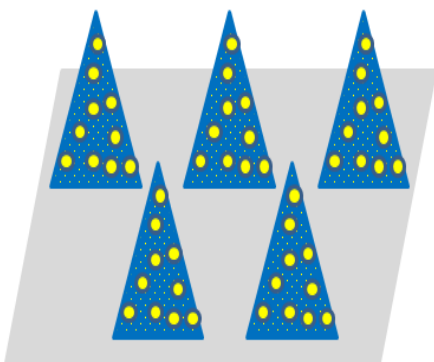
(a)



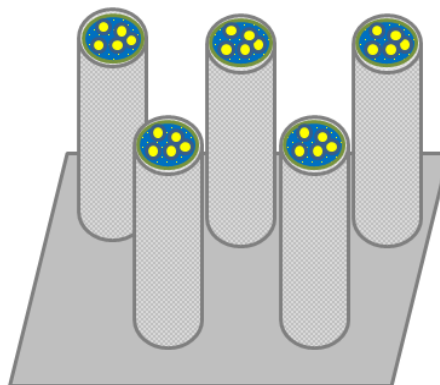
(b)



(c)



(d)

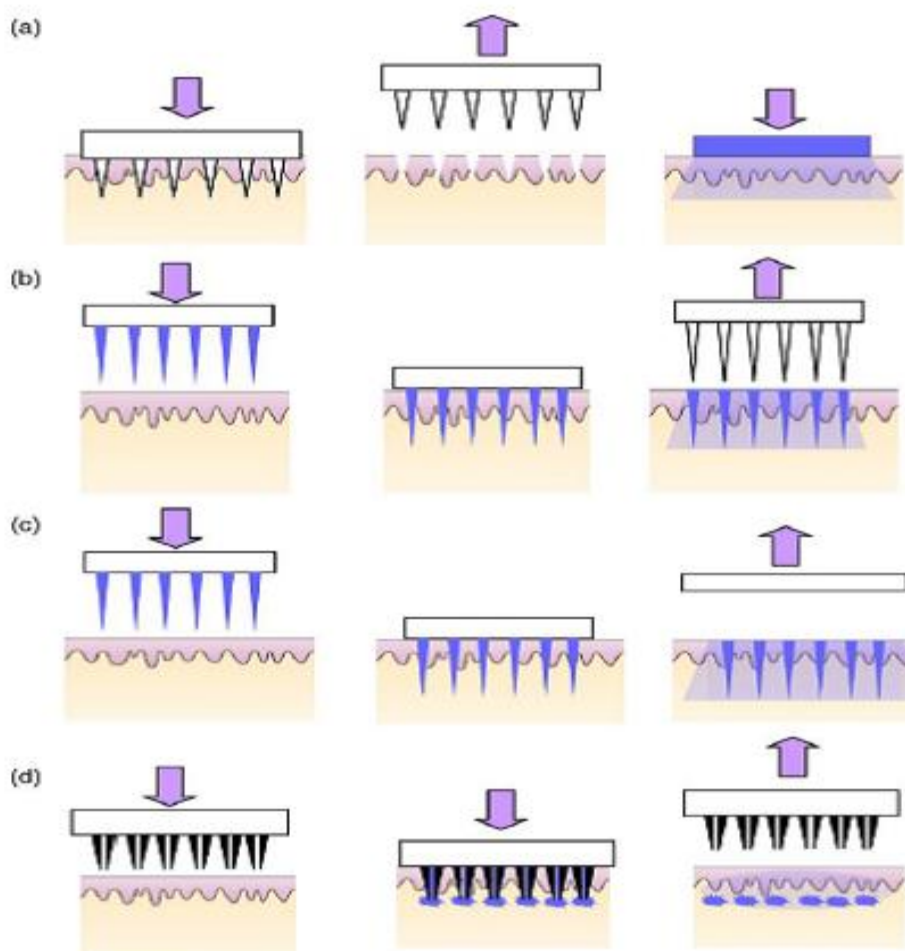


Slika 1-12. Shematski prikaz različitih tipova mikroigala: (a) neobložene mikroigle, (b) obložene mikroigle, (c) rastvorljive mikroigle, i (d) šuplje mikroigle.

Studija koju su objavili Miyano i sar. prikazuje sve prednosti i nedostatke rastvorljivih mikroigala izrađenih od šećera (121). U ovim eksperimentima korišćena je maltoza, koja kao prirodni šećer, osim biokompatibilnosti može imati i ulogu

stabilizacije ljekovitih supstanci za isporuku (npr. proteini), koje su inkapsulirane u mikroigle. Koncept ove studije je bio da se nakon aplikacije mikroigala, osnova njihovog potpornog sloja/membrane/platforme (eng. *backing layer*) ukloni sa kože, a same mikroigle ostanu unutar kože sa ciljem oslobađanja lijeka. *In vivo* eksperimenti su pokazali da ovakav koncept primjene mikroigala ne uzrokuje senzaciju bola, ne dovodi do pojave kontaktnog dermatitisa, odn. daje negativan rezultat prema ICDRG skali (eng. *International Contact Dermatitis Research Group*), i da se mikroigle rastvaraju samo 5 minuta nakon aplikacije na kožu. Takođe, pokazano je da relativna vlažnost vazduha od 50% dovodi do rastvaranja ovih mikroigala. Osim toga, Miyano i sar. su u ovoj studiji pokazali i da sadržaj lijeka veći od 10 % dovodi do negativnog uticaja na mehaničku jačinu dobijenih mikroigala (121). Stoga su povećan rizik osjetljivosti na vlagu, smanjenje mehaničke jačine, a time i zahtjevi za ograničene uslove skladištenja prepoznati kao glavni nedostaci rastvorljivih mikroigala izrađenih od šećera.

Iako rastvorljive mikroigle pružaju mogućnosti primjene većeg sadržaja lijeka u odnosu na ostale čvrste mikroigle, tek je razvoj šupljih mikroigala dao mogućnost primjene velikih (terapijskih) doza lijeka (Slika 1-13.d). Nakon primjene na kožu, šuplje mikroigle omogućavaju proticanje ljekovite supstance iz rezervoara i njeno oslobađanje u određenim slojevima kože, pri čemu mjesto oslobađanja zavisi od dužine mikroigala i pora koje nastaju nakon njihove primjene na koži (122, 123). Ovakav koncept vrlo je sličan primjeni/isporuci lijekova putem konvencionalnih hipodermalnih igala. Međutim, šuplje mikroigle veličine manje od 1 mm, nemaju brojne nedostatke hipodermalnih igala, koji su već navedeni u Tabeli 1-5. Osim toga, ovaj tip mikroigala omogućava isporuku većih količina lijeka na planirano/ciljano mjesto, a takođe pruža i veću sigurnost u slučaju isporuke cjelokupnog sadržaja inkorporiranog lijeka. Protok tečnog sadržaja šupljih mikroigala u kožu mora biti nizak (obično 10-100 $\mu\text{l}/\text{min}$) kako bi se izbjegao povratni pritisak od strane gustih tkiva kože. Jedan od načina smanjenja otpora proticanju tečnog preparata lijeka iz šupljih mikroigala je povećanje gustine mikroigala po jedinici površine potpornog sloja (119). Kod šupljih mikroigala koje imaju otvor na vrhu može doći do njihovog začepljenja nakon penetracije u kožu. Kako bi se prevazišao ovaj nedostatak, dizajnirane su mikroigle sa otvorima sa strane (119). Ovim je još jednom dizajn mikroigala prepoznat kao najvažniji faktor uticaja na uspješnu isporuku lijeka u/kroz kožu.



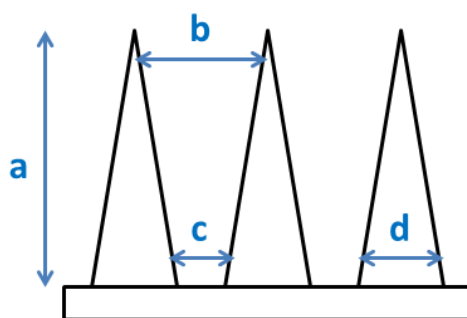
Slika 1-13. Pristupi isporuke lijeka primjenom mikroigala različitog dizajna: (a) *'poke and patch'* pristup pomoću čvrstih mikroigala, (b) *'coat and poke'* pristup pomoću obloženih čvrstih mikroigala, (c) *'poke and release'* pristup pomoću rastvorljivih mikroigala, (d) *'poke and flow'* pristup pomoću šupljih mikroigala. (73)

1.3.3. Faktori koji utiču na penetraciju mikroigala u kožu

Svi pristupi primjene mikroigala opisani u prethodnom poglavlju mogu se koristiti kako za intradermalnu (lokalnu) tako i za transdermalnu (sistemsku) isporuku lijeka. Međutim, za postizanje efikasne isporuke lijeka u/kroz kožu i uspješnog terapijskog odgovora, kritični faktori su geometrija mikroigala i način aplikacije.

Geometrija mikroigala podrazmjeva njihovu dužinu, oblik, površinu vrha, odnos širine i visine mikroigle (eng. *aspect ratio*), gustinu po jedinici površine potporne membrane kao i međusobno rastojanje između mikroigala (Slika 1-14). Svi pobrojani parametri značajno utiču na uspješnost penetracije mikroigala u kožu. Davis i sar.su u

svom radu naveli podatke da se sa povećanjem površine vrha mikroigle povećava i sila koja je potrebna za uspješnu penetraciju u kožu (124). Sa aspekta uspješne i sigurne primjene mikroigala, veoma je važno da ne dođe do lomljenja ili savijanja mikroigala, nakon što dodju u kontakt sa otporom određenih slojeva kože (106). Prilikom aplikacije, jačina pritiska na svaku individualnu mikroiglu zavisi od broja igala po jedinici površine potporne membrane. Najznačajniji faktor koji utiče na sposobnost mikroigle da podnese silu prilitiska predstavljaju mehaničke osobine mikroigala, koje su uslovljene metodom proizvodnje, dužinom igle i čvrstinom materijala upotrebljenog za izradu. U prilog zapažanjima Davis i sar, druga studija koju su objavili Teo i sar. takođe je pokazala da je primjena oštrijih mikroigala rezultirala mnogo uspješnijom isporukom lijeka u poređenju sa mikroiglama ravnih ivica i vrha (125). Park i sar. su u svojim eksperimentima pokazali da je sila lomljenja (eng. *failure force*) polimernih mikroigala direktno proporcionalna Young-ovom modulu materijala i prečniku baze mikroigle, a obrnuto proporcionalna njenoj dužini. Ovim je potvrđeno da izbor materijala za izradu mikroigala predstavlja najznačajniji faktor uticaja na njihovu mehaničku jačinu (115).



Aspect ratio = a/d

Slika 1-14. Shematski prikaz niza mikroigala i njihovih geometrijskih osobina: a – dužina mikroigle, b – rastojanje između vrhova mikroigala, c – rastojanje između baza mikroigala, d – širina baze mikroigle.

Dužina mikroigala je važna i sa aspekta isporuke ljekovite supstance u ciljane slojeve kože. Smatra se da mikroigle dužina do 200 μm mogu uspješno dostaviti ljekovitu supstancu u vijabilni epidermis. Ukoliko je ciljano mjesto oslobađanja i djelovanja lijeka dermis, preporučuje se primjena dužih mikroigala (119). Međutim, kada se govori o primjeni mikroigala, potrebno je naglasiti razliku između njihove

dužine i dubine penetracije u kožu. Zbog elastičnih osobina koje koža posjeduje, prvo dolazi do određenih deformacija kože prije nego što mikroigle penetriraju i formiraju mikropore u koži. Usljed toga, dubina penetracije je uglavnom manja od dužine mikroigle (126). Studija koja je obuhvatala 18 ispitanika pokazala je da se transepidermalni gubitak vode (eng. *Transepidermal Water Loss*, TEWL), crvenilo i protok krvi povećavaju sa povećanjem dužine čvrstih i šupljih mikroigala od 200-500 μm . Zajedničko za sve veličine mikroigala korištenih u ovoj studiji, bila je bezbolna primjena i nestanak iritacije najkasnije 2 sata nakon primjene.

Na dubinu penetracije utiču još i rastojanje između mikroigala u nizu, kao i način aplikacije. Naime, ako se individualne mikroigale u nizu nalaze na malom rastojanju, pritisak upotrebljen za njihovu aplikaciju se raspoređuje na veliki broj mikroigala i postaje nedovoljan za uspješnu penetraciju u kožu (119). Smatra se da teorijski pritisak potreban za stvaranje pora u koži nakon primjene mikroigala iznosi 3.183×10^6 Pa, odnosno da (u zavisnosti od dizajna i geometrije mikroigala) sila potrebna za penetraciju niza mikroigala površine 1 cm^2 iznosi od 0,1-3 N, što je dovoljno za manuelnu aplikaciju (109, 119, 127). Ipak, za kratke mikroigle ($< 200 \mu\text{m}$) neophodna je primjena aplikatora kako bi se zahvaljujući odgovarajućoj kinetici aplikovanja, obezbjedila uspješna penetracija mikroigala.

1.3.4. Primjena mikroigala za intradermalnu i transdermalnu isporuku lijeka

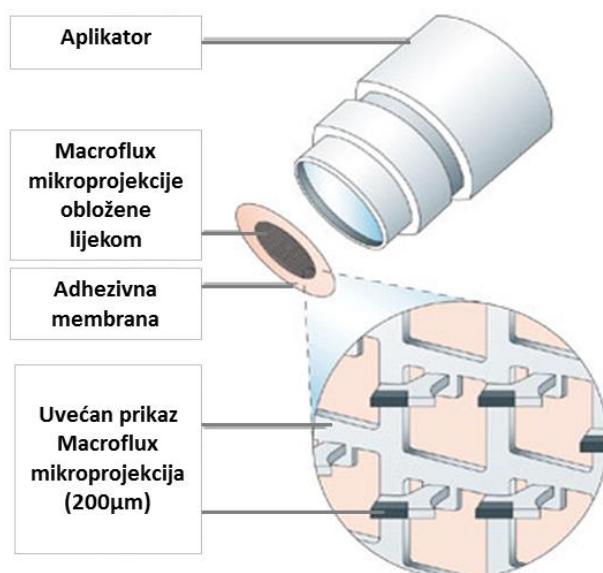
U literaturi su opisani brojni sistemi koji kombinuju različite aplikatore mikroigala sa formulacijom lijeka za isporuku. U nekim od ovih sistema, formulacija lijekovite supstance se nanosi nakon primjene mikroigala, dok su u drugim formulacija i aplikator dio iste jedinice sistema. Donnelly je postigao uspješniju transdermalnu isporuku 5-aminolevullinske kiseline u bioadhezivnom flasteru, primjenjenom na kožu koja je prethodno tretirana mikroiglama (128). U drugim studijama, korišćen je roler sa mikroiglama izrađenim od karboksimetilceluloze i polilaktida, pomoću kojeg je smanjena sila potrebna za aplikaciju (129). Sama lijekovita supstanca može biti inkorporirana u polimerni matriks ili u sam roler.



Slika 1-15. BD Soluvia™ - sistem za transdermalnu isporuku influenza vakcine upotrebom šuplje mikroigle. (130)

Još jedan primjer su *in vivo* studije na miševima izvedene 2007. godine od strane Alarcon i sar. koji su koristili mikroinjekcioni sistem sa šupljom mikroiglom proizvođača BD (*Becton Dickinson*) za isporuku vakcine protiv virusa influence (131). BD Soluvia™ sistem je prvi intradermalni sistem ovog tipa, koji je odobren za stavljanje u promet od strane Evropske komisije i Evropske agencije za lijekove (EMA) (132, 133). Sistem sadrži mikroiglu dužine 1.5 mm sa injektabilnom zapreminom od 0,1 ml i, za razliku od većine konvencionalnih vakcina koje se aplikuju u mišić, omogućava preciznu isporuku vakcine unutar dermisa, čime je obezbeđen direktan pristup imunom sistemu (Slika 1-15) (130). Još jedan BD proizvod je Onvax™, sistem mikroigala dužina 200 μm koji je dizajniran sa ciljem mikroabrazije kože odnosno narušavanja barijere SC-a i isporuke vakcina (133). U drugim studijama, Matriano i sar. su ispitivali efikasnost Macroflux® tehnologije (Zosano Pharma) za isporuku ovalbumina, koji je u vidu filma bio nanošen na mikrostrukture sa polietilenskom osnovom na adhezivnoj membrani (Slika 1-16). U ovoj studiji praćen je uticaj različitih faktora na količinu isporučenog antigena, poput vrste formulacije korišćene za oblaganje mikrostrukture, dubine njihove penetracije, vremena aplikacije sistema na koži i veličine sistema (134). Istu tehnologiju u kombinaciji sa jontoforezom, koristio je i Lin sa saradnicima za isporuku antisens oligonukleotida (135). Drugi proizvod, koji je zasnovan na originalnoj Macroflux® tehnologiji, je sistem za isporuku paratireoidnog hormona (ZP-PTH patch, zaštićena tehnologija-patent, Zosano-Pharma, SAD). Ovaj sistem, koji je trenutno u trećoj fazi kliničkih ispitivanja, sastoji se iz

adhezivne membrane sa mikrostrukturama od titana obloženih formulacijom paratireoidnog hormona i primjenjuje se pomoću odgovarajućeg aplikatora (Slika 1-17). Jedna od glavnih prednosti ovog proizvoda jeste poboljšana stabilnost formulacije na sobnoj temperaturi, za razliku od trenutno dostupnih rastvora za injekcije ovog hormona koji se čuvaju isključivo u frižideru. ZP-PTH flaster predstavlja trenutno najsavremeniji sistem kada je riječ o obloženim čvrstim mikroiglama, i njegovom primjenom bi se mogli otkloniti svi nedostaci postojećih tečnih formulacija (nestabilnost tečnih formulacija i degradacija ljekovite supstance, uslovi skladištenja, ekonomičnost distribucije) (136).



Slika 1-16. Macroflux metalne mikroprojekcije obložene lijekom sa ugrađenim adhezivnim flasterom. (134)

Osim BD i Zosano Pharma, i mnoge druge industrije (3M, Nanopass, Valeritas, Tetrajt), istraživački centri i akademske grupe poput Tehnološkog instituta u Georgia (SAD) i Massachusetts (SAD) i Tyndall instituta u Irskoj, intenzivno istražuju mogućnost komercijalizacije tehnologije mikroigala za isporuku lijekova, prvenstveno vakcina. Proizvodi koje se trenutno nalaze na tržištu ili su u fazi kliničkih ili prekliničkih ispitivanja prikazani su u Tabeli 1-7 .



Slika 1-17. Sistem za isporuku paratiroidnog hormona pomoću aplikatora za višekratnu upotrebu proizvođača Zosano-Pharma (ZP PTH patch). (136)

Tabela 1-7. Sistemi mikroigala koje se trenutno nalaze na tržištu ili su u fazi kliničkih ili prekliničkih ispitivanja. (119)

Proizvođač	Tehnologija/proizvod
Apogee Technology	Pyraderm TM
Corium	MicroCor TM
DermaRoller	DermaRoller [®]
Elegaphy	Rastvorljive mikroigle
Kumetrix	Silikonske mikroigle
NanoPass Technologies	MicronJet šuplja igla; MicroPyramid platform čvrstih mikroigala
TheraJect	TheraJectMAT i VaxMAT – rastvorljive mikroigle
Valeritas	Micro-Trans TM
Zeopane	Šuplje mikroigle
Zosano Pharma	Macroflux [®] tehnologija
3M	sMTS – čvrsti mikrostrukturirani transdermalni sistemi; hMTS – šuplji mikrostrukturirani transdermalni sistemi
Debiotech	Nanoject – šuplje mikroigle
Becton Dickinson	Soluvia TM
TransDerm	Rastvorljive PVA mikroigle

Sve veći istraživački interes na polju razvoja mikroigala kao savremenih sistema za transdermalnu isporuku lijeka danas je usmjeren na rastvorljive mikroigle, čije su osnovne karakteristike i brojne prednosti detaljno opisane u okviru poglavlja 1.3.2. Još jedna od izuzetnih mogućnosti koje rastvorljive mikroigle pružaju jeste inkorporiranje lijeka samo u vrh mikroigle, u njihovu bazu ili u potpornu membranu niza mikroigala. Različit dizajn rastvorljivih mikroigala pruža mogućnost modifikovanja vremena

oslobađanja lijeka (npr. primjena polimera različite brzine degradacije) ili istovremene primjene različitih ljekovitih susptanci koje se koriste u kombinovanoj terapiji.

1.3.5. Bezbjednost primjene mikroigala

Prednosti i mogućnosti koje primjena mikroigala pruža u savremenom pristupu terapiji su brojne i već objašnjene na početku ovog poglavlja. Međutim, uz efikasnost svakog novog sistema koji se uvodi u terapiju, veoma je važno obezbjediti i bezbjednost njegove primjene. Kad je riječ o mikoriglama, već su izvedene mnoge studije na životinjama i ljudima, u toku kojih nisu zapaženi značajni neželjeni efekti.

Bezbjednost primjene silikonskih mikroigala (180-200 μm) proizvedenih u Tyndall institutu na Univerzitetu u Cork-u (Irska), ispitivali su Haq i sar. u kliničkoj studiji sprovedenoj na 12 dobrovoljaca. Rezultati ove studije pokazali su da je postignuta bolja penetracija kada su mikroigle aplikovane rotirajućim pokretima u poređenju sa jednokratnim pritiskom na kožu. 24 sata nakon primjene mikroigala, formirani mikrokanali u koži su se zatvorili, a isto vrijeme je bilo potrebno da se povećane vrijednosti transepidermalnog gubitka vode zabilježene neposredno nakon aplikacije, vrate na početno stanje. Samu penetraciju mikroigala ispitanici su opisali više kao osjećaj pritiska na kožu nego bol (137). Mikroigle dužih dimenzija (>500 μm) mogu izazvati bol i oštećenje kože budući da dosežu do dermisa i dolaze u kontakt sa krvnim sudovima i nervnim završecima. Međutim, u poređenju sa konvencionalnim hipodermalnim iglama, ove mikroigle su ipak manjih dimenzija, te se bol, oštećenja kože i eventualno krvarenje javljaju u daleko manjem obimu (137, 138). U Tabeli 1-8 prikazane su neke od studija bezbjednosti primjene mikroigala na ljudima.

Iako je broj objavljenih studija o bezbjednosti mikroigala relativno mali, nije zabilježena potencijalna permeacija mikroorganizama u vijabilni epidermis kroz mikropore formirane u koži nakon primjene mikroigala. Međutim, Donnelly i sar. su u svojoj studiji ukazali na mogućnost prolaska mikroorganizama, kao što su *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus epidermidis*, kroz mikrokanale u SC-u. Ipak, isti autori smatraju da je rizik od infekcije na ovaj način mnogo manji od rizika nakon primjene hipodermalne igle i ukazuju da se bezbjednost može osigurati izradom sterilnih mikroigala ili upotrebom rastvorljivih mikroigala (139, 140).

Tabela 1-8. Neki primjeri *in vivo* studija bezbjednosti primjene mikroigala.

Vrsta mikroigle	Metoda	Rezultat	Referenca
150 μm , čvrste	12 zdravih dobrovoljaca, oba pola, starosti od 18-40 godina	bezbolna primjena, bez oštećenja ili iritacije kože	(110)
400 μm , čvrste	18 zdravih dobrovoljaca, oba pola, starosti od 21-30 godina	kratkotrajna iritacija (<2h), bezbolna primjena, povećane vrijednosti TEWL i pojava eritema na koži	(141)
200 μm , čvrste		kratkotrajna iritacija (<2h), bezbolna primjena, bez pojave eritema na koži	
200 μm , šuplje	Primjena metil-nikotinata na 11 zdravih dobrovoljaca	bezbolna primjena uz osjećaj pritiska	(142)
180 μm , silikonske čvrste	Procjena osjećaja boli na VAS skali (Visual Analog Scale) od 0-100 cm na 12 zdravih dobrovoljaca	bezbolna primjena uz osjećaj pritiska, VAS ~0,25	(137)
280 μm , silikonske čvrste		bezbolna primjena uz osjećaj pritiska, VAS ~0,60 cm	
25-G hipodermalna igla		osjećaj uboda, VAS~1.25 cm	
620 μm , čvrste	Ispitivanje koncentracije naltreksona u plazmi nakon primjene na kožu prethodno tretiranu mikroiglama	brza resorpcija lijeka u prvih nekoliko sati nakon aplikacije (1.6-8.1 ng/ml), a potom stanje ravnoteže u naredna 72 h (~2.5 ng/ml)	(143)

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj ovog rada je formulacija i sveobuhvatna fizičko-hemijska, farmaceutsko-tehnološka i biofarmaceutska karakterizacija polimernih nanočestica sa inkapsuliranim lijekom i rastvorljivih mikroigala za kontrolisanu transdermalnu isporuku ketoprofena. Ovaj osnovni cilj moguće je ostvariti kroz jasno definisane specifične ciljeve, koji su podijeljeni u tri cjeline.

U okviru prve cjeline, koja se odnosi na formulaciju i karakterizaciju polimernih nanočestica sa inkapsuliranim ketoprofenom, postavljeni su sljedeći specifični ciljevi:

- Optimizacija metode za efikasnu inkapsulaciju ketoprofena u PDLLA nanočestice u cilju dobijanja uniformne raspodjele veličina i oblika čestica nosača lijeka.
- Ispitivanje uticaja inkapsulacije lijeka na morfološke i površinske karakteristike dobijenih polimernih nosača nano-veličina.
- Fizičko-hemijska karakterizacija dobijenih polimernih nanočestica, koja će pored određivanja sadržaja lijeka, efikasnosti inkapsulacije, površinskih karakteristika i raspodjele veličine čestica, obuhvatiti i metode strukturne i termičke karakterizacije.
- Praćenje procesa degradacije polimernog nosača i ispitivanje mogućnosti kontrolisanog oslobađanja ketoprofena iz polimernih nanočestičnih sistema u *in vitro* uslovima.
- Ispitivanje stabilnosti odabranih polaznih uzoraka polimernih nanočestica sa inkapsuliranim lijekom pod kontrolisanim uslovima dugotrajnog čuvanja lijeka i uslovima ubrzanog starenja (povišena temperatura i vlažnost vazduha).

Druga cjelina obuhvata izradu rastvorljivih mikroigala za transdermalnu isporuku model supstance, i biće ostvarena kroz sljedeće specifične ciljeve:

- Ispitivanje mogućnosti primjene metode atomizacije i raspršivanja tečnosti za izradu čvrstih rastvorljivih mikroigala sa lijekom inkapsuliranim u polimerne nanočestice, kao i karakterizacija dobijenih rastvorljivih mikroigala.
- Studije stabilnosti rastvorljivih mikroigala kao konačnih formulacija za primjenu na koži, u okviru kojih će se pratiti fizička stabilnost mikroigala, ujednačenost sadržaja inkapsuliranog lijeka kao i njegova hemijska stabilnost.

Treća cjelina rada odnosi se na *ex vivo* studije intradermalne/transdermalne isporuke ketoprofena iz polaznih uzoraka polimernih nanočestica i konačnih formulacija rastvorljivih mikroigala na uzorcima kože svinje. U okviru ove cjeline, postavljeni ciljevi su:

- Ispitivanje penetracije/permeacije lijeka iz različitih formulacija nosača i mogućnosti poboljšanja fluksa lijeka kroz kožu, kombinovanom primjenom dva različita pristupa optimizacije isporuke lijeka u/kroz kožu – mikroigle i koloidni nosači.
- Ispitivanje mogućnosti rastvorljivih mikroigala izrađenih metodom atomizacije i raspršivanja tečnih formulacija polimernih nanočestica sa inkapsuliranim lijekom, da uspješno penetriraju u kožu i obezbjede produženu intradermalnu i/ili transdermalnu isporuku lijeka.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali za izradu polimernih nanočestica i rastvorljivih mikroigala

3.1.1. Izrada polimernih nanočestica sa inkapsuliranim ketoprofenom

Za izradu polimernih nanočestica, kao potencijalnih nosača za ketoprofen (KET), korišćene su komercijalne granule poli-D,L-mliječne kiseline (PDLLA) molarne mase 50,000 g/mol i inherentnog viskoziteta 0,38 dl/g (Sigma Aldrich, Njemačka). Aceton (Fisher Scientific, Velika Britanija) je korišćen kao rastvarač za polimer i ketoprofen (RS-2-[3-benzoilfenil] propionska kiselina, Sigma Aldrich, Njemačka). Polivinil alkohol (PVA) molarne mase 42,500-65,000 i stepena hidrolize u vrijednosti od 87-89% (Sigma Aldrich, Njemačka) i Poloksamer 188 (P188, Lutrol® F68, BASF, Njemačka) su upotrijebljeni za stabilizaciju dobijenih disperzija nanočestica.

3.1.2. Izrada rastvorljivih mikroigala

Za izradu rastvorljivih mikroigala korišćene su disperzije ketoprofena u vodenom rastvoru polivinil alkohola i/ili dobijene disperzije polimernih nanočestica sa inkapsuliranim ketoprofenom, u zavisnosti da li su se izrađivale rastvorljive mikroigle sa slobodnim ili lijekom inkapsuliranim u polimerne nanočestice. U svim eksperimentima, vodeni rastvor natrijum-karoksimetilceluloze (CMC, 5% m/v, Sigma Life Sciences, SAD) i glicerola (0,1% m/v, Sigma Life Sciences, SAD) bio je nanošen u vidu tankog sloja i služio kao potporna membrana – nosač za izrađene mikroigle (eng. *backing layer*).

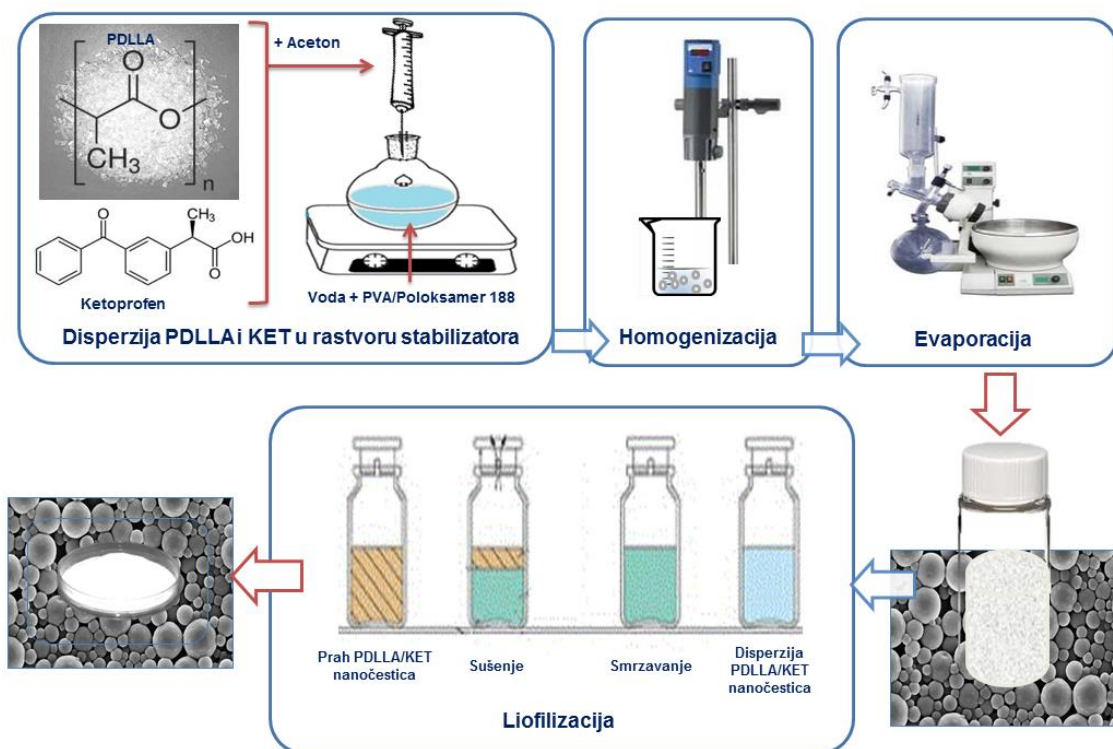
Kalupi koji su korišteni za dobijanje rastvorljivih mikroigala bili su izrađeni od polidimetilsiloksana (PDMS, Sylgard 184, Dow Corning, Belgija) u Nacionalnom Institutu Tyndall u Irskoj.

3.2. Metode za izradu polimernih nanočestica i rastvorljivih mikroigala

3.2.1. Metode za izradu polimernih nanočestica i inkapsulaciju lijeka

Za formulaciju polimernih nanočestica sa inkapsuliranim lijekom primjenjena je modifikovana metoda izmjene solvensa (eng. *solvent displacement method*), koju su razvili Mitrnica i sar. (144). Modifikacija opomenute metode podrazumjevala je kombinaciju više tehnika u toku procesa izrade nanočestica, koji se sastojao iz četiri koraka (Slika 3-1):

U prvom koraku je primjenom metode disperzije polimernog rastvora, pripremljeni rastvor polimera PDLLA u acetonu (0,5 % m/v, 22 ml) ukapavan u vodeni rastvor PVA ili P188 (0,5% m/v, 55 ml) na sobnoj temperaturi, sa ciljem stabilizacije čestica. Pri kontrolisanim uslovima procesnih parametara formirana je mliječno bijela disperzija usljed precipitacije polimera i formiranja nanočestica, što je omogućilo inkapsulaciju ketoprofena, prethodno rastvorenog u organskoj fazi. U sljedećem koraku dobijene disperzije nanočestica dodatno su homogenizovane tokom 5 minuta korišćenjem visokoenergetskog homogenizatora (Ultra Turrax® T 25 IKA®, Njemačka), pri brzini od 25000 obrtaja/min. Treći korak podrazumjeva je uparavanje organskog rastvarača korišćenjem rotacionog uparivača (Buchi Rotavapor R200, Velika Britanija) do zapremine od 20 ml. Proces uparavanja praćen je zagrijavanjem na 40°C i miješanjem pri brzini od 500 obrtaja/min.



Slika 3-1. Shematski prikaz izrade PDLLA nanočestica.

U toku poslednjeg koraka, PDLLA nanočestice sa inkapsuliranim lijekom (PDLLA-KET) su centrifugiranjem odvojene od tečne faze dobijene disperzije (Z233 M-2, Hermle Labortechnik, Njemačka), pri 14000 obrtaja/min, u toku 30 minuta. Ovaj

postupak je ponovljen dva puta sa ciljem ispiranja nanočestica u prečišćenoj vodi i odvajanja eventualno prisutnog stabilizatora (PVA ili P188) na površini čestica. Potom su PDLLA-KET nanočestice redispergovane u vodenom rastvoru trehaloze (odnos trehaloze i nanočestica je iznosio 2:1), koji je potom zamrzavan na -80°C u toku 24 h. Uzorci čvrstog praška nanočestica dobijeni su sušenjem u liofilizatoru (VirTis BenchTop Manifold Freeze-Dryer, SP Scientific, Velika Britanija) pod pritiskom od 133 mTorr i temperaturi od oko -78°C . Uspješnost procesa liofilizacije je vrednovana vizuelnim pregledom osušenog praška (zapremina i poroznost), kao i ispitivanjem mogućnosti redispergovanja, odnosno formiranja agregata nakon redispergovanja liofiliziranog praška.

Da bi se ispitaio uticaj procesnih parametara na efikasnost inkapsulacije i sadržaj ketoprofena u dobijenim nanočesticama, u toku procesa izrade zapremina organske i vodene faze, brzina miješanja u toku ukapavanja (1000 obrtaja/min), kao i promjer kapi (0,51 mm) održavani su konstantnim pomoću laboratorijske špic pumpe Aladdin AL-2000 (World Precision Instruments, SAD). Koncentracija ljekovite supstance (odnos polimer/lijek), vrsta upotrebljenog stabilizatora i brzina ukapavanja organske u vodenu fazu su parametri koji su varirani sa ciljem postizanja optimalnih uslova za uspješnu i efikasnu inkapsulaciju ketoprofena (Tabela 3-1).

Tabela 3-1. Zavisni parametri u procesu dobijanja PDLLA-KET nanočestica.

Formulacija	Koncentracija ketoprofena (%m/v)	Vrsta stabilizatora	Brzina ukapavanja (ml/min)
F1	0,025	PVA	1
F2	0,05	PVA	1
F3	0,025	PVA	0,5
F4	0,05	PVA	0,5
F5	0,025	P188	1
F6	0,05	P188	1
F7	0,025	P188	0,5
F8	0,05	P188	0,5

PVA – polivinil alkohol. P188 – Poloksamer 188.

Opisana procedura primjenjena je i za dobijanje PDLLA nanočestica bez inkapsuliranog lijeka, koje su korišćene kao kontrolni uzorci u eksperimentima karakterizacije (*placebo* PDLLA). U daljem eksperimentalnom radu, dobijeni uzorci *placebo* PDLLA i PDLLA-KET nanočestica su korišćeni u obliku tečnih disperzija (dobijenih nakon trećeg koraka u procesu izrade) ili u obliku čvrstog praška (dobijenog nakon četvrtog koraka u procesu izrade).

U cilju ispitivanja sadržaja lijeka i efikasnosti njegove inkapsulacije u polimerne nanočestice primjenjena je direktna metoda zasnovana na rastvaranju praška PDLLA-KET nanočestica u acetonitrilu, a potom razblaživanju dobijenog rastvora nanočestica sa ciljem precipitacije polimera. Nakon procesiranja i separacije taloga, količina inkapsuliranog ketoprofena je određena analizom supernatanta pomoću HPLC metode, dok su za izračunavanje sadržaja lijeka i efikasnosti inkapsulacije primjenjene sljedeće jednačine:

$$\text{Sadržaj lijeka (\%)} = \frac{Q_e}{Q_n} \times 100$$

$$\text{Efikasnost inkapsulacije (\%)} = \frac{Q_e}{Q_t} \times 100$$

gdje su:

Q_e – količina lijeka inkapsuliranog u nanočestice (mg)

Q_n – količina odvagano praška PDLLA-KET nanočestica (mg)

Q_t – ukupna količina lijeka primjenjena u toku procesa izrade (mg)

3.2.2. Metoda za kvantitativno određivanje ketoprofena

Tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC). HPLC je analitička metoda primjenjena za određivanje ukupne količine ketoprofena inkapsuliranog u polimerne nanočestice. Budući da je ova metoda korišćena u svim fazama eksperimentalnog rada, bilo je neophodno da se prvo razvije, a potom i validira metoda koja će biti dovoljno tačna, precizna, ponovljiva i specifična za kvalitativno i kvantitativno određivanje ketoprofena u različitim uzorcima.

Uzorci su analizirani na tečnom hromatografu Agilent serije 1200 sa UV/VIS detektorom i automatskim uzorkovanjem (Agilent Technologies, SAD). Separacija je vršena primjenom podione hromatografske tehnike pomoću reverzibilne kolone C18

(HyperClone C-18, Phenomenex Ltd, Velika Britanija) dimenzija 150 mm x 4,6 mm i veličinom čestica 5 μm . Kao eluent primjenjena je smješa acetonitrila i fosfatnog pufera (pH 2,5) u zapreminskom odnosu 45:55 v/v. Izokratsko eluiranje injektirane zapremine rastvora analita od 25 μl vršeno je pri brzini protoka od 1 ml/min. Ketoprofen je detektovan na talasnoj dužini od 255 nm. Sve analize su vršene pri ambijentnim uslovima pritiska i temperature (145).

Za procjenu kvaliteta i pouzdanosti rezultata analize, izvršena je validacija HPLC metode, analizom parametara koji su definisani smjernicama Međunarodne Konferencije o Harmonizaciji (eng. *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, ICH) od strane regulatornih tijela Sjedinjenih Američkih Država, Evrope i Japana (146). Osim definicije parametara validacije koji podrazumevaju specifičnost/selektivnost, linearnost, tačnost, preciznost, limit detekcije i limit kvantifikacije, smjernice ovog dokumenta preciziraju i uslove, kao i metodologiju validacije analitičke metode.

Specifičnost metode za ketoprofen, demonstrirana je na osnovu hromatograma standarda ispitivane ljekovite supstance i hromatograma uzoraka *placebo* PDLA nanočestica. Upoređivanjem ovih hromatograma ispitano je da li u uzorku postoje signali čija retencionna vremena interferiraju sa retencionim vremenom ketoprofena.

Linearnost metode za ketoprofen statistički je određena za šest rastvora standarda ljekovite supstance čija se koncentracija nalazi u opsegu od 50% do 120% u odnosu na očekivanu radnu koncentraciju lijeka prisutnu u ispitivanim uzorcima. Osnovni rastvor standarda ketoprofena koncentracije 1 mg/ml pripremljen je rastvaranjem ljekovite supstance u smješi rastvarača mobilne faze. Od ovog rastvora pripremljeni su rastvori standarda ketoprofena u mobilnoj fazi u opsegu koncentracija od 0,05-50 $\mu\text{g/ml}$. Za procjenu linearnosti HPLC metode u datom opsegu koncentracija, pripremljeni rastvori injektovani su po tri puta u prethodno podešen hromatografski sistem. Na osnovu dobijenih odgovora detektora, metodom najmanjih kvadrata, konstruisana je kalibraciona kriva za ketoprofen i izračunata jednačina prave:

$$y = ax + b$$

gdje je **a** – nagib kalibracione krive, a **b** – odsječak na ordinati

U postupku ispitivanja tačnosti, kao mjere egzaktnosti jedne analitičke metode, pripremljeni su standardni rastvori ketoprofena u triplikatu, na tri koncentraciona nivoa

(0,06, 25,0 i 40,0 µg/ml), od kojih svaki predstavlja 120 % od najniže, odnosno 50 % i 80 % od najviše koncentracije u opsegu, respektivno. Svaki od pripremljenih standardnih rastvora analiziran je tri puta, a potom su eksperimentalno određene vrijednosti koncentracija ljekovite supstance upoređivane sa teorijskom vrijednošću. Rezultati su izraženi u vidu procenta prinosa određivanja (eng. *recovery*) za poznatu količinu ketoprofena.

Za ispitivanje preciznosti, standardni rastvori ketoprofena istih koncentracija koje su korišćene za procjenu tačnosti metode, injektovani su u triplikatu, tokom tri uzastopna dana. Određena je ponovljivost kao mjera preciznosti pod istim operativnim uslovima u toku kraćeg vremenskog intervala (eng. *intra-assay precision*), kao i intermedijarna preciznost koja izražava varijacije unutar istog mjesta ispitivanja (eng. *inter-day precision*). Rezultati su, za svaku analiziranu koncentraciju, izraženi u obliku srednje vrijednosti površine ispod pika (AVER), koeficijenta varijacije (CV) i intervala pouznanosti (CI) uz 95% vjerovatnoću.

Na kraju postupka validacije HPLC metode, određena je najmanja količina ljekovite supstance koja može biti detektovana, odnosno kvantitativno određena u uzorku sa odgovarajućom tačnošću i preciznošću. Ova dva parametra označena su kao limit detekcije (LD) i limit kvantifikacije (LQ) i za njihovo određivanje pripremljeni su standardni rastvori ketoprofena u opsegu koncentracija od 0,0008-0,2 µg/ml. Rastvori su analizirani u triplikatu, a koncentracije koje definišu LD i LQ su izračunate na osnovu kalibracione krive ketoprofena u datom opsegu koncentracija, pomoću sljedećih izraza:

$$LD = \frac{3,3 \sigma}{S}$$

$$LQ = \frac{10 \sigma}{S}$$

gdje je σ – standardna devijacija odgovora detektora, a S – nagib kalibracione krive

3.2.3. Metode za analizu karakteristika dobijenih nanočestica sa inkapsuliranim lijekom

Foton korelaciona spektroskopija (PCS). PCS je tehnika koja je primjenjena za određivanje veličine čestica (eng. *intesity-weighted mean diameter, Z-average, Z-ave*) i raspodjele veličina čestica (indeks polidisperznosti, Pdl). Ova tehnika se zasniva na dinamičkom rasipanju svjetlosti (eng. *Dynamic Light Scattering, DLS*) i kao rezultat

mjerenja intenziteta promjene rasute svjetlosti, daje vrijednost hidrodinamičkog dijametra nanočestice. Prosječna veličina i raspodela veličina dobijenih PDLLA nanočestica mjerene su na uređaju Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Velika Britanija). Da bi se umanjio uticaj gustine i viskoziteta disperzije nanočestica na rezultate mjerenja, uzorci su prije mjerenja 100 puta razblaživani visokoprečišćenom vodom. Mjerenje je vršeno u polistirenskim kivetama za jednokratnu upotrebu na temperaturi od 25°C pod uglom rasipanja svetlosti od 173°. Svaki uzorak je mjeran tri puta. Za analizu podataka i određivanje Z-ave korišćene su vrijednosti viskoziteta (0,8872 mPa.s) i refrakcionog indeksa (1,33) vode.

Laserska difrakcija (LD). Za potvrdu dobijenih rezultata i utvrđivanje mogućeg prisustva većih i/ili aglomerisanih čestica u ispitivanim uzorcima, kao dodatna metoda karakterizacije primjenjena je tehnika statičkog rasipanja svjetlosti, poznata i kao laserska difrakcija. Za tu svrhu korišćen je uređaj Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Velika Britanija), čiji je opseg mjerenja 2 nm – 2 mm, za razliku od Zetasizer Nano ZS uređaja koji mjeri veličine do 3 μm (147). Priprema uzoraka za mjerenje na Malvern Mastersizer uređaju vršena je na isti način kao i za PCS mjerenje – razblaživanje visokoprečišćenom vodom 100 puta. Sva mjerenja su rađena u triplikatu na 25 °C.

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM). SEM je tehnika koja koristi talasna svojstva elektrona, omogućavajući istraživanje detalja prostorne strukture i do nekoliko međuatomskih rastojanja (2). Ova tehnika je primjenjena da bi se analizirale morfološke karakteristike dobijenih uzoraka PDLLA nanočestica sa i bez inkapsuliranog ketoprofena. Prije snimanja uzorci su dispergovani u vodi nakon čega su filtriranjem nanošeni na zlatom obložene polikarbonatne membrane sa veličinom pora od 50 nm. Za snimanje je odabran način koji koristi elastično rasijane elektrone (eng. *backscatter mode*) u skenirajućem elektronskom mikroskopu JEOL JSM 5800, i LINK ISIS EDS 300 detektor (Jeol Ltd. Velika Britanija).

Elektroforetska metoda. U cilju mjerenja površinskog naelektrisanja čestica primjenjena je elektroforetska metoda, koja se zasniva na mjerenju mobilnosti čestica u električnom polju. Korišćenjem ove tehnike moguće izmeriti zeta potencijal dobijenih nanočestica, koji predstavlja razliku potencijala površinskog i difuznog sloja adsorbovanih jona na njihovoj površini. Naelektrisanje površine materijala je od

izuzetne važnosti prije svega sa aspekta fizičke stabilnosti nanodisperznih koloidnih sistema. Osim toga, površinsko naelektrisanje čestica u velikoj mjeri određuje i njihovu dalju sudbinu u *in vivo* uslovima, kao i uspješnost ciljane terapije. Mjerenja površinskog napona uzoraka *placebo* PDLLA i PDLLA-KET nanočestica su vršena na već opisanom uređaju Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Velika Britanija). Prije mjerenja uzorci su razblaženi visokoprečišćenom vodom (10 μL uzorka je razblaženo sa 990 μL visokoprečišćene vode). Sva mjerenja su vršena na 25 °C u kapilarnoj ćeliji (DTS 1060) za jednokratnu upotrebu. Izmjerena elektroforetska pokretljivost nanočestica u električnom polju prevedena je u zeta potencijal (ζ) primjenom Smoluchowski jednačine (148). Dobijeni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost tri mjerenja.

Difrakcija rentgenskih zraka (XRD). XRD je fizička metoda koja omogućava precizno određivanje pozicije atoma, dužine veze i uglova u kristalu. Rentgenski zraci su elektromagnetski talasi, čija je talasna dužina istog reda veličine kao i razmak susjednih atoma u kristalu (10^{-9} - 10^{-11} m). Prolazom snopa rentgenskih zraka kroz kristalni uzorak dolazi do raspršenja zračenja na elektronskim oblacima atoma. U određenim smjerovima raspršeni impulsi se interferentno pojačavaju, tj. dolazi do pojave difrakcije. Nakon prolaska kroz analizator i filter, ovi impulsi se bilježe dajući odgovarajuće dijagrame. Prostorni raspored difrakcijskih maksimuma strogo zavisi od prostorne periodičnosti atoma u kristalu, tj. od njegove kristalne rešetke. Intenziteti difrakcijskih maksimuma zavise od vrste atoma u kristalnoj rešetki i o njihovom međusobnom prostornom rasporedu tj. zavise od kristalne strukture supstance (149). Za potrebe eksperimentalnog rada XRD metoda je korišćena za analizu strukture praškastih uzoraka nanočestica i identifikaciju ketoprofena. Osim PDLLA-KET nanočestica, određeni su i difraktogrami čistog lijeka i polimera. Svi ispitivani uzorci su u tankom sloju izloženi rendgenskim zracima koji se detektuju nakon interakcije sa fazom uzorka. XRD mjerenja su izvedena pomoću Bruker D8 Advance rendgenskog difraktometra (Bruker AXS GmbH, Njemačka) u simetričnom refleksionom modu sa Cu K α radijacijom. Opseg difrakcionog ugla (2θ) bio je od 5°–80°.

Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR). FTIR metoda je primjenjena za kvalitativnu identifikaciju ketoprofena i analizu mogućih fizičkih i/ili hemijskih interakcija lijeka i polimera. Mjerenja su vršena u opsegu talasnih brojeva od 4000 do 400 cm^{-1} , pri rezoluciji od 1 cm^{-1} , pomoću Nicolet iS10 IR spektrofotometra,

(Thermo Scientific, MA, SAD), na dodatku za prigušenu totalnu refleksiju (eng, *Attenuated Total Reflectance*, ATR). Praškasti uzorci ketoprofena, PDLLA-KET nanočestica mjereni su direktno na ATR kristalu, a rezultati su prikazani grafički.

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) i Termogravimetrijska analiza (TGA). DSC/TGA su termičke metode koje pružaju mogućnost analize amorfnih polimera i određivanja temperature na kojoj dolazi do faznog prelaza iz čvrstog amorfnog (staklastog) u viskoelastično stanje. Ovaj prelaz je mjera pokretljivosti lanaca i veličine njihove slobodne zapremine tako da indirektno može da ukaže na postojanje interakcija kako između polimernih lanaca tako i između inkapsuliranih supstanci i polimernih lanaca (150). U ovom radu, termička metoda analize je primjenjena u cilju određivanja promjene temperature staklastog prelaza polimera u dobijenim nanočestičnim sistemima, sa i bez inkapsuliranog leka, u toku procesa degradacije. Za tu namjenu primjenjen je uređaj TG-DSC 111 SETARAM opremljen softverom za analizu podataka. Svi uzorci su zagrijavani u temperaturnom opsegu od 25-450°C pri brzini od 10°C/min i atmosferi gasovitog azota od 37,5 cm³/min. Rezultati su predstavljeni grafički.

Metoda za ispitivanje brzine oslobađanja lijeka iz polimernih nanočestica u in vitro uslovima. Brzina otpuštanja ketoprofena inkapsuliranog u PDLLA nanosfere analizirana je u *in vitro* uslovima pomoću Slide-A-Lyzer G2 kasete za dijalizu sa polupropustljivom membranom 10K MWCO (Thermo Scientific, SAD).



Slika 3-2. Ilustracija *in vitro* brzine oslobađanja ketoprofena iz PDLLA nanočestica pomoću Slide-a-Lyzer kasete za dijalizu.

Radene su po tri probe, pri čemu se u svakoj Slide-A-Lyzer kaseti nalazila disperzija PDLLA-KET nanočestica ekvivalentna količini ketoprofena od 10 mg. Nakon aktiviranja membrane, kasete sa uzorkom je uronjena u medijum za otpuštanje (0,1M fosfatni pufer, pH 7,4), uz konstantnu temperaturu (37 °C) i miješanje na magnetnoj mješalici (Slika 3-2). Sa ciljem ostvarivanja sink uslova, prethodno je metodom ekvilibrijuma određena koncentracija zasićenja ketoprofena u fosfatnom puferu, koja iznosi $1,4 \pm 0,01$ mg/ml. U određenim vremenskim intervalima uziman je uzorak puferskog rastvora, čijom je analizom određen sadržaj oslobođenog lijeka pomoću HPLC metode prethodno opisane u poglavlju 3.2.2. Nakon svakog uzorkovanja, sudovi su dopunjavani istom zapreminom svježeg pufera, kako bi se zapremina medijuma za otpuštanje lijeka održala konstantnom. U identičnim eksperimentalnim uslovima, određen je *dissolution test* iste količine slobodnog lijeka, sa ciljem upoređivanja profila oslobađanja i utvrđivanja potencijalnog produženog oslobađanja lijeka iz polimernih nanočestica. Profili oslobađanja lijeka su dobijeni grafičkim prikazom zavisnosti kumulativne količine oslobođenog lijeka i vremena oslobađanja.

Tabela 3-2. Prikaz matematičkih modela korištenih za ispitivanje mehanizma oslobađanja ketoprofena inkapsuliranog u PDLLA nanočestice.

Model	Jednačina
Nulti red	$Q_t = Q_0 + K_0 t$
Prvi red	$\log Q_t = \log Q_0 - K_1 t/2.303$
Hixson-Crowell	$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_{HC} t$
Higuchi	$Q_t = Q_0 + K_H t^{1/2}$
Korsmeyer-Peppas	$Q_t = K_{KP} t^n$

Q_t - količina lijeka oslobođenog u vremenu t . Q_0 - inicijalna količina lijeka. K - konstanta brzine oslobađanja matematičkog modela. n - eksponent oslobađanja.

Dobijeni profili i mehanizam oslobađanja lijeka inkapsuliranog u PDLLA nanočestice, dodatno su opisani kinetičkim modelima u kojima je količina rastvorene supstance (Q) u funkciji vremena oslobađanja (t), $Q = f(t)$. U tu svrhu, korišteni su model nultog reda, model prvog reda, Hixson–Crowel model, Higuchi model i Korsmeyer–Peppas model (Tabela 3-2) (151). Linearna regresija matematičkih modela,

procjenjena na osnovu kvadrata koeficijenta korelacije (R^2), korišćena je kao kriterijum za selekciju kinetičkog modela koji najbolje opisuje mehanizam oslobađanja ketoprofena iz ispitivanih uzoraka.

3.2.4. Metode za izradu rastvorljivih mikroigala

Metoda mokrog graviranja. Kalupi od polidimetilsiloksana (PDMS) korišćeni za izradu rastvorljivih mikroigala izrađeni su u Tyndall institutu (Irska) tehnikom mokrog graviranja (eng. *wet-etching process*). Prvo je uz korišćenje silikonskog diska diametra 100 mm, dobijena silikonska matrica sa nizom od 144 mikroigle na površini od 1 cm² (152). Visina dobijenih silikonskih mikroigala bila je 280 μm. Potom je smješa PDMS i katalizatora u odnosu 10:1 v/v tretirana u vakuumu (800 Mb) u toku 20 minuta, a odmah zatim izlivena preko matrice sa silikonskim mikroiglama i izložena temperaturi od 100°C u toku 1 sata. Dobijeni PDMS kalup je potom odvojen od silikonske utisne matrice (Slika 3-3.a) i podijeljen na pojedinačne kalupe veličine 1 cm², koji su korišćeni za izradu rastvorljivih mikroigala (Slika 3-3.b).

(a)



(b)

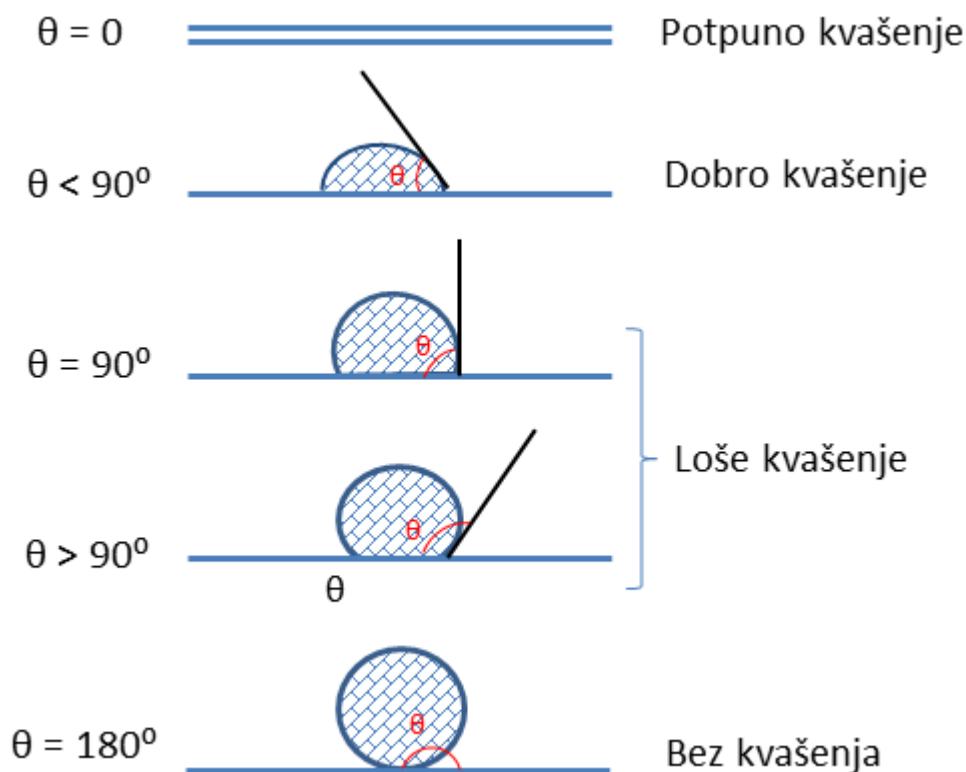


Slika 3-3. PDMS kalupi korišćeni za dobijanje rastvorljivih mikroigala.

Metoda mjerenja viskoziteta. Prije početka izrade rastvorljivih mikroigala, bilo je neophodno da se odredi viskozitet formulacija koje će se koristiti za njihovu izradu. Viskoizitet predstavlja važan faktor pri određivanju parametara za uspješnu formulaciju rastvorljivih mikroigala. Mjerenje viskoziteta vršeno je u ambijentnim uslovima pomoću SV-10 vibro viskozimetra (A&D Company Ltd, Japan) za vodeni rastvor PVA

koji sadrži slobodni ketoprofen (PVA-KET), kao i za disperziju PDLLA nanočestica sa inkapsuliranim ketorpfenom (PDLLA-KET). Rezultati predstavljaju srednju vrijednost 5 ponovljenih mjerenja svakog uzorka.

Metoda mjerenja ugla kvašenja. Osim viskoziteta, drugi parametar podjednako važan za procjenu mogućnosti obrazovanja rastvorljivih mikroigala je kontaktni ugao koji polazne formulacije formiraju sa PDMS kalupima. Kontaktni ugao tj. kvašljivost površine materijala moguće je analizirati metodom kapljice koja se zasniva na nanošenju određene zapremine jedne kapi ispitivane formulacije na površinu materijala, i mjerenju ugla (θ) između tangente na površini kapljice i površine materijala (Slika 3-4) (153).



Slika 3-4. Shematski prikaz kvašenja i kontaktnog ugla između ispitivanog materijala i tečnih formulacija.

U eksperimentima ove disertacije, mjeren je statički ugao kvašenja između PDMS kalupa i dvije različite polazne formulacije: rastvor PVA koji sadrži slobodni

ketoprofen (PVA-KET) i disperzija PDLLA-KET nanočestica. Sva mjerenja su vršena pomoću PG X goniometra (Fibro System AB, Švedska), nanošenjem jedne kapi formulacije zapremine 3 μL na površinu PDMS kalupa (Slika 3-5). Uređaj ima integrisanu kameru visoke rezolucije i softver za obradu podataka, koji mjeri površinski napon ispitivanih tečnih formulacija i izračunava površinsku energiju materijala. Svi prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost 10 ponovljenih mjerenja statičkog kontaktnog ugla svake formulacije.



Slika 3-5. PG X goniometar.

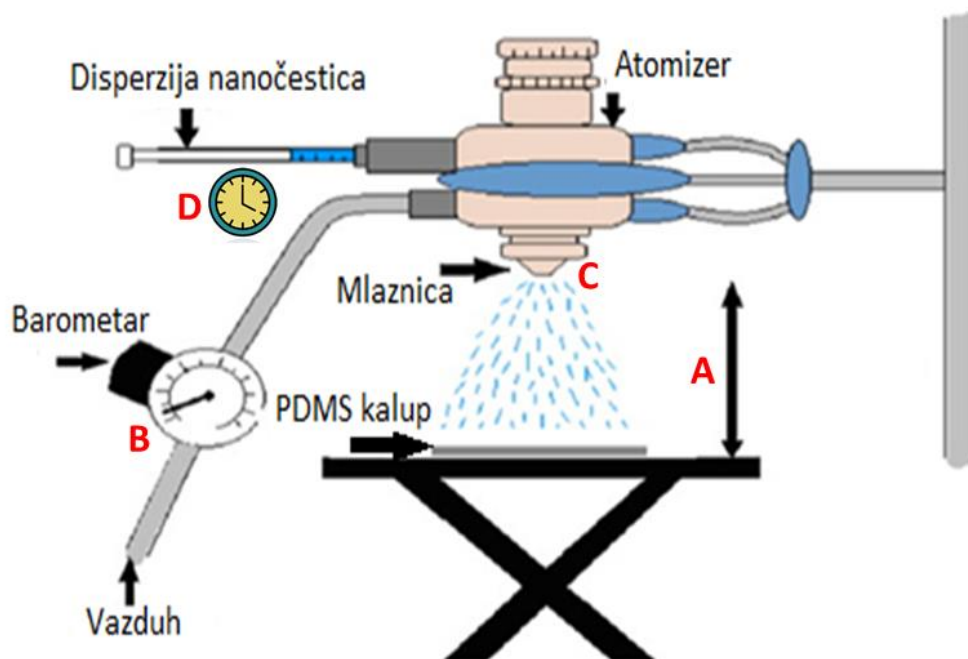
Metoda atomizacije – raspršivanje pod kontrolisanim pritiskom. Iako je osnovni cilj ovog rada bio formuliranje rastvorljivih mikroigala koje će sadržavati ketoprofen inkapsuliran u PDLLA nanočestice, izrađene su i rastvorljive mikroigle od PVA i slobodnog lijeka. Na ovaj način ostvarena je mogućnost da se, kroz preostale faze eksperimentalnog rada, uporede brzine oslobađanja lijeka u *in vitro* i *ex vivo* uslovima i dokaže potencijalno produženo oslobađanje ketoprofena. Za izradu rastvorljivih mikroigala sa nanočesticama (DMN 1) korišćene su disperzije PDLLA-KET nanosfera dobijene prema postupku detaljno opisanom u poglavlju 3.1.2, dok je za izradu rastvorljivih mikroigala od PVA i slobodnog lijeka (DMN 2) kao polazna formulacija korišćen vodeni rastvor PVA (5% m/v), koji sadrži ketoprofen u koncentraciji od 0,25% m/v.



Slika 3-6. Düsen-Schlick 970-S8 dvofluidna mlaznica korišćena za dobijanje rastvorljivih mikroigala.

Za formulaciju rastvorljivih mikroigala korišćena je tehnika raspršivanja pod kontrolisanim pritiskom pomoću raspršivača (Düsen-Schlick 970-S8, Njemačka) (Slika 3-6). Proces kojim se tečnost dezintegriše u veliki broj finih kapljica naziva se atomizacija, a ostvaruje se interakcijom tečnosti i drugog fluida, obično komprimovanog vazduha. Mlaznice proizvode velike brzine vazduha, i postiže se efektivan kontakt sa napojnom tečnošću koja se raspršava u vidu finih kapljica (spreja) (154). Dvofluidna mlaznica sa veličinom otvora od ,5 mm bila je povezana sa izvorom komprimovanog vazduha i tečnih formulacija korištenih za dobijanje rastvorljivih mikroigala. Shematski prikaz aparature za dobijanje rastvorljivih mikroigala tehnikom raspršivanja pod kontrolisanim pritiskom predstavljen je na Slici 3-7.

Sa ciljem da se identifikuju optimalni procesni parametri koji će, polazeći od osnovnih formulacija, dovesti do uspješnog formiranja rastvorljivih mikroigala, primjenjen je Taguchi eksperimentalni dizajn. Obzirom na kompleksnost procesa i veliki broj faktora koji utiču na odgovor sistema (sastav polaznih tečnih formulacija, njihova brzina raspršivanja, pritisak komprimovanog vazduha, rastojanje između mlaznice i PDMS kalupa, vrijeme raspršivanja i otvor mlaznice koji reguliše ugao raspršivanja kapi) upravo se Taguchi metod frakcionog faktorijalnog dizajna smatra pogodnijim i lakšim za interpretaciju od punog faktorijanog dizajna (155).



Slika 3-7. Shematski prikaz aparature za dobijanje rastvorljivih mikroigala tehnikom raspršivanja pod kontrolisanim pritiskom. A, B, C i D su kontrolisani faktori procesa izrade.

(106)

U eksperimentima dobijanja rastvorljivih mikroigala metodom raspršivanja pod pritiskom, postavljena je hipoteza da su procesne varijable tj. kontrolisani parametri, rastojanje između mlaznice i PDMS kalupa (faktor A), pritisak komprimovanog vazduha (faktor B), otvor mlaznice odnosno veličina ugla raspršivanja (faktor C) i vrijeme raspršivanja (faktor D). Taguchi eksperimentalni dizajn sastojao od 4 faktora, na tri nivoa, te je za definisanje eksperimentalnih uslova odabrana L9 ortogonalna matrica. Odabrane vrijednosti kontrolisanih procesnih parametara i redosljed izvođenih eksperimenata prikazani su u Tabelama 3-3. i 3-4. U toku izvođenja svih 9 eksperimenata, sastav i koncentracija polaznih formulacija, kao i njihova brzina raspršivanja (0,5 ml/min) bili su konstantni. Izgled i broj formiranih mikroigala po jedinici površine potporne membrane identifikovani su kao odgovor sistema (nekontrolisani faktori tj. šumovi).

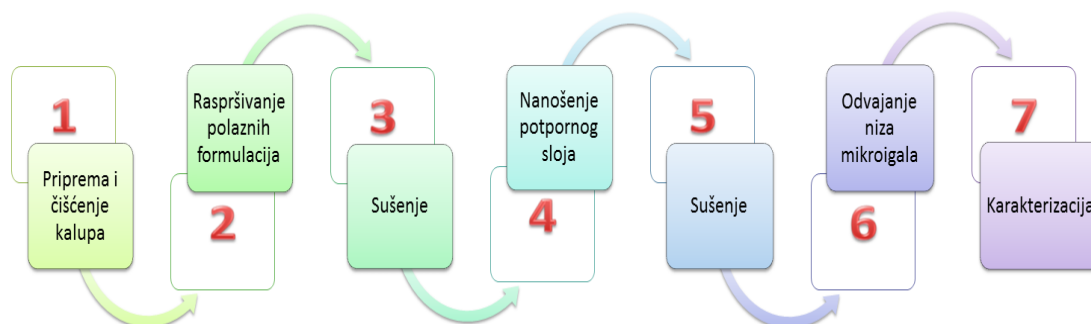
Tabela 3-3. Vrijednosti kontrolisanih faktora procesa i njihovi nivoi.

Nivo	Rastojanje između mlaznice i kalupa (cm)	Pritisak vazduha (bar)	Otvor mlaznice	Vrijeme raspršivanja (s)
1	3	0,25	1	10
2	5	0,5	3	20
3	7	1	5	30

Sam proces izrade rastvorljivih mikroigala sastojao se od 6 koraka shematski prikazanih na Slici 3-8. Prethodno pripremljeni PDMS kalupi su punjeni raspršivanjem polazne formulacije (PVA-KET ili PDLLA-KET) pod tačno definisanim eksperimentalnim uslovima. Potom su dobijeni uzorci sušeni u eksikatoru u toku 2 h u prisustvu silikagela, a onda je na svaki uzorak nanošeno 1 ml vodenog rastvora CMC i glicerola u koncentracijama 5% i 0,1% m/v, respektivno sa ciljem formiranja potporne membrane – nosača dobijenog niza mikroigala (eng. *backing layer*). Nakon sušenja preko noći u ambijentnim uslovima, nizovi od 144 rastvorljive mikroigle (12x12) sa CMC-glicerolskom potpornom membranom su, u poslednjem koraku procesa, odvajani od PDMS kalupa i analizirani. Na ovaj način dobijeni su uzorci rastvorljivih mikroigala sa ketoprofenom inkapsuliranim u PDLLA nanosfere označeni kao DMN 1, i uzorci rastvorljivih mikroigala sa PVA i slobodnim lijekom označeni kao DMN 2. U zavisnosti od broja ponavljanja koraka 2 i 3 u procesu izrade rastvorljivih mikroigala, bilo je moguće dobiti uzorke sa formulacijom lijeka u vrhu mikroigle, u njenoj gornjoj polovini ili cijeloj mikroigli. Ovaj proces označen je kao slojevito punjenje odnosno dobijanje mikroigala sa horizontalnim slojevima. U okviru eksperimenata u ovoj tezi, punjenje PDMS kalupa je bilo konstantno i vršeno je 4 puta za sve uzorke rastvorljivih mikroigala, pri čemu je vrijeme sušenja između svakog raspršivanja iznosilo 30 minuta u eksikatoru, u prisustvu silikagela.

Kako bi se procijenio odgovor sistema za svaki od 9 izvođenih eksperimenata, eksperimenti su rađeni u triplikatu, a potom je vršena vizuelno vrednovanje svake pojedinačne mikroigle na površini od 1 cm² potporne membrane pomoću svjetlosnog mikroskopa sa integrisanom digitalnom kamerom (OLYMPUS SZ61, PA, SAD), koristeći metodu i kriterijume detaljno opisane u poglavlju 3.2.5. Nakon što su, primjenom Taguchi eksperimentalnog dizajna, određeni optimalni parametri procesa

postupak je ponovljen sa ciljem potvrđivanja rezultata i dobijanja uzoraka rastvorljivih mikroigala za njihovu dalju karakterizaciju.



Slika 3-8. Faze u procesu izrade rastvorljivih mikroigala.

Tabela 3-4. Plan izvođenja eksperimenata prema L9 ortogonalnog matrici Taguchi eksperimentalnog dizajna.

Eksperiment	Rastojanje između mlaznice i kalupa	Pritisak vazduha	Otvor mlaznice	Vrijeme raspršivanja
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

3.2.5. Metode za analizu karakteristika dobijenih rastvorljivih mikroigala

Određivanje geometrije i morfoloških karakteristika rastvorljivih mikroigala.

Vizuelna karakterizacija rastvorljivih mikroigala urađena je pomoću svjetlosnog mikroskopa (OLYMPUS SZ61, PA, SAD), sa ugrađenom digitalnom kamerom. Na ovaj način analizirane su morfološke karakteristike (fizički integritet, oblik i izgled) dobijenih rastvorljivih mikroigala i izvršena njihova evaluacija na osnovu utvrđenih kriterijuma koji su predstavljeni u Tabeli 3-5. Donje granice prihvatljivosti za uzorke rastvorljivih mikroigala, određene su na osnovu farmakopejskih zahtjeva za ujednačenost sadržaja lijekovite supstance u transdermalnim flasterima (145). Stoga su u daljim eksperimentima bili korišteni samo uzorci koji su sadržavali više od 90% mikroigala vrednovanih sa 4, tj. uzorci koji su vrednovani sa više od 520 (donja granica prihvatljivosti) od maksimalnih 576 bodova, što je predstavljalo niz sa svih 144 potpuno formiranih mikroigala, pravilnog piramidalnog oblika i oštrog vrha.

Korišćenjem softvera ImageJ analizirana je geometrija dobijenih mikroigala. Mjerenjem visine mikroigle i širine njene baze, te izračunavanjem odnosa ove dvije veličine (eng. *aspect ratio*), dobijen je parametar od izuzetne važnosti za uspješnu penetraciju rastvorljivih mikroigala u kožu (Slika 1-14). Kao što je već detaljno objašnjeno u teorijskom dijelu (poglavlje 1.3.3.), osim što određuje uspješnost penetracije mikroigala u kožu, ovaj parametar utiče i na njihove mehaničke osobine.

Tabela 3-5. Kriterijumi za evaluaciju morfoloških karakteristika rastvorljivih mikroigala (interni propisi, Farmaceutski fakultet, UCC, Irska).

Ocjena	Opis
4	potpuno formirana mikroigla pravilnog piramidalnog oblika i oštrog vrha
3	potpuno formirana mikroigla nepravilnog oblika i/ili tupog vrha
2	nepotpuno formirana mikroigla, bez vrha
1	prisustvo samo baze mikroigle i/ili izostanak formiranja mikroigle

Određivanje mehaničkih osobina rastvorljivih mikroigala. Značaj mehaničkih osobina mikroigala ogleda se u njihovoj uspješnoj i sigurnoj primjeni na koži. Naime, mehaničke osobine utiču na sposobnost mikroigle da podnese silu pritiska prilikom

aplikacije, i spriječi nepoželjno savijanje ili lomljenje mikroigala. Mehaničke osobine uzoraka DMN 1 i DMN 2 određivane su pomoću digitalnog mjerača sile potrebne da dovede do smanjenja visine polimernih mikroigala odnosno njihovog loma (DS2-11 Imada, IL, SAD) (Slika 3-9). Vizulizacija uzoraka i mjerenje visine mikroigala, prije i nakon eksperimenta, izvršeno je pomoću svjetlosnog mikroskopa (OLYMPUS SZ61, PA, SAD), i softverskog programa ImageJ. Potom je uzorak rastvorljivih mikroigala pomoću dvostrano ljepljive trake pričvršćen za metalnu sondu uređaja i primjenjeno je aksijalno opterećenje u odnosu na ravnu metalnu površinu u vrijednosti od 2 N/cm², 4 N/cm² i 8 N/cm². Parametar za procjenu rezultata ovih mjerenja, vršenih u triplicatu za svaki uzorak, bio je procenat redukovane visine mikroigala.



Slika 3-9. DS2-11 Imada digitalni mjerač sile.

Metoda rastvaranja mikroigala. Sa ciljem ispitivanja ujednačenosti sadržaja ketoprofena inkapsuliranog u rastvorljive mikroigle u obliku slobodnog lijeka ili polimernih nanočestica, i određivanja njegove hemijske stabilnosti, razvijen je i optimizovan protokol za rastvaranje dobijenih uzoraka mikroigala. Kao medijum za rastvaranje korišćen je 0,1M fosfatni pufer (pH 7,4) za uzorke mikroigala od PVA i slobodnog lijeka, odnosno acetonitril:fosfatni pufer (pH 2,5) u odnosu 45:55 v/v za uzorke PDLA-KET nanosfera. Sadržaj ketoprofena određen je u 10 pojedinačnih uzoraka svake DMN formulacije. Uzorci su prvo rastvoreni u 0,5 ml odgovarajućeg

medijuma, uz konstantno miješanje na horizontalnoj laboratorijskoj mješalici u toku 15 minuta i pri brzini od 100 obrtaja/min. Potom je vršena sonifikacija uzoraka u ultrazvučnom kupatilu u toku 10 minuta, nakon čega je sadržaj ketoprofena određen u medijumu za rastvaranje pomoću HPLC metode. Ispitivani uzorci treba da budu u skladu sa granicama navedenim u testu C za ispitivanje ujednačenosti sadržaja transdermalnih flastera, prema kojem se sadržaj ketoprofena u svakom pojedinačnom uzorku nalazi u granicama od 75% do 125% od prosječnog sadržaja lijeka određenog iz 10 uzoraka (145).

3.2.6. Metode za analizu stabilnosti dobijenih polimernih nanočestica i rastvorljivih mikroigala sa inkapsularinam lijekom

Budući da farmaceutski preparati podliježu fizičkim, hemijskim i mikrobiološkim promjenama tokom skladištenja i čuvanja, ispitivanje stabilnosti predstavlja veoma važan i nezaobilazan korak u fazi razvoja formulacije i farmaceutskog oblika. Svrha testa stabilnosti je da obezbijedi podatke o variranju kvaliteta aktivne supstance ili gotovog lijeka, tokom vremena, pod dejstvom različitih faktora ambijenta (temperatura, svjetlost i vlaga), i da se na osnovu tih podataka omogući preporuka uslova čuvanja i odredi rok upotrebe. Zahtjevi za ispitivanje stabilnosti lijekova postavljeni su na prvoj Međunarodnoj konferenciji za harmonizaciju (ICH), nakon čega su izdatsmjernice koje se direktno i indirektno odnose na stabilnost lijekovitih supstanci i farmaceutskih preparata (156). U cilju ispitivanja fizičke stabilnosti izrađenih disperzija nanočestica i rastvorljivih mikroigala, kao i hemijske stabilnosti ketoprofena u ovim farmaceutskim oblicima, sprovedena je ubrzana studija stabilnosti (stres test), i to za uzorke disperzija nanočestica (SS-DN) i rastvorljivih mikroigala sa ketoprofenom inkapsuliranim u polimerne nanočestice (SS-MN). Svaki od navedenih uzoraka su nakon izrade podijeljeni u dvije grupe. Prva grupa uzoraka izložena je uslovima ubrzanog starenja u klima komori/inkubatoru na $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i relativnoj vlažnosti vazduha $75\% \pm 5\%$, sa ciljem da se okarakterišu parametri koji utiču na stabilnost aktivne supstance i proizvoda. Druga grupa uzoraka čuvana je pod kontrolisanim ambijentnim uslovima na $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i relativnoj vlažnosti vazduha od $40\% \pm 5\%$ (kontrolna grupa). Uzorci su čuvani u hermetički zatvorenim staklenim bočicama sa aluminijumskom kapicom tokom 3 mjeseca. Parametri za procjenu

kratkoročne stabilnosti izrađenih sistema analizirani su na dan izrade i nakon 30, 60 i 90 dana (Tabela 3-6).

Tabela 3-6. Parametri i metode za ispitivanje stabilnosti PDLLA-KET nanočestica i rastvorljivih mikroigala.

Uzorak	Parametar	Metoda
Disperzija PDLLA-KET nanočestica (SS-DN)	Fizički izgled disperzije	Vizuelni pregled
	Veličina čestica i PDI	PCS
	Zeta potencijal	Elektroforetska metoda
	Efikasnost inkapsulacije	HPLC metoda
Rastvorljive mikroigle sa PDLLA-KET nanočesticama (SS-MN)	Fizička stabilnost mikroigala	Svjetlosni mikroskop
	Hemijska stabilnost lijeka	HPLC metoda
	Mehaničke osobine mikroigala	Digitalni mjerac sile Svjetlosni mikroskop

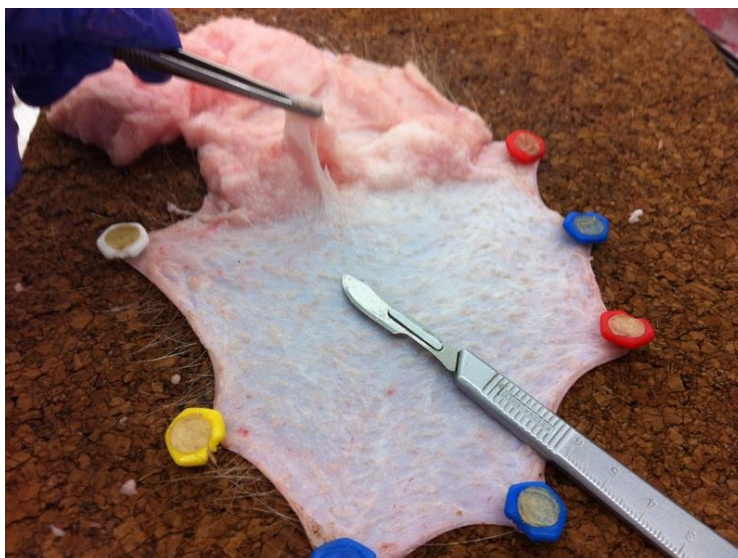
PCS – Foton korelaciona spektroskopija . HPLC – visokoeffikasna tečna hromatografija.

3.2.7. Metode *ex vivo* studija penetracije/permeacije polimernih nanočestica i rastvorljivih mikroigala sa inkapsulirnim lijekom

Metoda pripreme kože svinje. Svi eksperimenti penetracije/permeacije PDLLA nanočestica i rastvorljivih mikroigala vršeni su *ex vivo*, korišćenjem uzoraka kože svinje ukupne debljine, koja se sastojala od *stratum corneum*-a, vijabilnog epidermisa i dermisa. Iako se sastav lipida u SC-u kože svinje razlikuje od humanog tkiva, svinjska koža se ipak smatra najpogodnijom 'prirodnom' membranom za *in vitro* studije permeacije. Naime, debljina kože svinje je približna debljini humane kože, i što je najvažnije, pokazuje najslabije osobine permeabilnosti u poređenju sa svim drugim membranama koje se koriste u ovim eksperimentima (55). Druga prednost upotrebe kože svinje je laka dostupnost, budući da je za rad sa svježim uzorcima isječaka humane kože neophodna dozvola Etičkog komiteta, a i samo snabdjevanje uzorcima humane kože je mnogo teže jer se uzimaju sa kadavera ili poslije hirurških intervencija.

Za potrebe eksperimenata ove teze uzorci kože svinje (područje abdomena – eksperiment 1 i koža uha – eksperiment 2) su dobijeni od lokalnog dobavljača odmah nakon žrtvovanja životinje, očišćeni i skladišteni na -80°C do upotrebe (ne duže od 3 mjeseca). 24 sata prije upotrebe, koža je izvađena sa -80°C i ostavljena na 4°C da se

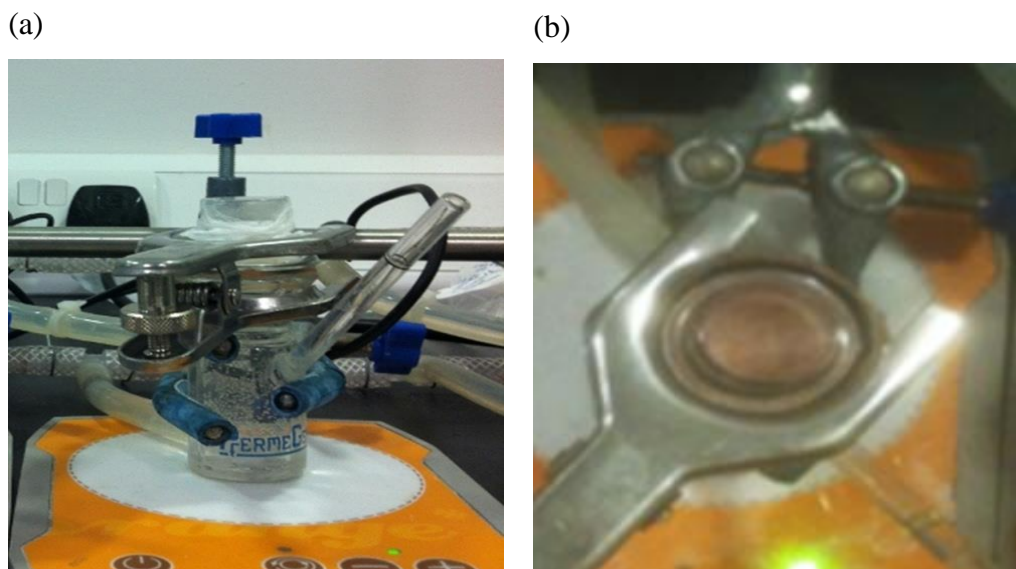
lagano odledi. Dalji protokol pripreme uzoraka kože svinje podrazmjevao je pažljivo odstranjivanje dlaka sa kože, a potom hrskavice (u slučaju pripreme kože uha svinje) i masnog potkožnog tkiva (Slika 3-10). Na kraju, pregledan je integritet kože kako bi se odstranili uzorci kože sa eventualno prisutnim oštećenjima. Poslednji korak u pripremi uzoraka kože svinje bio je mjerenje, njihove debljine pomoću Varnier pomičnog mjerila – noniusa (Mitutoyo, Japan). Izmjerena debljina svih uzoraka korištenih u eksperimentima iznosila je $1,24 \pm 0,13$ mm.



Slika 3-10. Priprema uzoraka kože svinje.

Metoda vertikalne statične difuzione Franz-ove ćelije. Iako se za procjenu permeacije i/ili perkutane resorpcije najmjerodavniji rezultati dobijaju izvođenjem *in vivo* eksperimenata na ljudima, ovi eksperimenti se najčešće izvode *in vitro* i *ex vivo* tehnikama jer je veliki broj supstanci potencijalno toksičan i nije pogodan za testiranje na ljudima (157). U literaturi su opisani brojni sistemi za *in vitro* i *ex vivo* ispitivanje perkutane penetracije/permeacije, koji se prema složenosti razlikuju od dvokomponentnih statičnih do višeslojnih protočnih ćelija (53). Iako ne pružaju podatke o metabolizmu, distribuciji i efektima protoka krvi na permeaciju, ovi sistemi imaju brojne druge prednosti zahvaljujući kojim su našli široku primjenu u *in vitro* ispitivanju penetracije/permeacije lijekovite supstance u/kroz kožu tokom razvoja transdermalnih ili lokalnih lijekova. Franz-ova vertikalna difuziona ćelija, koja se sastoji iz donorskog i akceptorskog odjeljka i fiksiranog isječka kože između njih, je najčešće upotrebljavan

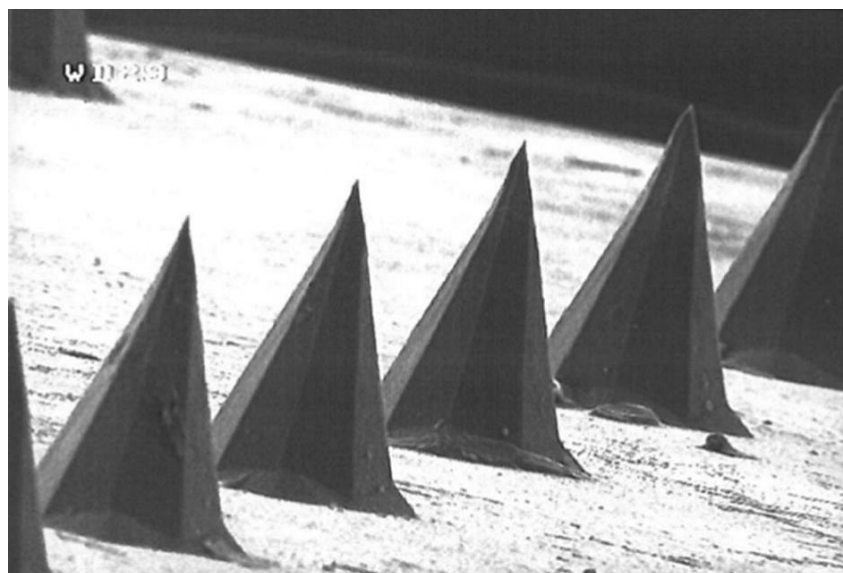
uređaj za određivanje penetracije i permeacije ljekovite supstance iz farmaceutskih oblika za transdermalnu primjenu i simuliranje *in vivo* ponašanja (53).



Slika 3-11. Franz-ova difuziona ćelija: (a) prednja strana (b) gornja strana.

Ispitivanje perkutane penetracije PDLLA nanočestica i rastvorljivih mikroigala kroz uzorke kože svinje sprovedeno je upotrebom staklene vertikalne Franz-ove difuzione ćelije (PermeGear, Inc., Bethlehem, PA, SAD) prikazane na slici 3-11. Difuziona površina kože, koja je korišćena kao membrana, iznosila je $3,14 \text{ cm}^2$. Donji akceptorski dio ćelije sadržavao je 15 ml 0,1 M fosfatnog pufera (pH 7,4), zagrijanog na 37°C , kako bi na nivou površine kože temperatura bila 32°C . Homogenizacija u akceptorskoj fazi postignuta je stalnim miješanjem rotirajućeg magneta. Prije početka eksperimenta, membrana je postavljena između donorskog i akceptorskog dijela ćelije, i ostavljena 30 minuta radi postizanja ekvilibrijuma sa akceptorskim medijumom. Nakon toga, na kožu su aplikovani uzorci disperzije PDLLA-KET nanočestica (eksperiment 1) ili rastvorljivih mikroigala sa PDLLA-KET nanočesticama (eksperiment 2). U prvom eksperimentu, prije aplikacije disperzije nanočestica cijela površina kože je tretirana sa nizom od 36 silikonskih ImmuPatch mikroigala (Tyndal institut, Irska), na površini od 1 cm^2 ('poke and patch' pristup). Visina ImmuPatch mikroigala bila je $200 \mu\text{m}$ (Slika 3-12). Za kontrolne uzorke, disperzija PDLLA-KET nanočestica je aplikovana na kožu prethodno tretiranu ravnom silikonskom potpornom membranom bez mikroigala (eng.

flat patch), i smatrala se netretiranom kožom. U drugom eksperimentu, rastvorljive mikroigle ($144/\text{cm}^2$) izrađene od PDLLA-KET nanočestica (DMN 1), aplikovane su na uzorke kože svinje pomoću adhezivne 3M trake (1516 Poly Med, 3M Limited, Irska). Sa ciljem ispitivanja potencijalnog produženog oslobađanja ketoprofena inkapsuliranog u nanočestice, kao kontrolni uzorci u drugom eksperimentu korišteni su uzorci rastvorljivih mikroigala izrađeni od PVA i slobodnog lijeka (DMN 2). Aplikacija rastvorljivih mikroigala vršena je ručno, primjenom sile od oko 1,5 N okomito na potpurnu membranu niza mikroigala ('poke and release' pristup). Svi eksperimenti izvođeni su u toku 24 h, u najmanje 6 replika i pod okluzivnim uslovima, koji su obezbjeđeni primjenom Parafilm® trake (Pechiney Plastic Packaging, IL, SAD) u prvom eksperimentu, i adhezivne 3M trake u drugom eksperimentu.



Slika 3-12. SEM mikrografija Immupatch čvrstih silikonskih mikroigala proizvedenih u Tyndall institutu, Irska.

Za određivanje sadržaja ketoprofena u akceptorskom medijumu, uzorak medijuma uziman je preko bočno postavljene cjevčice na akceptorskom odjeljku i zamjena svježim fosfatnim puferom zagrijanim na 37°C . Uzorci, koji su prikupljeni prema unaprijed definisanim vremenskim intervalima u volumenu od 1 ml, direktno su analizirani pomoću HPLC metode ili su prethodno tretirani sa acetonitrilom sa ciljem rastvaranja nanočestica koje su potencijano permeirale kroz membranu. U ovom drugom slučaju, prije određivanja sadržaja lijeka HPLC tehnikom, vršeno je

centrifugiranje uzoraka u toku 15 minuta (14,000 obrtaja/min). Rezultati su predstavljeni grafički, a transdermalni fluks ketoprofena je dobijen iz nagiba krive u grafiku koji daje prikaz količine ketoprofena koji je permeirao u receptorski medijum po jedinici permeacione površine u funkciji vremena (J_s , $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$). Lag vrijeme je određeno iz odsječka na x-osi istog grafika (T_{lag} , h), dok je koeficijent permeacije (K_p , cm/h) izračunat dijeljenjem vrijednosti dobijenog fluksa i početne koncentracije ketoprofena (55).

Metode ekstrakcije lijeka deponovanog u uzorcima kože svinje. Nakon eksperimenta na Franz-ovoj ćeliji, određena je količina lijeka deponovana u različitim slojevima uzoraka kože svinje. Za tu namjenu, korišćena je tehnika adhezivnih traka (Scotch[®] 90M-12PK tape, SAD) kako bi se izolovao površinski sloj kože (SC), dok je za separaciju epidermisa i dermisa korišćena tehnika zagrijavanja uzoraka kože na 60°C u toku 90 sekundi (158). Prva traka u toku primjene tehnike adhezivnih traka tretirana je posebno i predstavljala je količinu ketoprofena koji se zadržao na površini kože i nije penetrirao kroz SC. Potom je ostatak površinskog sloja odstranjen sa 18 traka, koje su podvrgnute ekstrakciji korišćenjem acetonitrila (eksperiment 1) ili metanola (eksperiment 2). Ostatak epidermisa je nakon zagrijavanja pažljivo odvojen od dermisa pomoću pincete. Rastvarač za ekstrakciju ketoprofena iz epidermisa i dermisa je takođe bio acetonitril ili metanol, u zavisnosti od eksperimenta. Osim rastvarača za ekstrakciju, i metoda homogenizacije ovih slojeva kože bila je različita za eksperimente 1 i 2. U eksperimentu 1 (disperzija PDLLA-KET nanočestica) homogenizacija je vršena u vodenom kupatilu na 40°C, tokom 12 sati uz konstantno miješanje, a potom su uzorci centrifugirani 15 minuta pri 14000 obrtaja/min. Uzorci epidermisa i dermisa u eksperimentu 2 su uz dodatak metanola homogenizovani u MagNa-Lyser uređaju za homogenizaciju bioloških tkiva (Roche Diagnostics, IN, SAD), uz upotrebu keramičkih kuglica (Slika 3-13). Vršena su 4 ciklusa homogenizacije u trajanju od 60 sekundi i pri 6500 obrtaja/min. Uzorci su potom centrifugirani pri 14000 obrtaja/min u toku 3 minute. Supernatanti uzoraka iz oba eksperimenta su potom filtrirani kroz membranski filter (0,2 μm) i analizirani na sadržaj ketoprofena primjenom HPLC tehnike.

Izvršena je i validacija metode ekstrakcije lijeka iz kože svinje (eng. *recovery test*) inkubacijom netretiranih (blank) uzoraka kože sa rastvorom poznate koncentracije

lijeka. Rezultati ovog testa su pokazali da je efikasnost metode ekstrakcije primjenjene u eksperimentu 1 i 2 bila $94,8 \pm 2,9\%$ i $96,2 \pm 3,2\%$, respektivno.



Slika 3-13. MagNa-Lyser uređaj za homogenizaciju bioloških tkiva.

3.2.8. Metode statističke obrade dobijenih rezultata

U cilju statističke analize podataka i rezultata svih faza eksperimentalnog rada primjenjena je jednofaktorska ili dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) i/ili Studentov t-test, u zavisnosti od broja ispitivanih uzoraka. Za tu namjenu, kao i za cjelokupnu grafičku obradu rezultata, korišćen je GraphPadPrism 5.0 softver. Statistički značajne razlike definisane su za p vrijednosti ispod 0,05.

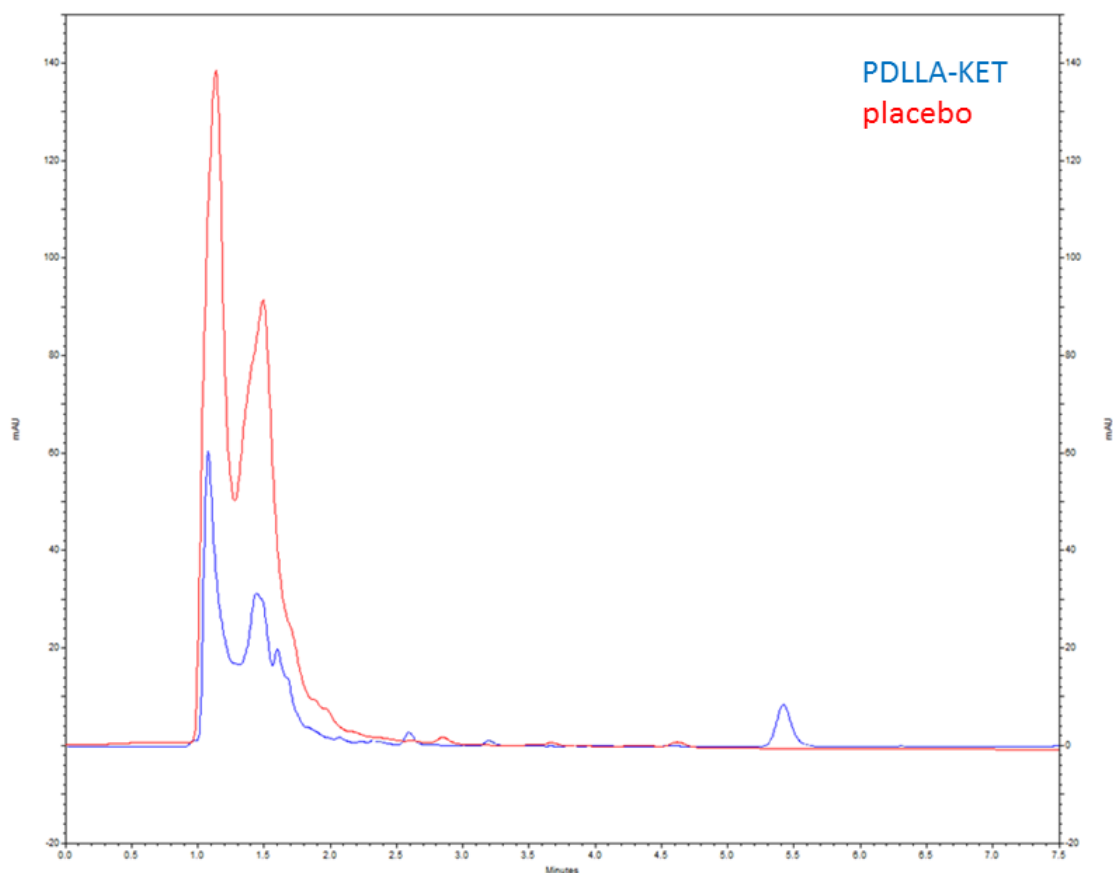
4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Formulacija i karakterizacija polimernih nanočestica sa inkapsuliranim ketoprofenom

Primjenom modifikovane metode izmještanja solvensa i liofilizacije formirane su PDLLA nanočestice u okviru kojih je inkapsuliran ketoprofen, ljekovita supstanca teško rastvorljiva u vodi. Ovaj proces je optimizovan sa ciljem postizanja pravilnih, sfernih, unimorfni čestica submikronskih dimenzija nosača i visokog stepena inkapsulacije lijeka. Uspješnost primjene odabranih metoda sinteze PDLLA-KET nanosfera potvrđena je različitim fizičko-hemijskim i biofarmaceutskim tehnikama karakterizacije, korištenih u ovom radu.

4.1.1. Razvoj i validacija HPLC metode za identifikaciju inkapsuliranog ketoprofena

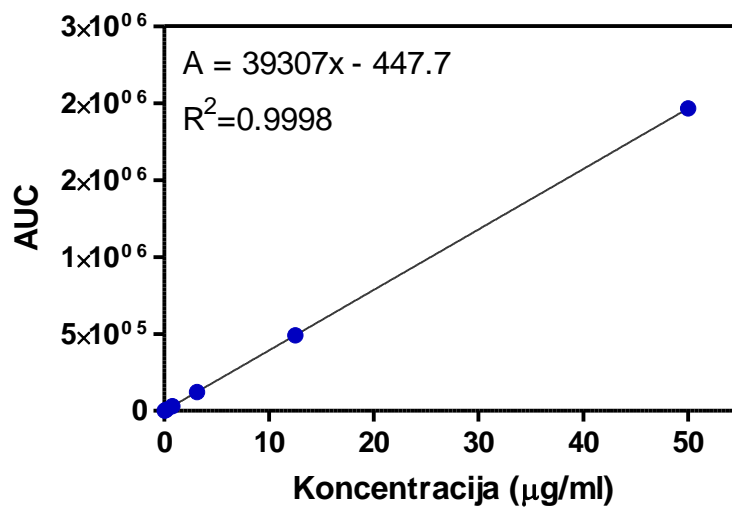
Selektivna i specifična RP-HPLC metoda razvijena je, testirana i validirana za kvantitativno određivanje ketoprofena u uzorcima dobijenim u svim fazama eksperimentalnog rada. Razvoj metode započet je na osnovu literaturnih podataka za hromatografske uslove određivanja ketoprofena (145, 159). Inicijalne analize su rađene korišćenjem mobilne faze čiji sastav su činili različiti odnosi acetonitrila i vode, i praćeno je nekoliko osnovnih hromatografskih parametara (simetrija pika, retenciono vrijeme). Kako bi se podesili parametri koji su najpogodniji za dati hromatografski sistem (kolona, detektor), sastav inicijalne mobilne faze je neznatno izmjenjen. što je rezultiralo odgovarajućom simetrijom pika i kratkim retencionim vremenom ketoprofena. Opis konačno određenih parametara postavljene hromatografske metode dat je u poglavlju 3.2.2. Za procjenu kvaliteta i pouzdanosti dobijenih rezultata razmatrani su analitički parametri za validaciju metode, prema ICH smjernicama. Validacija metode predstavlja proces kojim se potvrđuje da je analitička metoda, upotrebljena u nekom specifičnom ispitivanju, odgovarajuća za datu svrhu (146). Budući da su u ovom radu razvijeni novi polimerni nosači za transdermalnu isporuku ketoprofena i da su nepoznate interakcije između lijeka i ekscipijenasa upotrebljenih za izradu nanočestičnih sistema, razvoj analitičke metode za precizno, tačno, selektivno i specifično kvalitativno i kvantitativno određivanje lijeka bio je osnovni preduslov za cjelokupan eksperimentalni rad.



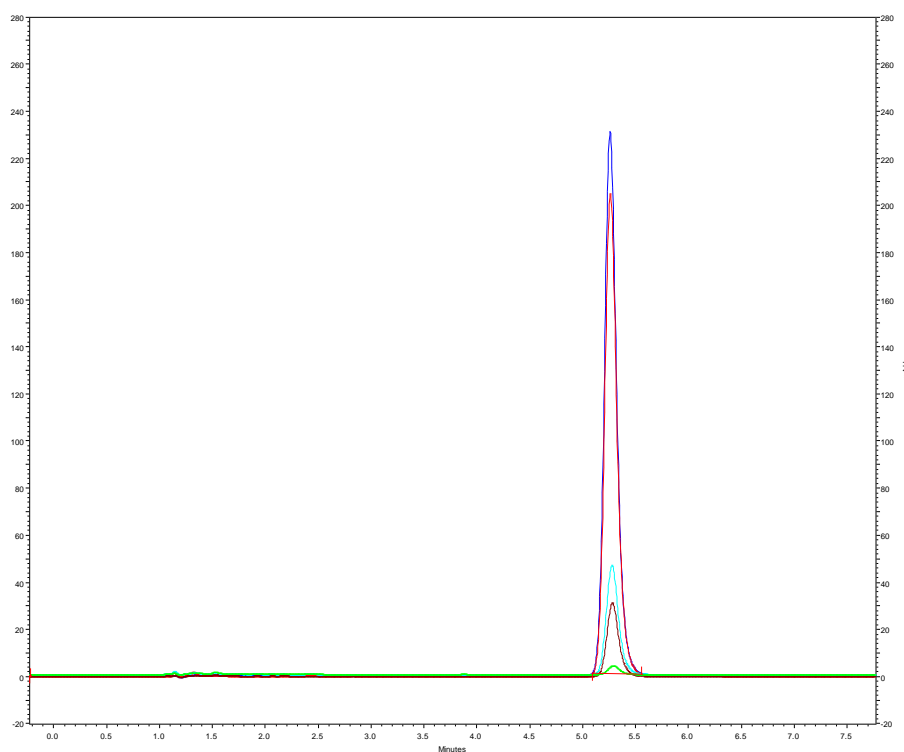
Slika 4-1. Hromatogram uzoraka placebo i PDLLA-KET nanočestica.

Specifičnost analitičke metode je sposobnost da se jasno detektuje analit pored komponenti koje mogu biti prisutne u uzorku (146). Specifičnost metode ispitana je upoređivanjem hromatograma dobijenih analizom uzoraka PDLLA nanočestica sa i bez inkapsuliranog ketoprofena (Slika 4-1). Utvrđeno je da u uzorcima nanočestica sa inkapsuliranim lijekom nema interferirajućih signala čija retenciona vremena odgovaraju retencionom vremenu ketoprofena. Rezultirajući hromatogrami su pokazali zadovoljavajuće razdvajanje pikova na osnovu kojih je moguće izvršiti jasnu procjenu analita u prisustvu ostalih komponenti prisutnih u sistemu (ekscipijensi, ostaci rastvarača, produkti degradacije i/ili jedinjenja koja mogu nastati reakcijom aktivne supstance i ekscipijenasa). Budući da spektar analiziranog placebo uzorka ne pokazuje interferirajuću apsorpciju na ispitivanoj talasnoj dužini od 255 nm, osnovni kriterijum prihvatljivosti je zadovoljen, te se postavljena metoda može smatrati specifičnom i selektivnom za određivanje ketoprofena u prisustvu ekscipijenasa.

(a)



(b)



Slika 4-2. Linearnost HPLC metode: (a) kalibraciona kriva ketoprofena, i (b) pripadajući hromatogrami.

Linearnost analitičke metode je njena sposobnost da se dobiju rezultati koji se nalaze u okviru zadanog opsega, i direktno su proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Opseg metode predstavlja donju i gornju granicu koncentracije analita koji se

može odrediti. Analizom serije standardnih rastvora ketoprofena u rastućim koncentracijama dobijeni su grafici zavisnosti površine ispod pika (AUC) od koncentracije ketoprofena ($\mu\text{g/ml}$). Parametri linearne zavisnosti površine ispod pika od koncentracije (koeficijenti korelacije, odsječci na y-osi, nagibi prave), su izračunati regresionom analizom i prikazani na Slici 4-2, zajedno sa kalibracionom krivom i pripadajućim hromatogramima. Linearnost metode je, pomoću navedenih parametara, za ketoprofen demonstrirana u opsegu 0,05-50 $\mu\text{g/ml}$. Svaka tačka kalibracione krive dobijena je kao rezultat tri injektovanja ispitivanih rastvora. Dobijeni rezultati pokazuju da je ispunjen uslov linearnosti (vrijednost koeficijenta korelacije veća je od 0,999), što ukazuje na funkcionalnu zavisnost između koncentracije i površine pika ketoprofena.

Rezultati ispitivanja tačnosti metode za ketoprofen prikazani su u Tabeli 4-1. Tačnost analitičke procedure ukazuje na ispravnost mjerenja i predstavlja mjeru usaglašenosti između vrijednosti koja se smatra stvarnom i vrijednosti koja je eksperimentalno određena (160). Koncentracije analiziranih standardnih rastvora su izabrane jer pokrivaju cjelokupan opseg mjerenja a nisu identične tačkama kalibracione krive. U Tabeli 4-1 prikazan je i prosječni procenat prinosa eksperimentalne i teorijske vrijednosti koncentracije ketoprofena za tri ispitivane koncentracije, koji je izračunat zajedno sa standardnom devijacijom (SD), koeficijentom varijacije (CV) i intervalom pouzdanosti (CI) za nivo vjerovatnoće 95%. Procentualni odnos eksperimentalno određene koncentracije ketoprofena i teorijske vrijednosti koncentracije nalazi se u propisanim granicama, 99-101%. Dobijene vrijednosti ukupnog prosječnog procenta prinosa ($99,9 \pm 0,55\%$) i koeficijenta varijacije ($1,09 \pm 0,16\%$) ukazuju na odličnu korelaciju i minimalno odstupanje eksperimentalnih i teorijskih vrijednosti.

Tabela 4-1. Rezultati tačnosti za različite koncentracije standardnog rastvora ketoprofena.

Teorijska koncentracija ($\mu\text{g/ml}$)	Eksperimentalno određena koncentracija ($\mu\text{g/ml}$)	Procenat prinosa (%)	CV (%)	CI
0,06	$0,0597 \pm 0,001$	99,5	1,22	0,05914-0,06026
25	$24,973 \pm 0,213$	99,89	0,91	24,8-25,15
40	$40,236 \pm 0,435$	100,59	1,15	39,88-40,59

CV-koeficijent varijacije. CI-interval pouzdanosti za nivo vjerovatnoće 95%.

Preciznost analitičke procedure izražava bliskost slaganja između serija mjerenja dobijenih višestrukim uzorkovanjem istog uzorka pod opisanim uslovima. Za ispitivanje ponovljivosti, standardni rastvori ketoprofena istih koncentracija koje su korišćene za procjenu tačnosti metode, injektovani su tokom tri uzastopna dana. Za svaku analiziranu komponentu, izračunate su srednje vrednosti dobijenih koncentracija, koeficijenti varijacije (CV), kao i intervali pouzdanosti (CI) za nivo vjerovatnoće 95% (Tabela 4-2). Dobijene vrijednosti koeficijenta varijacije manje od 1%, ukazuju na odgovarajuću ponovljivost metode primjenjene za kvantitativno određivanje ketoprofena. Ispitana je i intermedijarna preciznost u toku tri različita dana za iste odabrane koncentracije. Razlika srednjih vrijednosti koncentracija ispitivanih standardnih rastvora dobijenih kod ispitivanja ponovljivosti i intermedijarne preciznosti (Δ) iznosi 0,11%. Ovime je zadovoljen kriterijum da je $\Delta \leq \pm 2,0\%$ i može se zaključiti da je metoda precizna.

Tabela 4-2. Rezultati preciznosti za različite koncentracije standardnog rastvora ketoprofena.

Teorijska koncentracija ($\mu\text{g/ml}$)	Dan	Sr. vrijednost koncentracija ($\mu\text{g/ml}$)	CV (%)	CI
Intermedijarna preciznost (n=3)				
0,06	1	0,05936	0,76	0,05824-0,6048
25	1	0,06013	0,94	0,05872-0,06153
40	1	0,05985	0,63	0,05891-0,06078
0,06	2	24,95	0,51	24,63-25,27
25	2	24,94	0,70	24,51-25,37
40	2	25,02	0,53	24,70-25,35
0,06	3	40,18	0,90	39,28-41,08
25	3	40,71	0,91	39,79-41,64
40	3	39,91	0,38	39,53-40,28
Ponovljivost (n=10)				
0,06	-	0,05964	0,82	0,05929-0,05999
25	-	25,04	0,98	24,86-25,22
40	-	39,87	0,94	39,87-40,40

CV-koeficijent varijacije. CI-interval pouzdanosti za nivo vjerovatnoće 95%.

Limit detekcije (LD) i limit kvantifikacije (LQ) su određeni analizom serije standardnih rastvora ketoprofena, u koncentracijama 0,0008 - 0,2 µg/ml. Koncentracija pri kojoj je odnos signala i šuma iznosio približno tri, predstavljala je limit detekcije za ketoprofen. Koncentracija pri kojoj je odnos signala i šuma iznosio približno 10, predstavljala je limit kvantifikacije za ketoprofen. U datim hromatografskim uslovima, vrijednosti granica detekcije i kvantifikacije za ketoprofen iznosile su 0,04 µg/ml i 0,12 µg/ml, respektivno.

Rezultati dobijeni za sve parametre validacije odgovaraju kriterijumima prihvatljivosti i dokazuju da je predložena metoda specifična, selektivna, precizna, tačna i reproduktivna za kvalitativno i kvantitativno određivanje ketoprofena inkapsuliranog u polimerne nanočestice.

4.1.2. Optimizacija procesa inkapsulacije ljekovite supstance u polimerne nanočestice

U toku optimizacije procesa inkapsulacije ketoprofena u PDLLA nanočestice primjenjen je pun faktorijalni dizajn sa tri nezavisno promjenljive na dva nivoa: koncentracija lijeka (0,025% m/v i 0,5% m/v), vrsta stabilizatora (PVA i P188) i brzina ukapavanja organske faze u vodenu (0,5 ml/min i 1 ml/min). Ostali parametri procesa (zapremina organske i vodene faze, brzina miješanja u toku ukapavanja i promjer kapi) održavani su konstantnim. Dobijene vrijednosti odgovora (efikasnost inkapsulacije) pri različitim kombinacijama nezavisno promjenljivih prikazane su u Tabeli 4-3. Uočava se da su najveće procente inkapsulacije lijeka imale formulacije F2 i F4. U obe ove formulacije kao stabilizator upotrebljen je PVA i ista koncentracija lijeka. Primjenom istih uslova i druge vrste stabilizatora (P188) dobijene su niže vrijednosti ispitivanog odgovora sistema. Sa ciljem potvrde ovih nalaza i identifikacije značajnih nezavisnih promjenljivih, izvršena je statistička analiza dobijenih rezultata primjenom softverskog paketa Minitab 16. Rezultati ove analize su pokazali da od ispitivanih faktora, na efikasnost inkapsulacije značajan uticaj imaju koncentracija ketoprofena i vrsta stabilizatora (Slika 4-3).

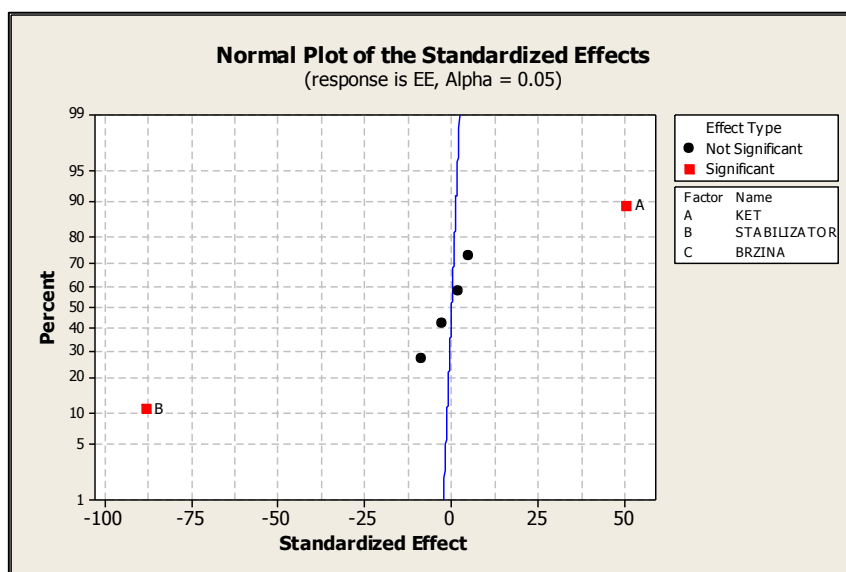
Tabela 4-3. Efikasnost inkapsulacije ketoprofena za različite vrijednosti zavisnih parametara u procesu dobijanja PDLLA nanočestica.

Formulacija	Koncentracija ketoprofena (% m/v)	Vrsta stabilizatora	Brzina ukapavanja (ml/min)	Efikasnost inkapsulacije (%) \pm SD	Sadržaj ketoprofena (%) \pm SD
F1	0,025	PVA	1	69,7 \pm 1,42	6,38 \pm 1,08
F2	0,05	PVA	1	74,1 \pm 1,13	7,18 \pm 0,67
F3	0,025	PVA	0,5	70,6 \pm 0,99	6,39 \pm 1,07
F4	0,05	PVA	0,5	75,3 \pm 0,96	7,94 \pm 0,25
F5	0,025	P188	1	60,7 \pm 1,47	6,25 \pm 0,35
F6	0,05	P188	1	65,9 \pm 1,55	6,76 \pm 0,44
F7	0,025	P188	,5	61,0 \pm 2,47	6,11 \pm 0,83
F8	0,05	P188	0,5	66,9 \pm 1,57	7,06 \pm 0,21

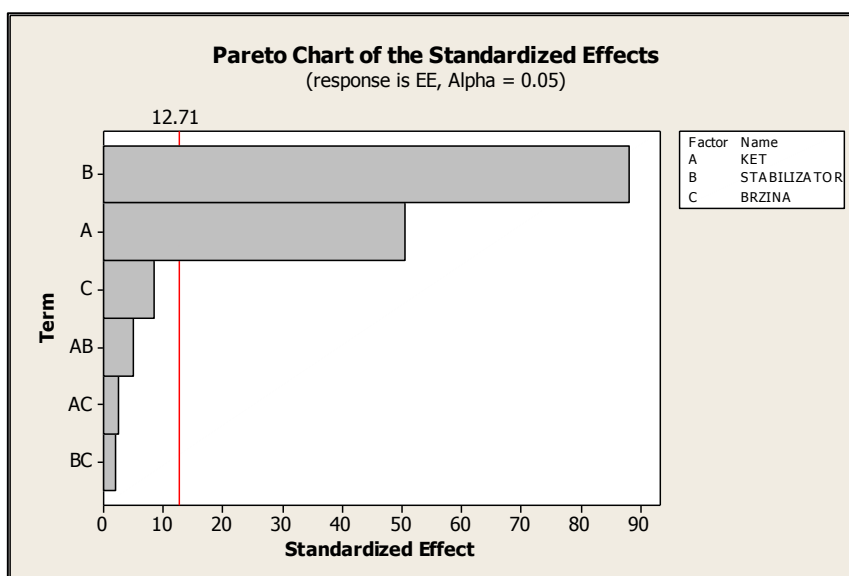
PVA – Polivinil alkohol. P188 – Poloksamer 188. SD – standardna devijacija (n=3).

Budući da značajno efikasniju inkapsulaciju ketoprofena u datim eksperimentalnim uslovima daje PVA, kao stabilizator, u poređenju sa Poloksamerom 188, te da brzina ukapavanja nema uticaja na ispitivane odgovore sistema, za radnu formulaciju odabrana je formulacija F4. Ova formulacija dobijena korišćenjem PVA kao stabilizatora, pri koncentraciji ketoprofena od 0,05% (m/v) i brzinom ukapavanja rastvora od 0,5 ml/min, davela je nanočestice koje su imale najveći stepen inkapsuliranog lijeka koji je iznosio 75,3 \pm 0,96% (Tabela 4-3). Uzimajući u obzir da efikasnost inkapsulacije zavisi od rastvorljivosti ljekovite supstance u rastvaraču, ali i u kontinuiranoj fazi disperzije, rezultati dobijeni u ovom radu u skladu su sa osobinama intermedijarne lipofilnosti ketoprofena (161). Slično tumačenje su prethodno imali Shah i sar (162), koji su u okviru svojih eksperimenata inkapsulirali ketoprofen u PLGA nanočestice sa efikasnošću od oko 80%. Kada je korišćen PDLLA polimer, visoka efikasnost inkapsulacije ketoprofena je postignuta, ali samo u čestične sisteme mikronskih veličina (163). Ricci i sar. su tom prilikom dobili čestice veličine 5 μ m sa efikasnošću inkapsulacije od 74%. Visok procenat inkapsulacije ketoprofena u PDLLA nanočestice, pri eksperimentalnim uslovima postavljenim u ovom radu, ostvaren je zahvaljujući minimalnom isticanju lijeka u spoljašnju vodenu fazu disperzije, što je posljedica slabe rastvorljivosti ketoprofena u vodi.

(a)



(b)



Slika 4-3. Analiza značajnosti faktora na efikasnost inkapsulacije ketoprofena u PDLLA nanočestice: (a) grafik vjerovatnoće normalne raspodjele, i (b) Pareto dijagram.

Iako je primjenjena metoda izrade PDLLA-KET nanočestica rezultirala visokom inkapsulacijom lijeka i bila reproduktivna, precizna i ponovljiva, čak i bolji rezultati mogli bi se postići povećavanjem odnosa lijek-polimer (164). Međutim, primjećeno je da je veličina čestica direktno proporcionalna viskozitetu koji zavisi upravo od različitog odnosa lijek-polimer (161). Stoga se vrijednost koja prelazi 75% može

smatrati visokom inkapsulacijom i dobrim rezultatom, ukoliko su dobijene fine, sferne čestice nanometarskih veličina. Budući da je jedan od osnovnih ciljeva ovog rada bio upravo dobijanje nanosfera, postignuta je optimalna korelacija između željenog oblika, veličine čestica (rezultati predstavljeni u nastavku rada) i ostvarene efikasnosti inkapsulacije.

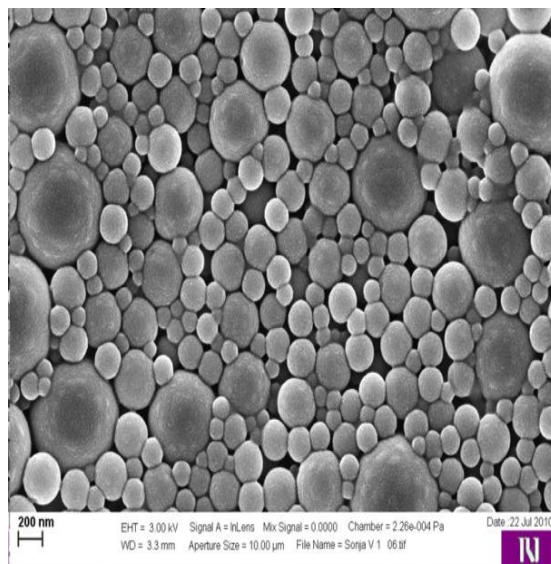
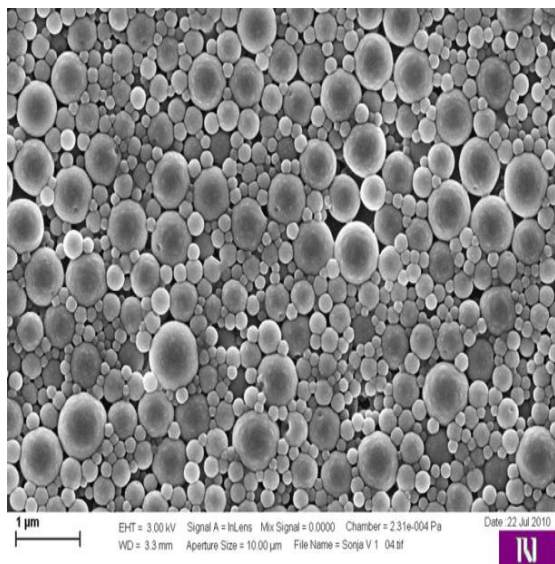
4.1.3. Morfološke i površinske karakteristike PDLLA nanočestica sa inkapsuliranim ketoprofenom

Analizom morfoloških karakteristika dobijenih nanočestičnih sistema pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM) utvrđeno je da ne postoje značajne razlike između placebo PDLLA i PDLLA-KET nanočestica. U oba slučaja, dobijene su pravilne sferne čestice sa glatkom površinom, bez vidljivih znakova porozne strukture i inkapsulacija lijeka nije uzrokovala značajne razlike u morfologiji dobijenih čestica (Slika 4-4). Pored određivanja morfoloških karakteristika, mikroskopske tehnike pružaju mogućnost karakterizacije veličine čestica, koja je bazirana na direktnom posmatranju čestica i definisanoj mjeri dijametra. Izračunate veličine su izražene kao prečnik sfere koja ima istu projektovanu površinu kao projektovana slika čestice. Za određivanje veličine i raspodjele veličina čestica, osim skenirajuće mikroskopije, korišćene su i tehnike foton korelacione spektroskopije (PCS) i laserske difrakcije (LD). Ove tehnike su brze i veoma osjetljive, a njihov osnovni nedostatak je da se odnose samo na sferne čestice i ne daju informaciju o obliku čestica. Osim toga, uzorci disperzija moraju biti razrijeđeni i rezultati se baziraju na matematičkim kalkulacijama, te se dobijene informacije o veličini čestica moraju oprezno interpretirati.

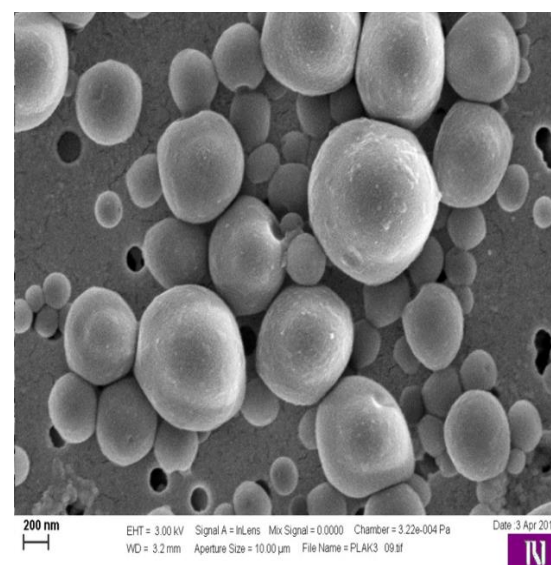
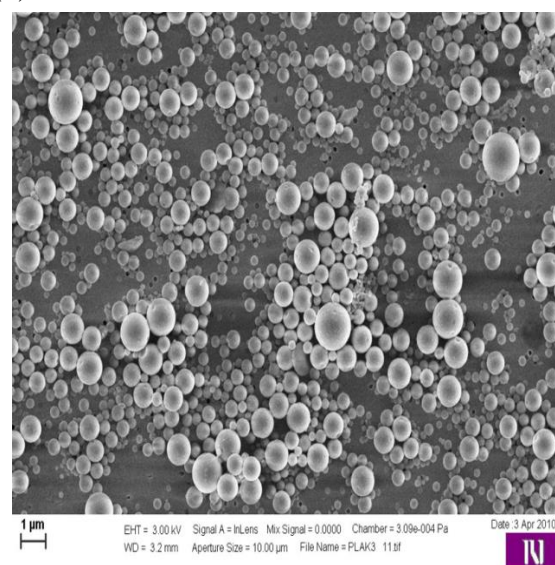
Veličina placebo PDLLA i PDLLA-KET nanosfera izmjerena PCS tehnikom bila je $117,6 \pm 0,55$ nm i $144,8 \pm 1,80$ nm, respektivno. PCS tehnika omogućava mjerenje stepena fluktuacije intenziteta rasute svetlosti usljed Braunovog kretanja čestica u uzorku i njegovog prevođenja u veličinu čestica pomoću Stokes-Einstein-ove jednačine (165). Iako je inkapsulacijom ketoprofena došlo do povećanja veličine PDLLA čestica, koje se pokazalo statistički značajnim (Student T test, $p < 0,001$), indeks polidisperznosti (PDI), koji je određen bio je manji od 0,2 za sva mjerenja, što ukazuje na usku raspodjelu veličina i homogenu populaciju svih ispitivanih uzoraka (Tabela 4-4). Vrijednost indeksa polidisperznosti se, kao mjera kvaliteta ili homogenosti disperzije, kreće od 0 (monodisperzna raspodjela) do 1 (široka raspodjela). Prema literaturnim

podacima, vrijednosti PDI manje od 0,25 smatraju se prihvatljivim i ukazuju na unimodalnu raspodjelu i dobar kvalitet sistema (166, 167).

(a)



(b)



Slika 4-4. SEM mikrografije: (a) PDLLA nanočestica sa inkapsuliranim ketoprofenom i (b) placebo PDLLA nanočestica.

Kao što je već objašnjeno u poglavlju 3.2.3, uređaj Zetasizer Nano koji je korišćen za mjerenje veličine i raspodjele veličina čestica PCS metodom, ne analizira prisustvo velikih čestica i aglomerata čestica, te je tek primjenom Mastersizer uređaja i LD tehnike, karakterizacija veličine i raspodjele veličina čestica sveobuhvatna i potpuna.

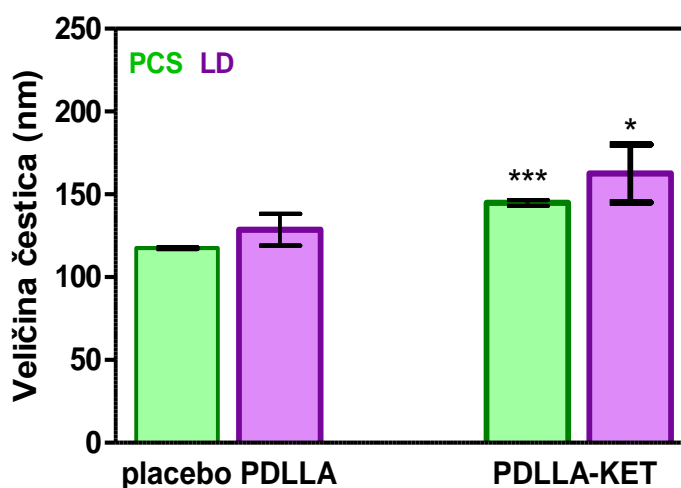
Mastersizer uređaj je podržan softverom koji analizira zavisnost između ugla rasipanja svjetlosti i veličine čestice i daje zapreminsku raspodjelu veličina čestica u određenom volumenu ispitivane disperzije. Rezultati dobijeni LD metodom su izraženi preko LD prečnika čestica (eng. *volume-weighted mean diameters*) $d_{10\%}$, $d_{50\%}$, $d_{90\%}$, koji se označavaju i kao $d(v,0.1)$, $d(v,0.5)$, $d(v,0.9)$. Prečnik $d(v,0.1)$ je veličina čestica na kojoj 10% zapremine uzorka čine čestice čija je veličina manja od „ $d(v,0.1)$ “ vrijednosti. Prečnik $d(v,0.5)$ (eng. *median volume particle size*) znači da 50% zapremine uzorka sadrži čestice manje od „ $d(v,0.5)$ “ vrijednosti, a 50% uzorka čine čestice veće od ove vrijednosti. Prečnik $d(v,0.9)$ znači da 90% zapremine uzorka ima veličinu čestica manju od „ $d(v,0.9)$ “ vrijednosti, i predstavlja osjetljiv parametar za utvrđivanje prisustva većih čestica, kao i agregata čestica (168). Rezultati analize veličine i raspodjele veličina nanosfera tehnikom LD takođe su dokazali usku raspodjelu veličina gdje je 50% PDLLA-KET nanosfera i placebo PDLLA bilo manje od 163 ± 17.47 nm odnosno 129 ± 9.50 , respektivno (Slika 4-5). Iako su rezultati analize veličine i raspodjele veličina čestica primjenom opisanih tehnika pokazali izvjesne razlike, odstupanja su minimalna i bez statističke značajnosti (Student T test, $p > 0.05$).

Tabela 4-4. Površinske karakteristike i raspodjela veličina čestica placebo PDLLA i PDLLA nanočestica sa inkapsuliranim ketoprofenom određene PCS metodom.

Uzorak	Veličina čestica (nm)	PdI	Zeta potential (mV)
placebo PDLLA	$117,6 \pm 0,55$	$0,16 \pm 0,02$	$-26,5 \pm 1,79$
PDLLA-KET	$144,8 \pm 1,80$	$0,12 \pm 0,02$	$-27,6 \pm 0,82$

Određena odstupanja u veličini čestica uočavaju se i poređenjem pomenutih rezultata sa vrijednostima dobijenim skeniranjem uzoraka na elektronskom mikroskopu. Ova neslaganja mogu se objasniti različitom pripremom uzoraka za analizu prije samog mjerenja, što su već ranije objasnili Sheihet i sar. kada su analizirali uticaj inkapsulacije lipofilnih model supstanci na veličinu nanosfera baziranih na tirozinu (169). Naime, sušenjem uzoraka u toku pripreme za analizu elektronskom mikroskopijom, može dovesti do povećanja veličine čestica i neznatnih razlika u njihovoj distribuciji veličina. Od ranije je poznato da veličina čestica utiče na selektivnu i ciljanu isporuku lijeka u specifične strukture i populacije ćelija (170). Pri tome, definisano je i nekoliko faktora

od kojih zavisi veličina čestica, a to su: polarnost rastvarača, koncentracija polimera u organskoj fazi, odnos unutrašnje i kontinuirane faze disperznih sistema, odnos lijek-polimer, kao i koncentracija upotrebljenog stabilizatora (38, 171, 172). Uzimajući u obzir sve pomenute faktore, rezultati dobijeni u sveobuhvatnoj analizi veličine i raspodjele veličina čestica ukazuju da su procesni parametri izabrani za formulaciju F4 optimalni za dizajniranje nanonosaa za ketoprofen. Osim toga, upotrebom placebo uzoraka koja je imala za cilj da se ispituju efekti inkapsulacije lijeka na osobine dobijenih polimernih nanočestice, dobijeni su rezultati koji ukazuju da proces inkapsulacije ketoprofena nije doveo do promjene morfoloških karakteristika, oblika i raspodjele veličina sintetisanih PDLLA nanočestica.



Slika 4-5. Uporedni prikaz veličina placebo PDLLA i PDLLA-KET sfera primjenom tehnika fotonkorelacione spektroskopije (PCS) i laserske difrakcije (LD). Sr.vrijednost \pm SD, $n=3$. Student T test, * $p<0,05$, *** $p<0,001$ statistički značajne razlike u odnosu na placebo uzorke.

Zeta potencijal približno karakteriše površinsko naelektrisanje čestica i jedan je od faktora koji ukazuje na njihovu fizičku stabilnost. Smatra se da ukoliko sve čestice u disperziji imaju visoke apsolutne vrijednosti zeta potencijala (>30 mV), doći će do njihovog međusobnog odbijanja što povećava stabilnost sistema (173). Mjerenjem zeta potencijala uzoraka nanočestica dobijeni su očekivani rezultati koji ukazuju na negativno naelektrisanu površinu placebo PDLLA i PDLLA-KET nanočestica. Vrijednosti ovog parametra za placebo uzorke i PDLLA-KET nanočestice iznosile su -

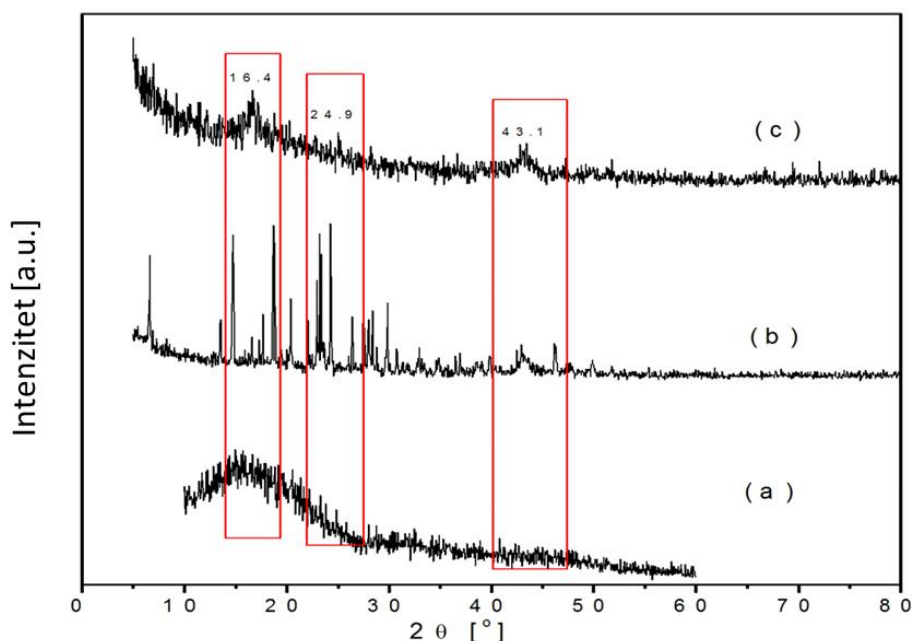
26.5 ± 1.79 mV i -27.6 ± 0.82 mV, respektivno (Tabela 4-4). Ovakvi rezultati nisu pokazali statističku značajnost (Student T test, $p > 0.05$). PDLLA je poliester i očekivano negativno naelektrisanje čestica potiče od karboksilnih grupa na njihovoj površini (174). Imajući u vidu pozitivnu naelektrisanost ekstracelularne i negativnu naelektrisanost intracelularne strane ćelijske membrane, kao i to da ćelijska membrana ima pozitivnu razliku potencijala, naelektrisanje površine čestica bi trebalo dizajnirati sa posebnom pažnjom i prilagoditi ga specifičnim potrebama za koje je materijal sintetisan (175). Iako su apsolutne vrijednosti zeta potencijala uzoraka nanočestica ispitivanih u ovom radu bile neznatno manje od 30 mV, u literaturi je opisano da i vrijednost oko -20 mV mogu da obezbijede kratkoročnu stabilnost uzoraka koji su elektrostatički stabilizovani (165, 176). Stabilizacija PDLLA-KET nanočestica je ostvarena kombinacijom elektrostatičkog i sternog efekta. Elektrostatička stabilizacija prisutna je zahvaljujući prisustvu slobodnih karboksilnih grupa na površini polimera koje nose negativno naelektrisanje, dok sternu stabilizaciju čestica obezbjeđuje prisustvo PVA na površini čestica. Uzimajući u obzir ova zapažanja i dobijene vrijednosti zeta potencijala za uzorke ispitivane u našem radu, može se zaključiti da opisani mehanizmi stabilizacije mogu obezbijediti zadovoljavajuću kratkoročnu stabilnost ispitivanih formulacija nanočestica, što su potvrdile i studije stabilnosti, detaljno diskutovane u poglavlju 4.3.1.

4.1.4. Fizičko-hemijska karakterizacija PDLLA nanočestica

Sa ciljem fizičko-hemijske karakterizacije PDLLA-KET nanočestica, uzorci su analizirani korišćenjem metoda rentgenske difrakcije (XRD) i infracrvene spektroskopije (FTIR).

Difrakcija X-zracima je nedestruktivna analitička tehnika koja otkriva informacije o kristalnoj strukturi, hemijskom sastavu i fizičkim osobinama materijala. Kada X-zraci dospiju na površinu kristalnog materijala, dešava se fenomen difrakcije odnosno rasipanja zraka u svim pravcima. Do difrakcije dolazi jer je talasna dužina zračenja istog reda veličine kao i međuatomska rastojanja unutar kristalne rešetke (53). Metoda difrakcije X-zraka je veoma značajna u preformulacionim istraživanjima budući da mehaničke osobine i hemijska stabilnost polimera zavise od kristalne strukture i morfologije, i smatra se najkorisnijom neposrednom metodom za identifikaciju strukture čvrste faze.

Na Slici 4-6. prikazan je XRD difraktogram PDLLA nanočestica sa inkapsuliranim ketoprofenom, uz difrakcijske slike čistog polimera i slobodnog lijeka. XRD difrakcijska slika čistog polimera ne pokazuje nijedan izražen pik dokazujući amorfnu strukturu polimera (Slika 4-6.a). Očekivani izgled difrakcione slike ketoprofena (Slika 4-6.b) pokazuje uske, jasno izražene pikove, karakteristične za kristalnu strukturu lijeka (177). Difraktogram PDLLA-KET nanočestica dobijenih u ovom radu pokazuje primarno amorfnu strukturu analiziranog materijala (Slika 4-6.c). Iako ova difrakciona kriva ne pokazuje oštre pikove, tri jasna difuzna pika se mogu primjetiti na 6.4° (2θ), 24.9° (2θ) i 43.1° (2θ). Ovi pikovi odgovaraju difrakciji kristalne rešetke ketoprofena i preklapaju široku pozadinsku difrakciju amorfne strukture polimera. Ostali signali karakteristični za ketoprofen ne mogu se vidjeti na difraktogramu PDLLA-KET nanočestica zbog veoma malog sadržaja lijeka u uzorku. Međutim, pikovi prikazani na 6.4° (2θ), 24.9° (2θ) i 43.1° (2θ) jasno potvrđuju prisustvo lijeka u PDLLA nanočesticama dobijenim u eksperimentalnom radu.



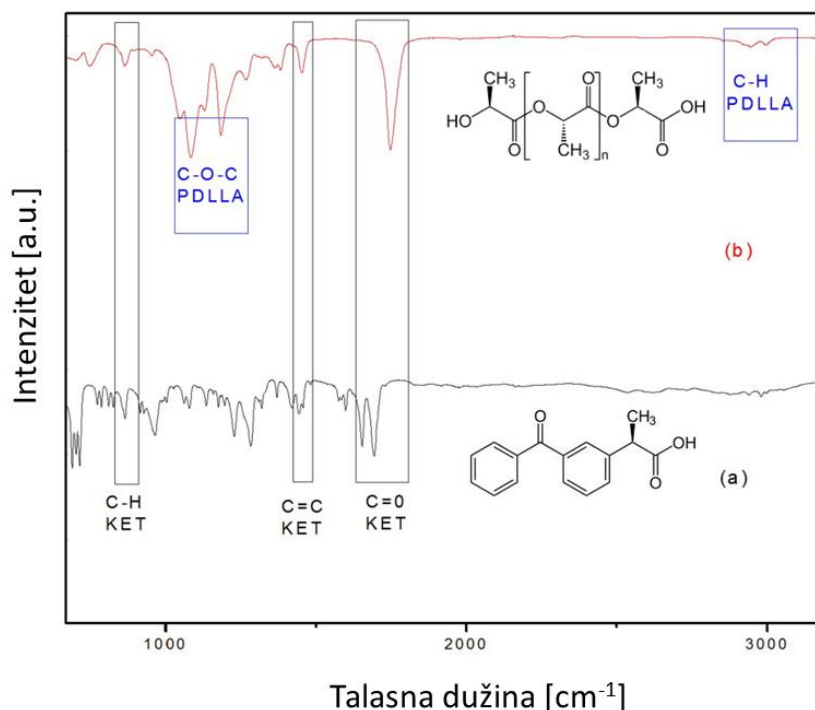
Slika 4-6. XRD difraktogram: (a) PDLLA polimera, (b) ketoprofena i (c) PDLLA nanočestica sa inkapsuliranim ketoprofenom.

Dobijeni dijagrami pokazuju intenzitet u zavisnosti od ugla (2θ), a vrijednosti za rastojanja među ravnima se mogu izračunati iz Bragg-ove jednačine. Određivanje

razmaka među ravanima se, uglavnom, smatra dovoljnim za pozitivnu identifikaciju kristalnog materijala(53).

Sa ciljem da se dobiju dodatne informacije fizičkog stanja ljekovite supstance u ispitivanim nanočestičnim sistemima, primjenjena je metoda FTIR spektroskopije, koja je komplemetarna metodi difrakcije X-zraka. Tehnike vibracione spektroskopije, poput FTIR spektroskopije, korisne su jer pružaju informacije o interakcijama između različitih atoma. Apsorpcioni spektar nastaje kao rezultat kombinovanja upadnog zračenja sa specifičnim transformacijama veza unutar molekula, koje nastaju nakon izlaganja uzorka monohromatskom upadnom zračenju. IR spektroskopija se može izvesti na više načina, među kojim je za eksperimente u ovom radu korišćena tehnika prigušene totalne refleksije. Spektar se snima pomoću dijamantskog detektora, a sam principprigušene totalne refleksije se zasniva na mjeranju promjena do kojih dolazi kada potpuno reflektovana IR svjetlost biva usmjerena ka uzorku. Snop zraka se fokusira na optički gust kristal sa velikim refraktivnim indeksom, što doprinosi nastanku prolaznog talasa. Ovaj talas prodire najdalje do 5 μm od površine kristala, zbog čega uzorak mora biti u bliskom kontaktu sa kristalom. Prednost tehnike prigušene refleksije jeste brzo uzorkovanje i poboljšana reproduktivnost (53).

Na Slici 4-7.a prikazan je FTIR spektar čistog ketoprofena na kojem se uočavaju oštri pikovi na talasnim dužinama 1693 cm^{-1} i 1653 cm^{-1} . Ovi pikovi odgovaraju vibracijama karbonilne grupe iz karboksilne kiseline i ketona u molekuli ketoprofena, respektivno (164). Međutim, spektar uzorka PDLLA-KET nanočestica pokazuje da su ovi jaki pikovi pomjereni ka višim vrijednostima talasnih dužina, čime se potvrđuje prisustvo interakcija između lijeka i polimera. Pretpostavlja se da karboksilna grupa ketoprofena stupa u interkaciju sa karbonilnim grupama u lancu PDLLA, formirajući vodonične veze, koje su vjerovatno odgovorne za ulogu ketoprofena kao plastifikatora u ispitivanom materijalu (178). Postojanje interakcije između lijeka i polimera može modifikovati kinetiku oslobađanja lijeka iz polimernog matriksa. Ketoprofen, kao plastifikator, dovodi do povećanja brzine hidratacije i degradacije PDLLA i odgovoran je za efekat inicijalnog naglog otpuštanja lijeka (rezultati prikazani u poglavlju 4.1.6).



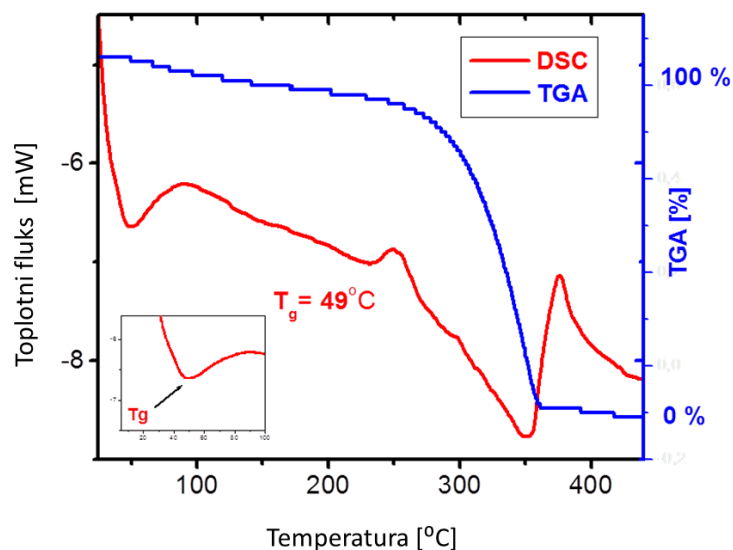
Slika 4-7. FTIR spektar: (a) ketoprofena, i (b) PDLLA nanočestica sa inkapsuliranim ketoprofenom.

Može se zaključiti da prateći pikovi koji se na spektru uzorka nanočestica uočavaju na 1455 cm⁻¹ i 864 cm⁻¹ odgovaraju dvostrukim C=C i C–H vezama aromatičnog prstena ketoprofena, respektivno (Slika 4-7.b). Analizirajući literaturne podatke za FTIR spektar čistog polimera, valentne vibracije koje potiču od C-H veze iz CH₃ grupe i C-H veze u lancu polimera uočavaju se na 2994 cm⁻¹ i 2943 cm⁻¹, respektivno. Međutim, asimetrične i simetrične valentne vibracije C-O-C veza alifatičnog lanca pomjerene su na 1183 cm⁻¹ i 1082 cm⁻¹, respektivno (179, 180). Analiza ovih pikova na FTIR spektru uzorka PDLLA-KET nanočestica, pokazala je da inkapsulacija ketoprofena nije dovela do promjena njihovih pozicija. Budući da su pikovi koji originalno pripadaju funkcionalnim grupama i vezama ketoprofena i polimera uočeni na spektru uzorka nanočestica, može se zaključiti da je metoda FTIR spektroskopije potvrdila kvalitativni sastav uzorka nanočestica, ali i postojanje interakcija između polimera i inkapsuliranog lijeka.

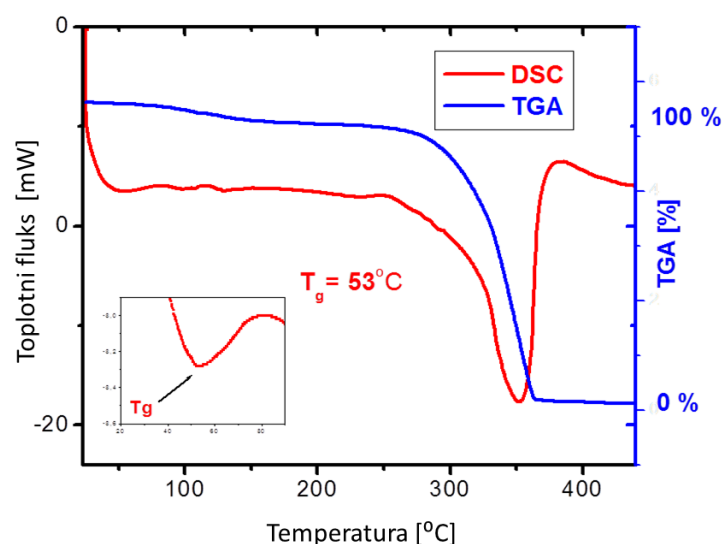
4.1.5. Termalna analiza PDLLA nanočestica

Metodom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC) i termogravimetrijske analize analizirane su termičke karakteristike PDLLA-KET nanočestica. Na Slikama 4-8.a i 4-8.b prikazane su DSC krive dobijene u eksperimentu u kome je ispitivano termalno ponašanje PDLLA nanočestica bez lijeka i sa inkapsuliranim lijekom, respektivno. Kao parametri za poređenje ispitivanih uzoraka uzeti su temperaturni maksimumi pikova i entalpije endotermnih tranzicija. Na DSC krivoj placebo nanočestica uočava se endotermni proces na 49°C, koji je karakterističan za staklasti prelaz polimera PDLLA (163). Ovaj jasno izraženi pik transformisan je u slabi pik na 53°C koji predstavlja temperaturu staklastog prelaza nakon što je u PDLLA čestice inkapsuliran ketoprofen (Slika 4-8.b). Drugi endotermni pik karakterističan za placebo i PDLLA-KET nanočestice uočava se na temperaturama od 250-370°C i predstavlja rezultat procesa oksidativne degradacije. TGA krive prikazane takođe na Slikama 4-8.a i 4-8.b pokazuju sličan trend gubitka mase (eng. *total weight loss*). Značajan gubitak mase placebo nanočestica i čestica sa inkapsuliranim lijekom počinje na temperaturama od oko 300°C i 313°C, respektivno. Primjenom DSC i TGA tehnika bilo je moguće ispitati efekat procesa inkapsulacije lijeka na termalne osobine polimera korišćenog za dobijanje nanočestičnih nosača. Temperatura staklastog prelaza biodegradabilnih polimera može biti modifikovana u toku sinteze i procesa dobijanja nanokompozitnih materijala na bazi polilaktida (181). Prema teoriji slobodnog volumena (eng. *free-volume theory*) i studijama koje su radili Quian i sar. promjene temperature ostakljivanja su rezultat modifikacija u pakovanjima monomera i fenomena kohezionih zapletenosti lanaca polimera (182, 183). Transformacija oblika pika temperature staklastog prelaza iz jakog u blagi pik takođe je odraz konformacionih promjena polimernih lanaca i promjena u svojstvima fleksibilnosti-krutosti (184). Veoma malo povećanje temperature staklastog prelaza od 49 °C do 53 °C ukazuje i na strukturnu relaksaciju lanaca, koja je nastala kao posljedica dodatka ketoprofena (185). Na osnovu poređenja TGA krivih sa placebo PDLLA i PDLLA-KET uzoraka i trenda gubitka mase, može se zaključiti da su čestice sa ketoprofenom termički blago stabilnije i da ketoprofen najvjerojatnije doprinosi fizičkoj stabilnosti sistema na povišenim temperaturama.

(a)



(b)



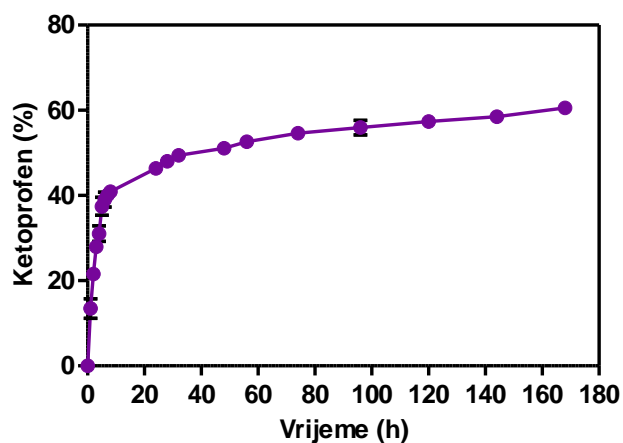
Slika 4-8. Profili DSC i TGA krivih: (a) placebo PDLLA nanočestice, i (b) PDLLA-KET nanočestice.

4.1.6. Brzina oslobađanja lijeka iz polimernih nanočestica u *in vitro* uslovima

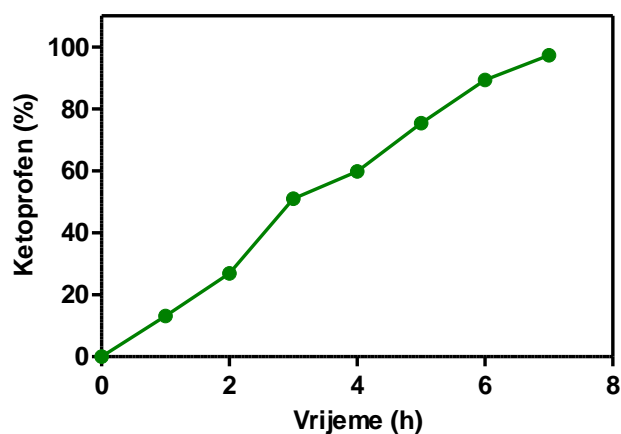
In vitro studije brzine oslobađanja ketoprofena inkapsuliranog u PDLLA nanočestice, imale su za cilj karakterizaciju profila i ispitivanje potencijalnog produženog oslobađanja ovog lijeka, kao i određivanje mehanizma i kinetike procesa oslobađanja. Rezultati su pokazali da je u toku prva 4 sata od početka eksperimenta,

došlo do naglog oslobađanja lijeka pri čemu je otpušteno $31,04 \pm 1,82$ % lijeka. Dalje oslobađanje ketoprofena iz PDLLA nanosfera bilo je produženo i, nakon 7 dana procenat oslobođenog lijeka dostigao je vrijednost od $60,56 \pm 1,28$ % (Slika 4-9.a). Poređenjem ovih rezultata sa profilom oslobađanja slobodnog ketoprofena prikazanog na Slici 4-9.b može se zaključiti da je primjenjena metoda inkapsulacije lijeka u polimerne nanočestice obezbjedila njegovo produženo oslobađanje. Naime, uočava se da je u eksperimentu sa slobodnim ketoprofenom, ista količina od 60% lijeka oslobođena već nakon 4 sata od početka eksperimenta. Primjećeno naglo oslobađanje ketoprofena iz uzoraka PDLLA nanočestica na početku eksperimenta je neočekivano i ne može se pripisati prisustvu slobodnog lijeka na površini nanočestica. Naime, u postupku pripreme svih ispitivanih uzoraka vršeno je uklanjanje slobodnog lijeka iz sistema, pa je vjerovatnije objašnjenje naglog otpuštanja prisustvo interakcija između lijeka i PDLLA polimera, kao i prisustvo molekula lijeka u spoljašnjim slojevima PDLLA nanočestica (186). Slične rezultate dobili su Corrigan i Li za ketoprofen inkapsuliran u PLGA nanočestice sa efikasnošću od 40% (187). U ovom radu, takođe je prikazan efekat naglog oslobađanja ketoprofena iz PLGA nanočestica veličine 540 nm, pri čemu je oko 42 % lijeka oslobođeno tokom prvih 24 h, dok je, nakon 7 dana, vrijednost oslobođenog lijeka dostigla 60%. Uopšteno, oslobađanje lijeka iz koloidnih sistema je kompleksan proces i zavisi od njegove adsorpcije na površinu nanočestica, difuzije kroz polimerni matriks, degradacije polimera, erozije čestica i kombinacije svih ovih procesa (186). Stoga je za potpunu karakterizaciju profila oslobađanja lijeka iz određenih sistema, neophodna primjena matematičkih modela, pomoću kojih je moguće predvidjeti mehanizam oslobađanja ljekovite supstance. Sa istim ciljem, rezultati dobijeni u našem radu dodatno su opisani kinetičkim modelima u kojima se dovodi u vezu količina rastvorene supstance (Q) u funkciji vremena oslobađanja (t), $Q = f(t)$. U tu svrhu, korišteni su modeli: oslobađanja nultog reda, prvog reda, Hixon–Crowel model, Higuchi model i Korsmeyer–Peppas model (151). U Tabeli 4-5 prikazane su vrijednosti kvadrata koeficijenta korelacije (r^2) i konstante brzine oslobađanja (k), dobijene na osnovu linearne regresije matematičkih modela. Ovi parametri su korišteni kao kriterijum za selekciju modela koji najbolje opisuje mehanizam oslobađanja ketoprofena iz ispitivanih uzoraka.

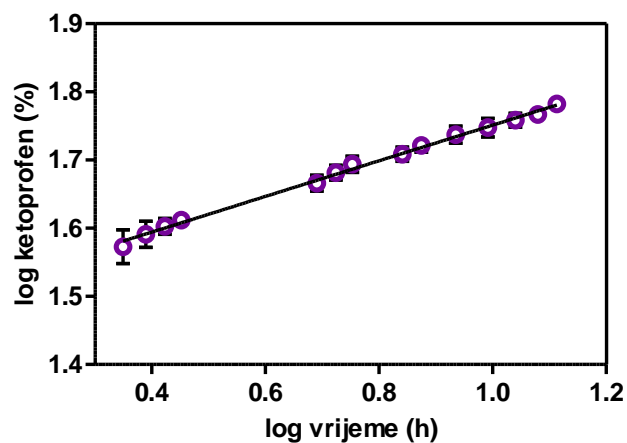
(a)



(b)



(c)



Slika 4-9. Profil oslobađanja ketoprofena u *in vitro* uslovima: (a) oslobađanje ketoprofena iz PDLLA nanočestica, (b) oslobađanje slobodnog lijeka i (c) linearna regresija rezultata oslobađanja lijeka primjenom Korsmeyer-Peppas modela.

Najveća vrijednost kvadrata koeficijenta korelacije dobijena je linearnom regresijom Korsmejer-Peppas modela (0.9965), pokazujući da se profil oslobađanja ketoprofena iz PDLLA nanočestica najbolje uklapa u ovaj kinetički model (Slika 4-9.c). Korsmejer-Peppas model se generalno primjenjuje za analizu studija oslobađanja iz farmaceutskih oblika/nosača na bazi polimera, kada je mehanizam oslobađanja nepoznat ili kada je zastupljeno više mehanizama/fenomena oslobađanja lijeka (186). U okviru svojih istraživanja, Korsmejer i sar. su koristili eksponent oslobađanja (n) kako bi okarakterisali različite mehanizme oslobađanja. Ukoliko je n vrijednost manja ili jednaka 0,45, mehanizam oslobađanja označava se kao Fick-ova difuzija, koja odgovara Higuchi-jevom modelu. Više vrijednosti eksponenta oslobađanja ($0,45 < n < 0,89$) odnose se na tzv. ne-Fick-ov model, kojeg karakteriše nepravilan transport. Ukoliko su n vrijednosti veće od 0,89, oslobađanje lijeka prati model nultog reda, što je u literaturi označeno kao Case-II transport (151, 188). Vrijednost eksponenta oslobađanja u našem radu, iznosila je 0,26, što ukazuje da je oslobađanje lijeka iz nerastvornog polimernog matriksa zasnovano na mehanizmu Fick-ove difuzije (189).

Tabela 4-5. Matematički modeli i parametri oslobađanja ketoprofena inkapsuliranog u PDLLA nanočestice.

Model	r^2	k
Nulti red	0,8474	$K_0 = 0,1305 \text{ (h}^{-1}\text{)}$
Prvi red	0,818	$K_1 = 0,0012 \text{ (h}^{-1}\text{)}$
Hixson-Crowell	0,8474	$K_{HC} = - 3,9159 \text{ (h}^{-1/3}\text{)}$
Higuchi	0,9588	$K_H = 2,0593 \text{ (h}^{-1/2}\text{)}$
Korsmejer-Peppas	0,9965	$K_{KP} = 0,1587 \text{ (h}^{-n}\text{)}, n = 0,2613$

r^2 - koeficijent korelacije. k - konstanta brzine oslobađanja matematičkog modela. n - eksponent oslobađanja.

U literaturi je opisano da se ljekovita supstanca iz nanosfera u kojima je uniformno distribuirana, oslobađa kombinacijom procesa difuzije i erozije matriksa, ukoliko su ostvareni sink uslovi (4). U slučaju formulacije koja je razvijena u našem radu, uočeno je da se proces difuzije, u periodu trajanja eksperimenta, dešava brže nego erozija PDLLA matriksa, te predstavlja glavni mehanizam oslobađanja ketoprofena. U prilog ovim zaključcima su i rezultati dobijeni primjenom Higuchi-jeve jednačine, gdje

visoka vrijednost kvadrata koeficijenta korelacije takođe potvrđuje da je oslobađanje lijeka uglavnom kontrolisano procesom difuzije (Tabela 4-5). U suprotnom, male r^2 vrijednosti dobijene za Hixon-Crowell model ukazuju na veoma malu vjerovatnoću promjene površine ili dijametra nanočestica odnosno oslobađanja lijeka rastvaranjem. Uzimajući u obzir sve navedeno, može se zaključiti da su izrađene PDLLA nanočestice uspješno obezbjedile produženo oslobađanje ketoprofena u *in vitro* uslovima, koje je kontrolisano procesom difuzije.

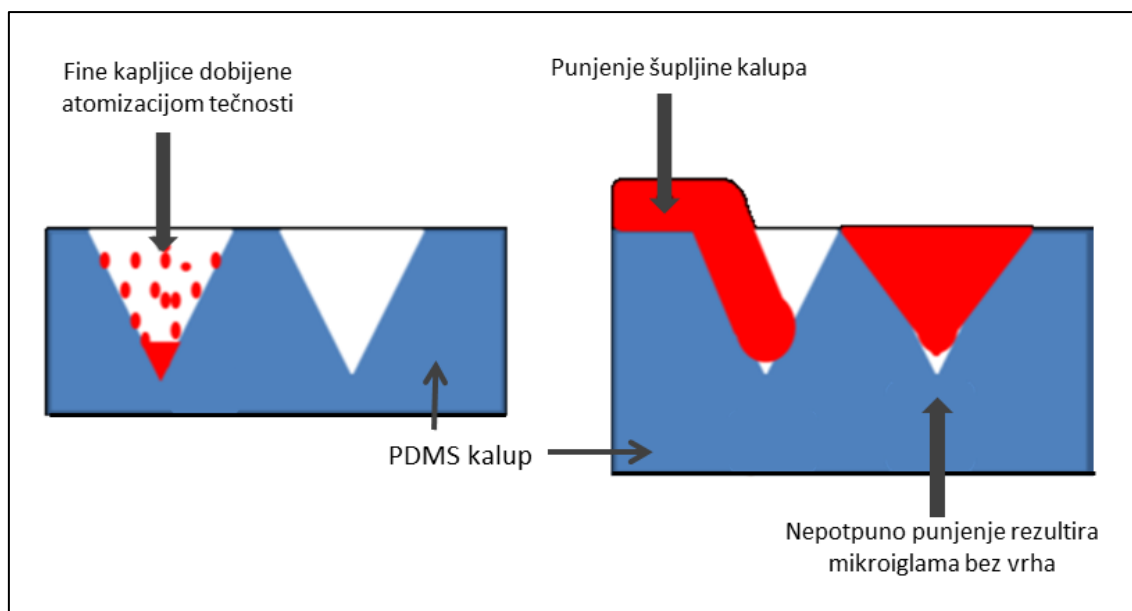
4.2. Formulacija i karakterizacija rastvorljivih mikroigala

4.2.1. Karakterizacija polaznih formulacija za izradu rastvorljivih mikroigala

Rastvorljive mikroigle se izrađuju punjenjem kalupa od polimera, najčešće polidimetilsiloksana (PDMS) odgovarajućim uzorkom/formulacijom. U literaturi su opisane različite metode punjenja PDMS kalupa, koje obuhvataju izlivanje otopljenog materijala/razmekšanog na povišenim temperaturama (121, 190), uz primjenu centrifugiranja, vakuuma ili kombinacije ova dva procesa (115, 117, 129, 191, 192). Za proces punjenja kalupa tečnim uzorkom lijeka, od izuzetne važnosti je da se prethodno razmotre fizičko-hemijske osobine uzorka, poput viskoziteta i površinskog napona. Ove osobine utiču na protok tečnosti u šupljine kalupa, kvašenje zidova kalupa i uklanjanje vazduha koji ispunjava unutrašnjost šupljina kalupa. Budući da su šupljine kalupa mikronskih dimenzija, neophodna je primjena sile (centrifugiranje i/ili vakuum), kako bi se obezbjedilo njihovo potpuno punjenje tečnom formulacijom i otklanjanje vazduha. Jedan od glavnih ciljeva ove doktorske disertacije bio je izrada rastvorljivih mikroigala od polazne formulacije PDLLA-KET nanočestica, dobijene u okviru prve faze eksperimentalnog rada. Budući da su različite metode punjenja kalupa već opisane u literaturi, cilj ovog rada bio je da se ispita mogućnost primjene tehnike atomizacije, odnosno punjenja PDMS kalupa raspršivanjem tečne formulacije pod pritiskom, kao nove metode za izradu rastvorljivih mikroigala. Do sada je ova metoda uspješno primjenjena za oblaganje čvrstih silikonskih mikroigala (118, 193), ali ne i za izradu rastvorljivih mikroigala za lokalnu ili transdermalnu isporuku lijeka.

PDMS se smatra materijalom izbora kad je u pitanju izrada rastvorljivih mikroigala zbog niza prednosti, kao što su hemijska inertnost, termostabilnost, optička

transparentnost, mehanička izdržljivost i ne-higroskopsnost (106). Ipak, ukoliko se za izradu mikroigala koriste vodene formulacije, dolazi do pojave velikog međufaznog napona između tečnosti i PDMS kalupa, koji sprečava potpuno punjenje mikronskih šupljina kalupa (194). Kao rezultat nepotpunog punjenja formiraju se mikroigle bez vrha ili sa tupim vrhom, a može doći i do uklapanja vazduha ili nemogućnosti vađenja mikroigala iz kalupa (Slika 4-10.) Stoga je određivanje kontaktnog ugla koji kap polaznog uzorka/formulacije formira sa površinom PDMS kalupa bilo neophodno prije pristupa izradi rastvorljivih mikroigala. Dobijeni rezultati (Slika 4-11), potvrdili su veoma slabo kvašenje PDMS kalupa. Srednja vrijednost kontaktnog ugla za vodenu disperziju PDLLA-KET nanočestica iznosi $94,1 \pm 2,5^\circ$, dok je ugao koji formulacija PVA-KET formira sa površinom PDMS kalupa neznatno manji i iznosi $92,6 \pm 1,6^\circ$.

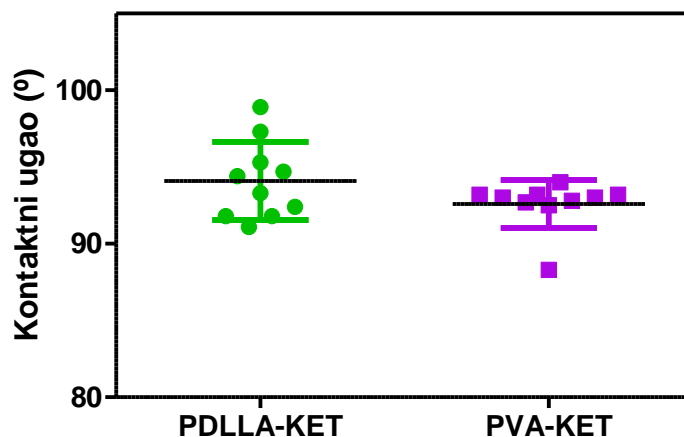


Slika 4-10. Shematski prikaz punjenja PDMS modula i uticaja površinskih karakteristika i viskoziteta tečnih formulacija na ovaj proces.

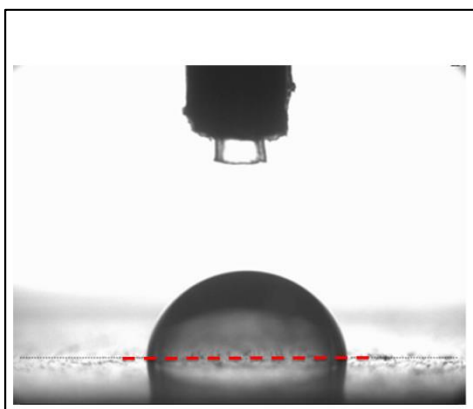
Na osnovu podataka iz literature i dobijenih rezultata moglo se zaključiti da je PDMS hidrofoban materijal i da će njegovo kvašenje polaznim vodenim formulacijama biti veoma slabo. Međutim, ovakve površinske karakteristike PDMS kalupa mogu se prevazići narušavanjem kohezivnih sila vodenog rastvora putem smicanja koje nastaje u mlaznici tokom procesa atomizacije. Stoga se, pri planiranju daljih eksperimenata, pošlo od pretpostavke da bi atomizacija tečnosti u kapljice mikronskih veličina mogla smanjiti

njen površinski napon i omogućiti bolje punjenje šupljine kalupa deponovanjem finih kapljica na njihovu površinu (194). Punjenje kalupa na ovaj način omogućava potpuno kvašenje unutrašnjih površina kalupa (Slika 4-10), bez primjene centrifuge ili vakuuma, do sada najčešće upotrebljivanih metoda za izradu rastvorljivih mikroigala.

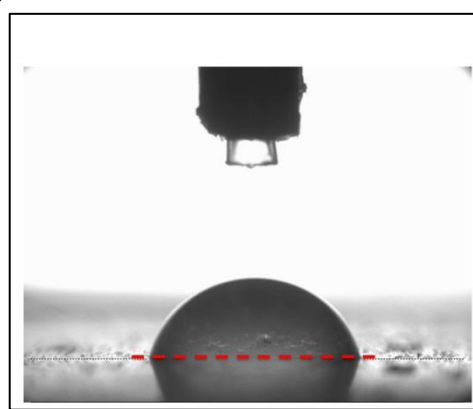
(a)



(b)



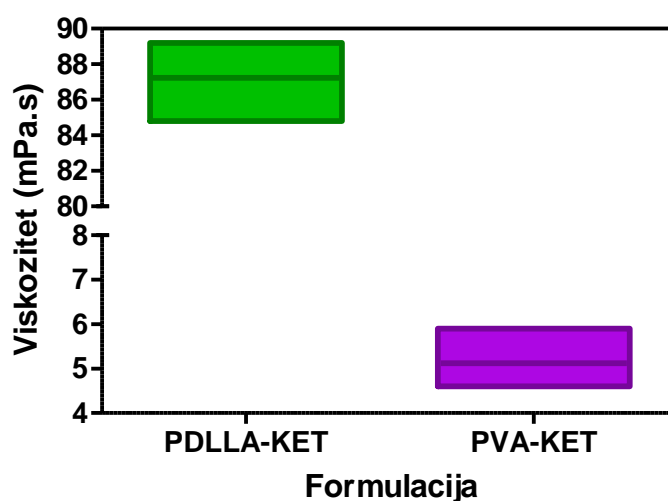
(c)



Slika 4-11. Kontaktni ugao između polaznih formulacija i površine PDMS kalupa: (a) izmjerene vrijednosti ugla i reprezentativni primjeri slika (b) PDLLA-KET i (c) PVA-KET. Sr. vrijednost \pm SD, $n=10$. Student T-test, $p>0.05$.

Viskozitet polaznih formulacija je drugi značajan parametar pri izradi mikroigala procesom atomizacije ili raspršivanja tečnosti pod pritiskom. Naime, pokazalo se da veoma viskozne tečnosti blokiraju mlaznicu i/ili dovode do nepravilnog protoka kroz sistem za atomizaciju (118). Srednje vrijednosti viskoziteta formulacija PVA-KET i

PDLLA-KET prikazane su na Slici 4-12. Viskozitet različitih materijala ispitivali su McGrath i sar. sa ciljem oblaganja silikonskih mikroigala tehnikom raspršivanja (118). U ovoj studiji, autori su prikazali vrijednosti viskoziteta nekih polimernih rastvora koje se smatraju optimalnim za uspješnu primjenu tehnike atomizacije tečnosti. Budući da su vrijednosti viskoziteta disperzije ispitivanih formulacija dobijene u ovom radu bile slične vrijednostima viskoziteta drugih polimernih rastvora objavljenih u studiji McGrath i sar., zaključeno je da se odabrane polazne formulacije mogu upotrijebiti za izradu rastvorljivih mikroigala odabranom metodom atomizacije tečnosti.



Slika 4-12. Vrijednosti viskoziteta polaznih formulacija korištenih za izradu rastvorljivih mikroigala na temperaturi od 20°C. Sr. vrijednost \pm SD, n=5.

4.2.2. Izrada rastvorljivih mikroigala procesom atomizacije i raspršivanja tečnosti

Proces raspršivanja tečnosti pod pritiskom široko se upotrebljava u farmaceutskoj industriji, prije svega za oblaganje tableta, kapsula, granula (195). Slično, ovaj proces je uspješno korišćen i za oblaganje čvrstih silikonskih mikroigala slojem karboksimetilceluloze (CMC) čija je debljina bila svega nekoliko mikrona (118). Na osnovu ovih rezultata, pretpostavilo se da proces atomizacije može biti iskorišten i za punjenje PDMS kalupa, odnosno dobijanje rastvorljivih mikroigala. Na taj način prvo su dobijene rastvorljive mikroigle od različitih polimera, ugljenih hidrata i njihovih kombinacija (194). Uspješni rezultati ovih polaznih formulacija poslužili su da sljedeći

korak u primjeni tehnike atomizacije i raspršivanja tečnosti bude inkorporiranje lijekovite supstance u rastvorljive mikroigle, čiji je osnovni cilj intradermalna i/ili transdermalna isporuka lijeka.

Budući da na proces raspršivanja tečnosti pod pritiskom utiče veliki broj procesnih parametara, za identifikaciju optimalnih uslova korišćen je Taguchi eksperimentalni dizajn. Tokom 80-tih godina prošlog vijeka, Genichi Taguchi je razvio metodu za pronalaženje optimalnih uslova proizvodnje za proizvode visokog kvaliteta bez obzira na variranje procesnih parametara (155). Ovakvi robusni procesi su neosjetljivi na šumove i, radi jednostavnosti pristupa, veoma zastupljeni u industriji. Taguchijev pristup takođe omogućava da se identifikuje uticaj pojedinih faktora, odredi odnos između operativnih uslova i promjenljivih, te konačno uspostavi proces na optimalnom nivou dobijenom na osnovu nekoliko dobro definisanih eksperimentalnih setova (196).

Cilj ove faze eksperimentalnog rada bio je dobijanje uzoraka rastvorljivih mikroigala od disperzije PDLLA-KET nanočestica i rastvora PVA koji sadrži ketoprofen (PVA-KET), metodom atomizovanog raspršivanja. Budući da ova metoda uključuje veliki broj procesnih parametara, primjenjena je Taguchi-jeva L9 ortogonalna matrica kako bi se definisali optimalni eksperimentalni uslovi za dobijanje punog niza od 144 mikroigle, oštih vrhova i pravilnog piramidalnog oblika, čije baze se nalaze na CMC potpornoj membrani površine 1 cm². Vrednovanje dobijenih nizova mikroigala vršena je na osnovu kriterijuma detaljno opisanih u poglavlju 3.2.5. Rezultati vrednovanja morfoloških karakteristika (fizički integritet, oblik i izgled) svake pojedinačne mikroigle predstavljeni su numerički, i kretali su se u opsegu od minimalnih 144 (bez formiranih mikroigala) do maksimalnih 576 bodova (niz sa svih 144 potpuno formiranih pravilnih mikroigala). Eksperimentalni rezultati su potom transformisani u signal/šum odnos (eng. *signal-to-noise ratio*, S/N) i prikazani u Tabeli 4-6. Prema Taguchi metodi eksperimentalnog dizajna, S/N odnos je mjera kvaliteta karakteristika koje odstupaju od željenih (idealnih) vrijednosti i može se definisati sljedećom jednačinom:

$$S/N = -10\log(M.S.D.) \quad [1]$$

gdje je M.S.D. srednja kvadratna devijacija odgovora sistema (197).

Tabela 4-6. Rezultati eksperimenata L9 ortogonalne matrice Taguchi dizajna: srednja vrijednost DMN 1 niza i odnos signal/šum (S/N).

Eksperiment	Rastojanje između mlaznice i kalupa (cm)	Pritisak vazduha (bar)	Otvor mlaznice	Vrijeme raspršivanja (s)	DMN 1 (n=3)	S/N
1	3	0.25	1	10	499,3	33,02
2	3	0.5	3	20	201,7	17,56
3	3	1	5	30	269,3	24,22
4	5	0.25	3	30	151,7	21,14
5	5	0.5	5	10	254,3	20,13
6	5	1	1	20	572,3	47,14
7	7	0.25	5	20	186,7	23,47
8	7	0.5	1	30	453,3	20,74
9	7	1	3	10	145,3	35,98

Generalno, postoje tri kategorije kvaliteta karakteristika u analizi S/N odnosa: *'manje je bolje'*, *'veće je bolje'* i *'nominalno je bolje'* (197). U svakom od ova tri slučaja, veći S/N odnos predstavlja bolje karakteristike kvaliteta, tj. optimalanim nivoom određenog procesnog parametra smatra se onaj koji ima veću vrijednost S/N odnosa. U analizi naših rezultata, primjenjena je kategorija *'veće je bolje'* budući da je cilj bio da se dobiju nizovi mikroigala vrednovanih sa maksimalnim brojem bodova. U okviru ove odabrane kategorije M.S.D. se može izračunati iz formule:

$$M. S. D. = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \frac{1}{Ti^2} \quad [2]$$

gdje je m – broj testova, T_i – vrijednost odgovora i -tog testa (197).

Budući da je eksperimentalni dizajn ortogonalan, moguće je odvojiti efekte svakog ispitivanog faktora na različitim nivoima. Na primjer, srednja vrijednost S/N odnosa za faktor A (rastojanje između mlaznice i PDMS kalupa) na nivoima 1, 2 i 3 izračunata je iz vrijednosti S/N odnosa eksperimenata 1-3, 4-6 i 7-9, respektivno. Na isti način određena je i srednja vrijednost S/N odnosa drugih faktora, i rezultati su prikazani u Tabeli 4-7. U istoj tabeli prikazana je i ukupna srednja vrijednost svih 9 eksperimenata. Iz ove tabele se može vidjeti da među ispitivanim faktorima otvor mlaznice ima najveći, a rastojanje između PDMS kalupa i mlaznice najmanji uticaj na odgovor sistema. Rezultati su prikazani i grafički na Slici 4-13.a.

Tabela 4-7. Odnos signal/šum (S/N) za promjenljive parametre u izradi nizova rastvorljivih mikroigala.

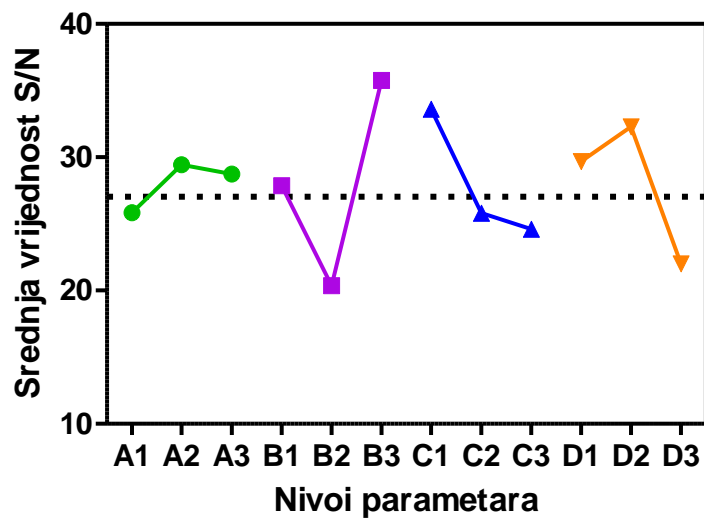
Simbol	Parametar	Srednja vrijednost S/N			
		Nivo 1	Nivo 2	Nivo 3	Δ (max-min)
A	Rastojanje između mlaznice i kalupa	24.9	29.5	26.7	4.5
B	Pritisak vazduha	25.9	19.5	35.8	9.9
C	Otvor mlaznice	33.6	24.9	22,6	11.0
D	Vrijeme raspršivanja	29.7	29.4	22,0	7.7

Ukupna srednja vrijednost S/N odnosa = 24,04.

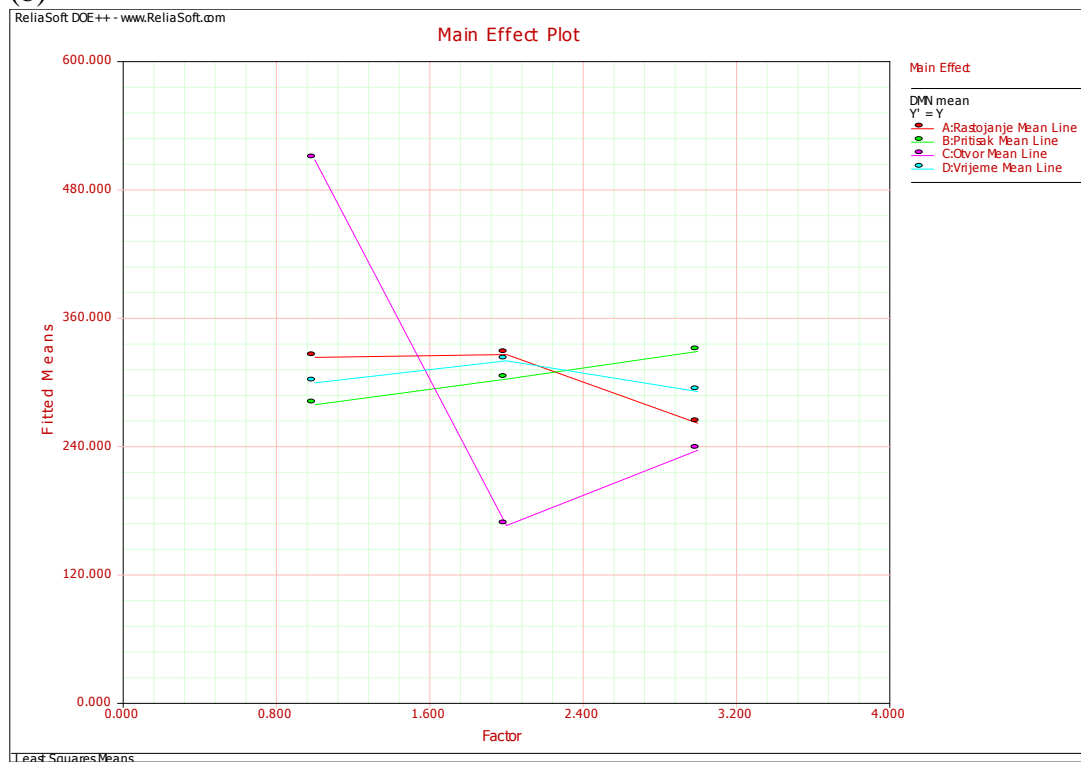
Iz jednačina [1] i [2] može se zaključiti da što je veći S/N odnos, manja je variansa (promjenljivost) odgovora oko željenih (maksimalnih) vrijednosti. Međutim, iako su glavni uticaji faktora određeni primjenom Taguchi dizajna, potrebno je ispitati i značaj tih uticaja, primjenom jedne od statističkih analiza. Najčešće upotrebljavan statistički test je analiza varijanse (ANOVA), koji u okviru multiple regresije omogućava ispitivanje odnosa jedne zavisno-promjenljive i jedne ili više nezavisno-promjenljivih koristeći metodu najmanjih kvadrata (198). Step en uticaja faktora pri uklapanju modela u eksperimentalne podatke ispituje se primjenom vrlo pouzdanog F testa ili Fisherovog odnosa varijanse. Rezultati ANOVA testa dobijeni za faktor C (otvor mlaznice) je jedini pokazao statistički značajne vrijednosti F odnosa. Ovi rezultati dobijeni su primjenom DOE++ (ReliaSoft) softvera za određivanje i analizu značajnih faktora procesa u dizajniranju i optimizaciji eksperimenata. Softverska analiza podataka je potvrdila tačnost rezultata dobijenih matematičkim putem preko S/N odnosa, tj značajnost faktora C, dok se uticaj ostalih faktora nije pokazao statistički značajnim (Slika 4-14).

Na osnovu izračunavanja S/N odnosa (Slika 4-13.a) i ANOVA analize (Slika 4-13.b), može se zaključiti da su optimalni parametri za dobijanje niza od 144 mikroigle pravilnog, piramidalnog oblika i oštih vrhova: rastojanje između mlaznice i kalupa – nivo 2 (5 cm), pritisak vazduha – nivo 3 (1 bar), otvor mlaznice – nivo 1 (1) i vrijeme raspršivanja – nivo 2 (20 s).

(a)



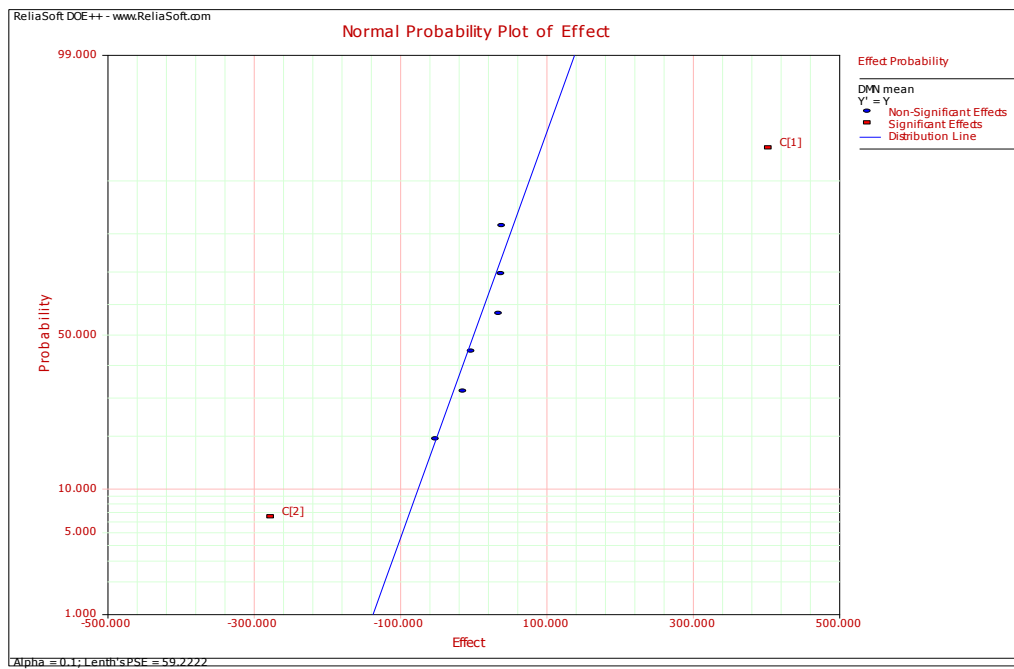
(b)



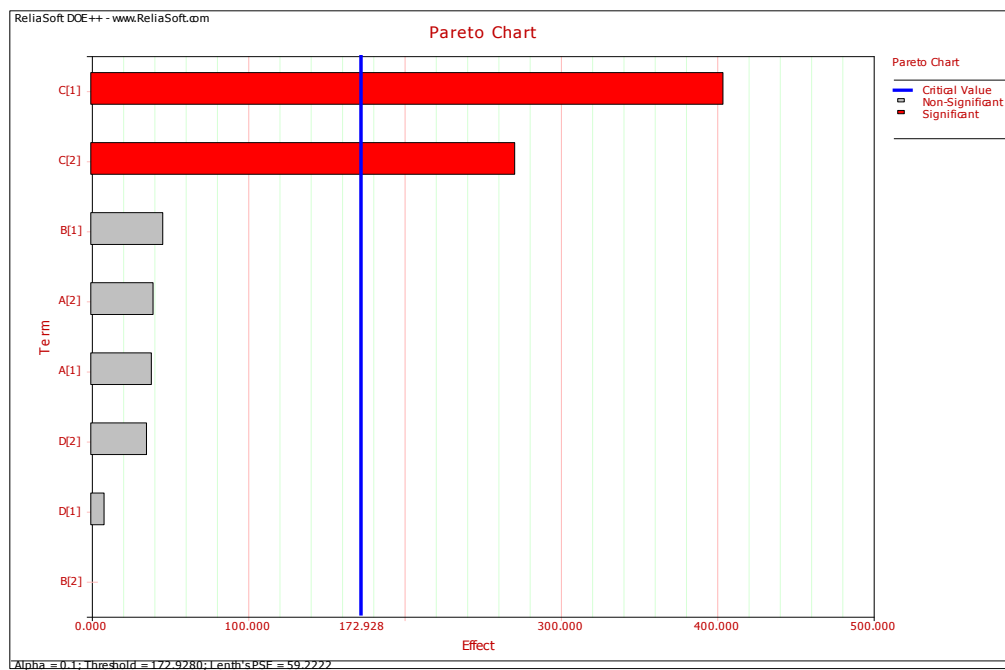
Slika 4-13. Grafički prikaz efekata promjenljivih parametara sistema dobijenih analizom:

(a) odnosa signal/šum (S/N) i (b) ANOVA testa. (A-rastojanje, B-pritisak, C-otvor, D-vrijeme).

(a)



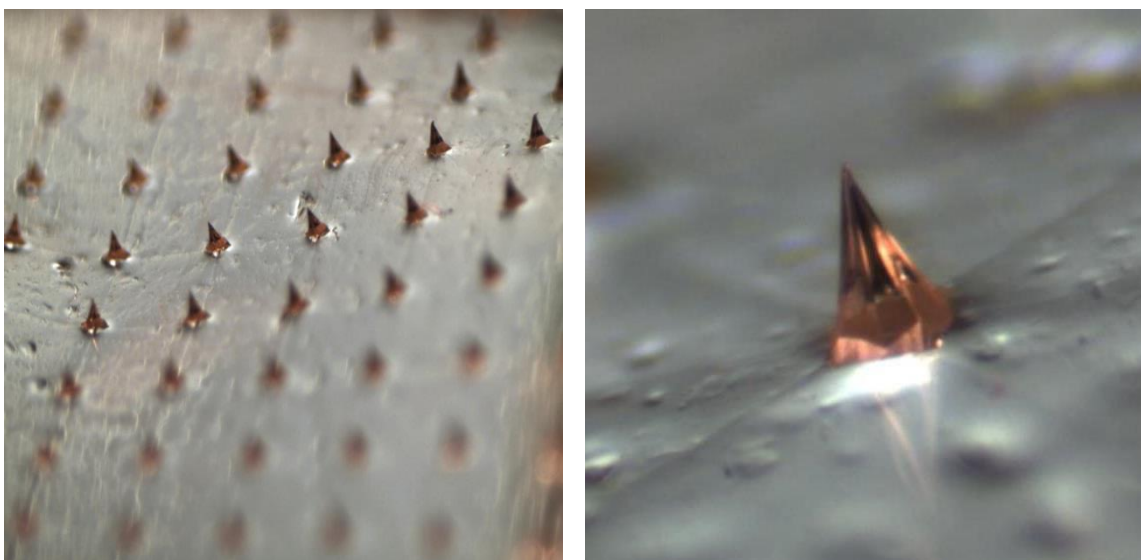
(b)



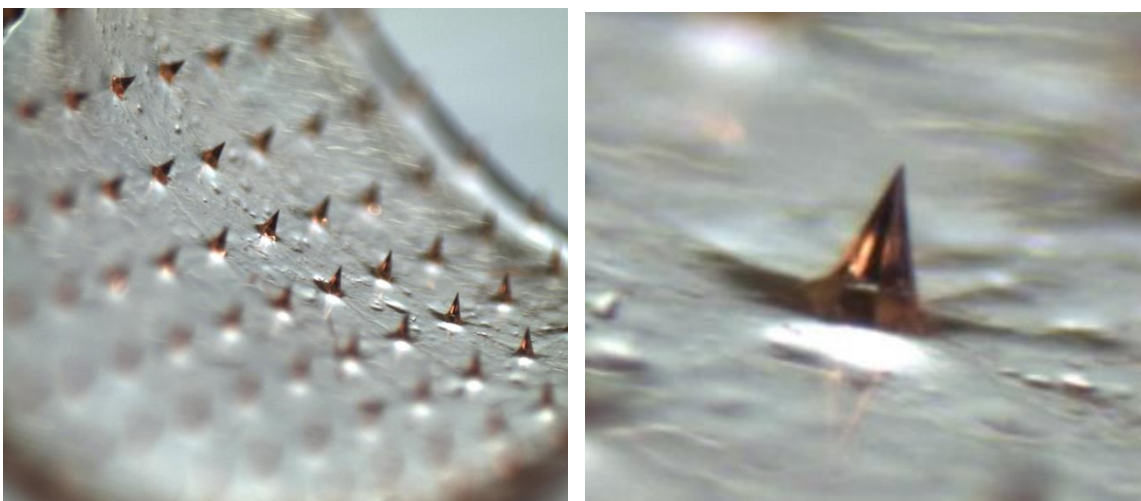
Slika 4-14. Primjena DOE++ softverskog paketa za analizu značajnosti faktora: (a) grafik vjerovatnoće normalne raspodjele, i (b) Pareto dijagram.

Rezultati dobijeni u ovoj fazi eksperimenatalnog rada su pokazali da mikrokapljice proizvedene atomizacijom obezbjeđuju bolje kvašenje unutrašnjih zidova samog dna šupljine kalupa, što je rezultiralo mikroiglama oštih vrhova i pravilne piramidalne strukture (Slika 4-15).

(a)



(b)



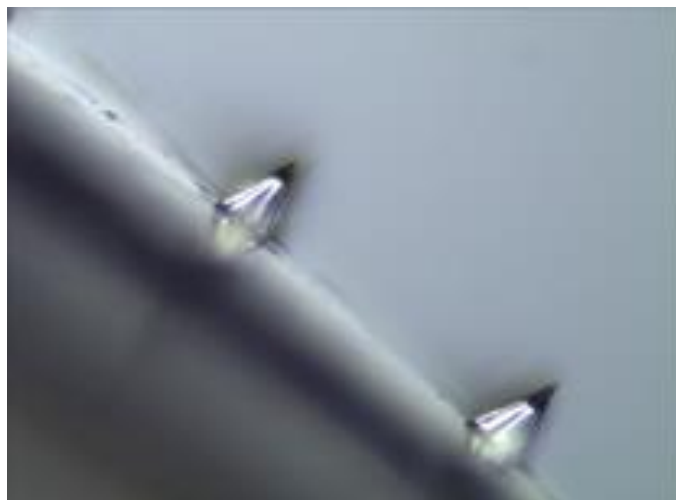
Slika 4-15. Primjer mikrografija rastvorljivih mikroigala izrađenih od: (a) rastvora PVA koji sadrži ketoprofen i (b) disperzije PDLLA-KET nanočestica.

Ovakav izgled mikroigala je važan sa aspekta uspješne penetracije, budući da je potvrđeno da primjena oštrijih mikroigala rezultira mnogo uspješnijom isporukom lijeka u poređenju sa mikroiglama ravnih ivica i vrha (125). Osim toga, primjenjena metoda

izrade rastvorljivih mikroigala može se upotrijebiti za izradu rastvorljivih mikroigala od različitog materijala. Takođe, pokazano je da se, u zavisnosti od broja koraka u procesu izrade, mogu dizajnirati homogene ili slojevite strukture mikroigala, što može donijeti značajan napredak na polju kontrolisanog oslobađanja i/ili primjene kombinovane terapije.

Na Slici 4-16 prikazane su mikroigle dobijene od disperzije PDLLA-KET nanočestica nakon jednog, dva ili serije od četiri raspršivanja. Punjenje PDMS kalupa sa više slojeva rezultiralo je mikroiglama pravilnijeg oblika i uniformnijeg sadržaja. Nakon serije od četiri raspršivanja, cijela šupljina kalupa bila je ispunjena polaznim materijalom, bez uklopljenog vazduha koji se može uočiti na Slikama 4-16.a i 4-16.b. Slična zapažanja prikazana su i u radu McGrath i sar. koji su ispitivali mogućnost slojevitog punjenja PDMS kalupa za dobijanje rastvorljivih mikroigala od trehaloze (194). Uspješni rezultati ovog procesa pokazani su dodatkom fluorescentnih sfera u rastvor trehaloze koji je korišćen za raspršivanje tokom prvog i trećeg koraka u izradi, dok je za drugi korak raspršivanja korišćen rastvor trehaloze bez fluorescentnih sfera. Dobijene mikroigle prikazane su na Slici 4-17.a, gdje se jasno uočava visok intenzitet fluorescencije u vrhu i bazi mikroigle, te izostanak fluorescencije intermedijarnog sloja. Ovim su McGrath i sar. dokazali uspješnost postupka slojevitog punjenja PDMS kalupa metodom atomizacije tečnosti. U istom radu, osim horizontalno slojevitih mikroigala, prikazana je i mogućnost dobijanja vertikalnih slojeva rastvorljivih mikroigala (Slici 4-17.b) (194). Ovaj postupak moguće je ostvariti oblaganjem čvrstih mikroigala, ali se smatra jedinstvenim kada je u pitanju izrada rastvorljivih mikroigala. Osim toga, ovakav dizajn nije moguće postići nijednom drugom tehnikom izrade rastvorljivih mikroigala, do sada opisanom u literaturi.

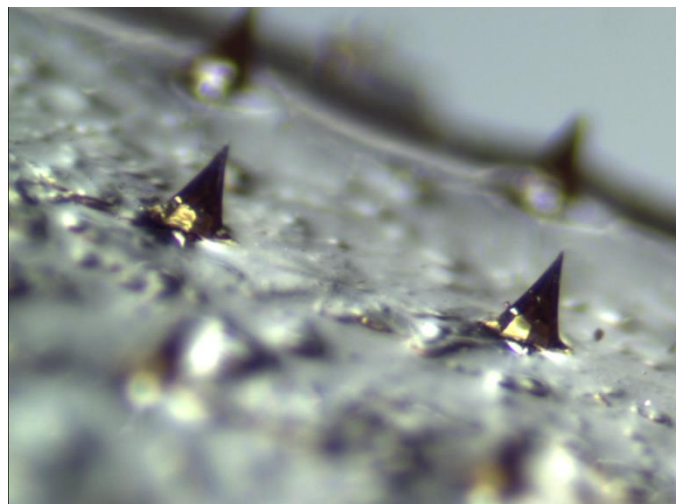
(a)



(b)

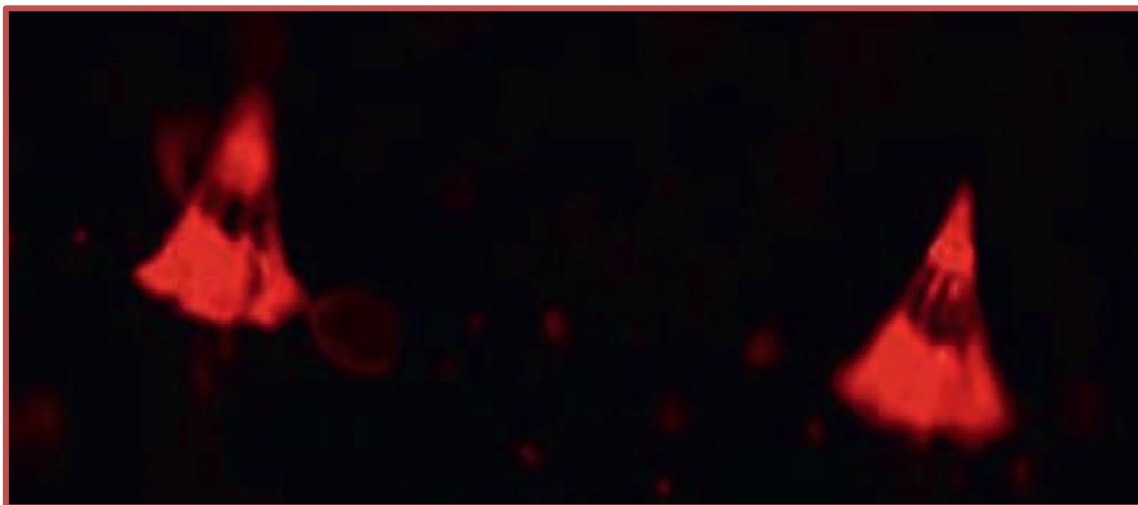


(c)

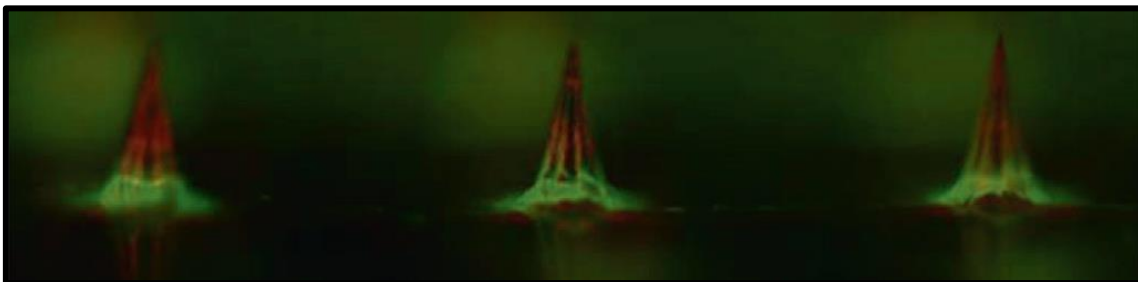


Slika 4-16. Rastvorljive mikroigle izradene od disperzije PDLLA-KET nanočestica primjenom serije od: (a) jednog, (b) dva, i (c) četiri raspršivanja.

(a)



(b)



Slika 4-17. Rastvorljive mikroigle izrađene od trehaloze sa dodatkom fluorescentnih sfera: (a) horizontalni, i (b) vertikalni slojevi. (194)

Iako rastvorljive mikroigle predstavljaju savremeni pristup za uspješniju isporuku lijeka u/kroz kožu, da bi dostigle svoj potpuni potencijal i primjenu u terapiji, neophodno je da se razviju metode njihovog dobijanja koje će biti efikasne i robusne za prenos proizvodnje sa laboratorijskog na industrijski nivo (eng. *scale-up*). Osim toga, metoda proizvodnje takođe mora da obezbijedi dobijanje mehanički čvrstih i uniformnih mikroigala čija će penetracija u tačno određene slojeve kože biti dosljedna i ponovljiva. U ovom radu istražena je mogućnost tehnologije raspršivanja za proizvodnju homogenih rastvorljivih mikroigala sa ketoprofenom inkapsuliranim u polimerne nanočestice. Kao što je već spomenuto na početku ovog poglavlja, proces atomizacije tečnosti pruža niz prednosti u odnosu na druge metode punjenja PDMS kalupa opisane u literaturi do danas. Prije svega, ne zahtjeva primjenu toplote, odnosno

topljenja materijala kako bi se izvršilo punjenje kalupa (115, 121, 192). Potom, moguća je primjena rastvora niže koncentracije za punjenje kalupa, što nije slučaj sa drugim metodama opisanim u literaturi (115, 121). Pomenute prednosti čine ovaj proces pogodnijim za izradu rastvorljivih mikroigala sa lijekovima osjetljivim na promjenutemperaturu, viskozitet ili koncentraciju (npr. vaccine). Posebno značajna prednost predstavljenog procesa izrade rastvorljivih mikroigala ogleda se u mogućnosti dizajniranja lamelarnih (slojevitih) mikroigala, što pruža veliki potencijal za kontrolisanu isporuku lijekova. Osim toga, raspršivanje u nekoliko koraka rezultiralo je dobijanjem mikroigala guste, sabijene strukture, bez prisutnih šupljina, što dalje utiče na mehaničke osobine mikroigala, njihovu stabilnost i sposobnost penetracije. Dizajniranje horizontalnih slojeva može da se upotrijebi i za dobijanje rastvorljivih mikroigala čiji su vrhovi izrađeni od čvrstih materijala, što je posebno značajno kada se kao materijal za izradu mikroigala upotrebljavaju ugljeni hidrati. Naime ove mikroigle često imaju okrugle, vrhove, nedovoljno jake da penetriraju u kožu, a vrlo su osjetljive na vlažnost i temperaturu (116, 191). Stoga se upravo horizontalnim slojevima može postići dobijanje mikroigala oštih vrhova, izrađenih od čvrstog materijala koji će uspješno penetrirati kroz kožu. Alternativno, primjenom slojevitog dizajna moguće je pozicionirati željeni materijal u okviru mikroigle i na taj način uticati na ciljano mjesto oslobađanja (epidermis ili dermis). Rastvorljive mikroigle dobijene u okviru ove faze eksperimentalnog rada su bile oštih vrhova, i u potpunosti su predstavljale repliku glavnog silikonskog kalupa, upotrebljenog za izradu PDMS kalupa. Ovo je rezultat generisanja finih kapljica tokom postupka atomizacije i raspršivanja polaznih formulacija. Zahvaljujući svojim dimenzijama, ove fine kapljice su mogle da pristupe i oblože uske dimenzije u samom vrhu mikronskih šupljina PDMS kalupa i na taj način obezbjede potpuno kvašenje kalupa i dobijanje mikroigala oštih vrhova. Za razliku od drugih metoda, poput centrifugiranja i primjene vakuuma, tehnika atomizacije tečnosti omogućava istovremeno kvašenje i punjenje šupljina kalupa u jednom koraku, što predstavlja veliku uštedu energije i vremena, posebno u industrijskim uslovima proizvodnje. Punjenje kalupa u više slojeva sa primjenom procesa sušenja u toku 30 minuta, prikazano u ovom radu, ne dovodi do znatnog povećanja vremena i energije, istovremeno pružajući velike mogućnosti izrade mikroigala različitog dizajna. Jedini nedostatak predstavljenog procesa ogleda se u relativno velikim gubicima polaznog

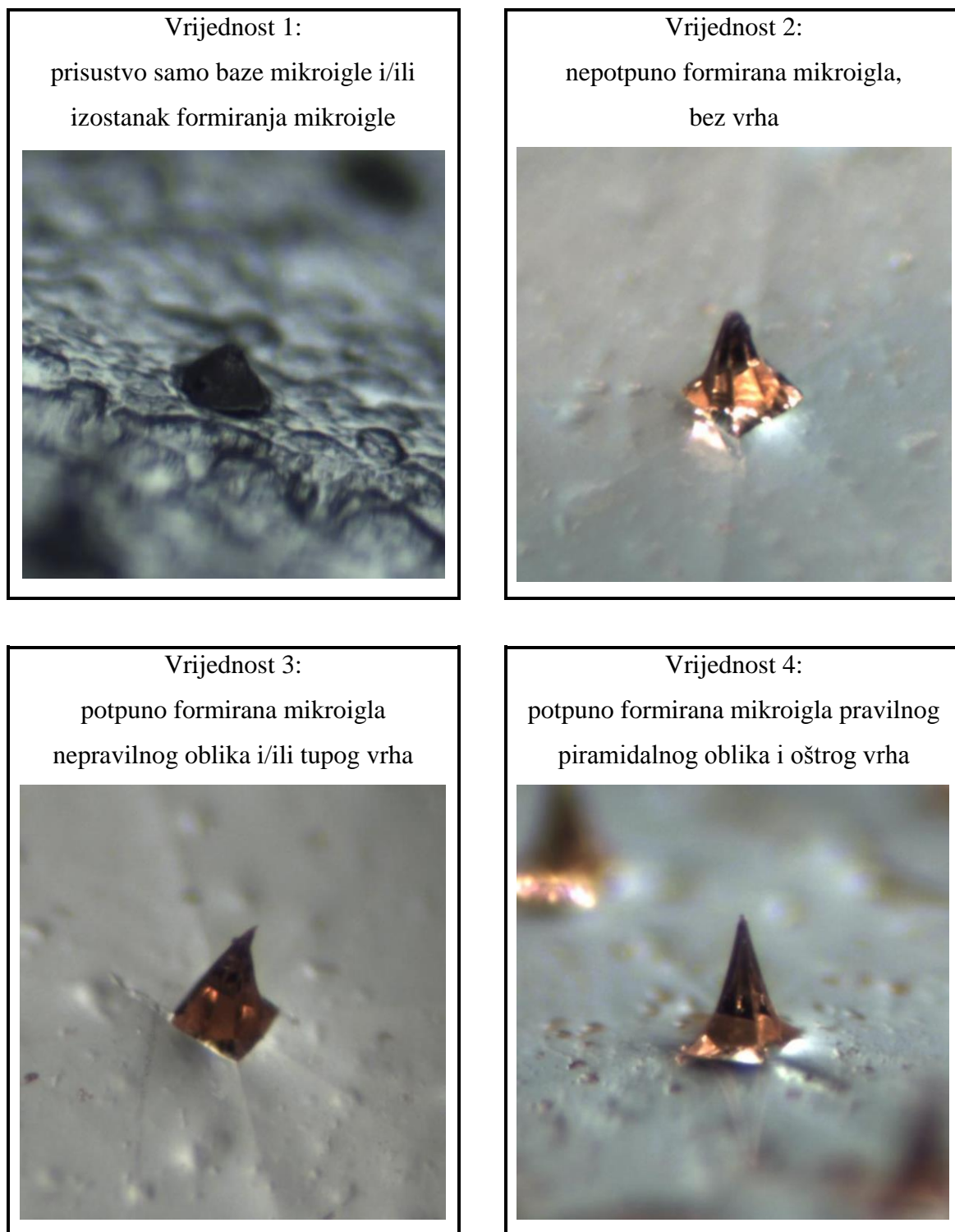
materijala. Naime, za punjenje kalupa koji imaju veoma male zapremine šupljina, troše se mnogo veće zapremine polaznih tečnih formulacija. Pored toga, proces sušenja u toku izrade rastvorljivih mikroigala sa aktivnim supstancama osjetljivim na temperaturu i vlažnost (proteini, vakcine) bi morao biti optimizovan i sproveden u kontrolisanim uslovima. Iako je odabrano da vrijeme sušenja između dva raspršivanja u ovom radu bude 30 minuta, pretpostavlja se da se kapljice polaznih formulacija suše mnogo brže budući da je deponovani sloj cijelom svojom površinom izložen vazduhu. To nije slučaj ukoliko se šupljina PDMS kalupa puni u jednom koraku, jer je onda samo površina baze mikroigle direktno izložena vazduhu. Proces sušenja se ovdje odvija difuzijum vlage iz vrha šupljine kalupe do njegove površine, što smanjuje brzinu gubitka vode iz kalupa. Obzirom da je aparatura i sama tehnologija atomizacije i raspršivanja tečnosti već zastupljena u farmaceutskoj industriji, prenos proizvodnje rastvorljivih mikroigala ovom metodom sa laboratorijskog na industrijski nivo ne bi predstavljao veliki izazov, u poređenju sa drugim metodama opisanim u literaturi. U slučaju kada fizičko-hemijske osobine polaznih formulacija ne rezultiraju mikroiglama zadovoljavajućeg kvaliteta, veoma jednostavno je moguće izvršiti njihovu modifikaciju dodatkom ekscipijensa kako bi se poboljšalo punjenje šupljina kalupa. Ovakav pristup prikazan je u radu McGrath i sar. kada su primjenom rastvora CMC, niskog viskoziteta dobijene rastvorljive mikroigle nepravilnih oblika i iskrivljenih vrhova. Dodatkom 0.1% glicerola, poboljšane su osobine koloidnog rastvora CMC i dobijen je niz pravilnih i oštih mikroigala (194). Takođe, ova tehnika pruža mogućnost oblaganja unutrašnjih površina šupljina kalupa, ostavljajući raspršeni materijal u finom tankom sloju, čime se mogu mijenjati površinske karakteristike samog kalupa, prije punjenja polaznom formulacijom. Ovakav pristup dobijanja rastvorljivih mikroigala koje su obložene tankim filmom, može biti upotrebljen za stabilizaciju mikroigala i sprečavanje njihove dezintegracije pod uticajem temperature, vlažnosti vazduha ili drugih uticaja sredine, što je već uočeno od strane Donnelly i sar. za mikroigle izrađene od ugljenih hidrata (191). I konačno, najveći potencijal ove metode jeste već spomenuta mogućnost kontrolisanog otpuštanje ljekovite supstance dizajniranjem mikroigala sa horizontalnim slojevima. Primjenom različitih materijala na ovaj način moguće je izraditi mikroigle čiji vrh (prvi sloj) nakon primjene trenutno oslobađa lijek, dok osnova (drugi sloj) mikroigle dovodi do produženog oslobađanja. U našem radu, cilj izrade mikroigala slojevite strukture bio

je dobijanje zadovoljavajućih mehaničkih osobina mikroigala, koje će obezbjediti uspješnu penetraciju i isporuku ketoprofena u kožu.

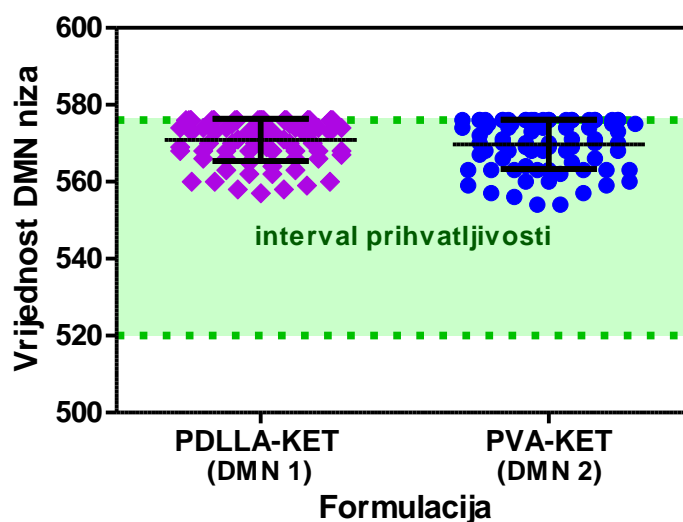
4.2.3. Karakterizacija rastvorljivih mikroigala

Nizovi rastvorljivih mikroigala sa PDLLA-KET nanočesticama i slobodnim ketoprofenom inkorporiranim u PVA matriks, dobijeni u okviru druge faze eksperimentalnog rada, korišteni su za analizu morfoloških i mehaničkih karakteristika mikroigala, kao i za ispitivanje ujednačenosti sadržaja ljekovite supstance. Procjena fizičkog integriteta, oblika i izgleda dobijenih mikroigala urađena je korišćenjem svjetlosnog mikroskopa sa ugrađenom digitalnom kamerom, a na osnovu kriterijuma koji su prethodno utvrđeni i opisani u poglavlju 3.2.5. Donje granice prihvatljivosti za uzorke rastvorljivih mikroigala, određene su na osnovu farmakopejskih zahtjeva za ujednačenost sadržaja ljekovite supstance u transdermalnim flasterima (145). Stoga su u daljim eksperimentima bili korišteni samo uzorci koji su sadržavali više od 90% mikroigala vrednovanih sa 4, tj. uzorci koji su vrednovani sa više od 520 (donja granica prihvatljivosti) od maksimalnih 576 bodova, što je predstavljalo niz sa svih 144 potpuno formiranih mikroigala, pravilnog piramidalnog oblika i oštrog vrha. Na Slici 4-18. prikazani su reprezentativni primjeri mikroigala na osnovu kojih je postavljen sistem za vrednovanje morfoloških karakteristika izrađenih rastvorljivih mikroigala.

Atomizacijom i raspršivanjem tečnih polaznih formulacija (PDLLA-KET i PVA-KET) dobijeni su nizovi rastvorljivih mikroigala gustine $144 \text{ mikroigle/cm}^2$ (12×12), koji su korišteni u svim daljim eksperimentima ovog rada. Vizuelna procjena izgleda i morfoloških karakteristika dobijenih mikroigala prikazana je grafički na Slici 4-19. Svi nizovi su bili u granicama prihvatljivosti, sa srednjom vrijednošću dodijeljene ocjene od $570,9 \pm 5,5$ i $569,7 \pm 6,4$ za formulacije DMN 1 (PDLLA-KET) i DMN 2 (PVA-KET), respektivno.



Slika 4-18. Kriterijumi sa primjerom za evaluaciju morfoloških karakteristika rastvorljivih mikroigala.

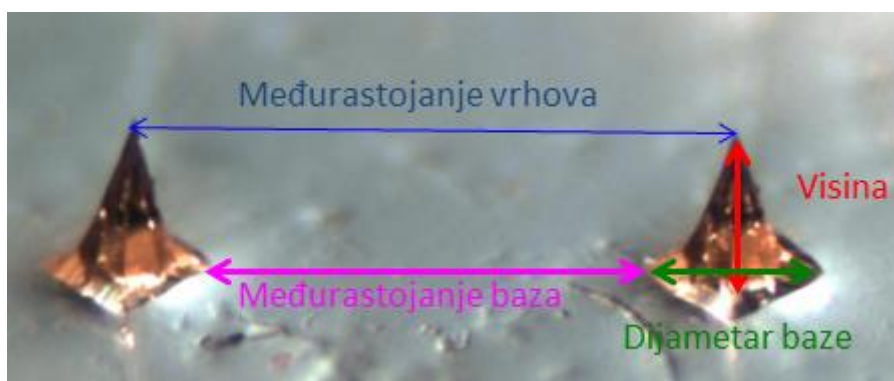


Slika 4-19. Rezultati procjene izgleda i morfoloških karakteristika rastvorljivih mikroigala korištenih u okviru eksperimentalnog rada. Sr. vrijednost \pm SD, $n=80$.

Dimenzije izrađenih mikroigala određene su mjerenjem visine mikroigle i širine njene baze, te izračunavanjem odnosa ove dvije veličine (eng. *aspect ratio*). Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 4-8 i poređeni sa teorijskim vrijednostima istih parametara PDMS kalupa korišćenog za izradu mikroigala. Srednja vrijednost visine, mjerena na uzorku od 10 mikroigala, iznosila je $279,81 \pm 16,93 \mu\text{m}$ i $270,74 \pm 11,28 \mu\text{m}$ za uzorke DMN 1 i DMN 2, respektivno. Na istim mikroiglama izmerena širina baze bila je $205,50 \pm 8,10 \mu\text{m}$ za DMN 1 i $203,54 \pm 9,95 \mu\text{m}$ za DMN 2 (Slika 4-20). Uočava se da su visina i prečnik baze, dobijenih rastvorljivih mikroigala, u skladu sa istim parametrima šupljine kalupa, i da nije bilo statistički značajnih razlika između stvarnih i teorijskih vrijednosti. Takođe, srednje vrijednosti dimenzija mikroigala DMN 1 i DMN 2 su se pokazale gotovo identičnim, što je bilo i očekivano, obzirom da su i vrijednosti kontaktnog ugla i viskoziteta polaznih formulacija bile slične. Ovakvi rezultati takođe ukazuju da su primjenjeni optimalni parametri u procesu izrade, i pokazatelj su ponovljivosti i robusnosti metode atomizacije i raspršivanja tečnosti, pod datim uslovima. U Tabeli 4-8 prikazane su i prosječne vrijednosti rastojanja između vrhova i baza mikroigala u nizu. Smatra se da rastojanje između mikroigala u nizu utiče na dubinu njihove penetracije. Naime, ako se individualne mikroigle u nizu nalaze na malom rastojanju, pritisak upotrebljen za njihovu aplikaciju se raspoređuje na veliki broj mikroigala i postaje nedovoljan za uspješnu penetraciju u kožu (119). U poređenju

sa teorijskim vrijednostima, srednja vrijednost prečnika baze izrađenih mikroigala bila je veća, dok je visina mikroigala bila manja od teorijske vrijednosti. Razlog neznatno većih rezultata u širini baze je prisustvo CMC potporne membrane, koja je u posljednjem koraku izrade aplikovana na niz rastvorljivih mikroigala. Rezultati preliminarnih eksperimenata su pokazali da je primjena potporne membrane bila neophodna kako bi se omogućilo vađenje mikroigala iz kalupa i dobili puni nizovi od 144 mikroigle. Budući da se formulacija za dobijanje potporne membrane nanosila u posljednjem koraku izrade, radi ostvarivanja neophodnog kontakta sa već formiranim mikroiglama, baze mikroigala su bile veće od prečnika šupljine PDMS kalupa. Zanimljivo manje visine izrađenih mikroigala posljedica su kontrakcije zapremine materijala nakon procesa sušenja. Ipak, neslaganja sa teorijskim vrijednostima nisu bila statistički značajna (Student T-test, $p > 0,05$), niti su uticala na vrijednosti odnosa visine i širine dobijenih mikroigala (eng. *aspect ratio*) koje iznose $1,36 \pm 0,08$ i $1,33 \pm 0,07$, za DMN 1 i DMN 2, respektivno (Tabela 4-8). Kao što je već detaljno objašnjeno u poglavlju 1.3.3, ovaj parametar utiče na mehaničke osobine rastvorljivih mikroigala i od izuzetne je važnosti za njihovu uspješnu penetraciju u kožu. Pored odnosa visine i širine mikroigle i ostali parametri geometrije mikroigala utiču na uspješnost penetracije odn. stepen elastičnosti kože. Elastične osobine kože su jedan od glavnih razloga neuspješne penetracije mikroigala. Budući da je, usljed manjeg Young-ov modula, matriks polimernih mikroigala slabiji u poređenju sa npr. metalnim mikroiglama, geometrija rastvorljivih mikroigala mora da obezbjedi dovoljnu mehaničku čvrstoću, što rezultira širokim mikroiglama, sa malom vrijednošću odnosa visine i širine baze mikroigle, koje teško penetriraju u kožu. Park i sar. su u svojim eksperimentima pokazali da je sila lomljenja polimernih mikroigala direktno proporcionalna Young-ovom modulu materijala i prečniku baze mikroigle, a obrnuto proporcionalna njenoj dužini (115). Ovim je potvrđeno da izbor materijala za izradu mikroigala predstavlja značajan faktor za mehaničku jačinu mikroigala. S druge strane, ukoliko je odnos visine i baze mikroigle preveliki, može lako doći do lomljenja mikroigle u toku primjene (106). U ovom neželjenom slučaju je, osim neuspješne isporuke lijeka, narušena i bezbjednost primjene. Smatra se da odnos visine i širine mikroigle iznad 1,3 obezbjeđuje uspješnu penetraciju i isporuku lijeka u kožu (199). Stoga se vrijednosti ovog parametra za mikroigle izrađene od rastvora PVA koji sadrži ketoprofen i disperzije PDLLA-KET

nanočestica smatraju zadovoljavajućim za primjenu na uzorcima kože i isporuku ketoprofena, što će pokazati i rezultati posljednje faze eksperimentalnog rada. Dužina mikroigala je važna i sa aspekta isporuke lijekovite supstance u ciljne slojeve kože. Smatra se da mikroigle dužina do 200 μm mogu uspješno dostaviti lijekovitu supstancu u vijabilni epidermis, dok se za penetraciju u dermis preporučuje primjena mikroigala dužih od 200 μm (119).



Slika 4-20. Primjer mjerenja dimenzija rastvorljivih mikroigala primjenom ImageJ softverskog paketa.

Tabela 4-8. Fizičke karakteristike PDMS kalupa i mikroigala izrađenih od disperzije PDLLA-KET nanočestica (DMN 1) i rastvora PVA koji sadrži ketoprofen (DMN 2).

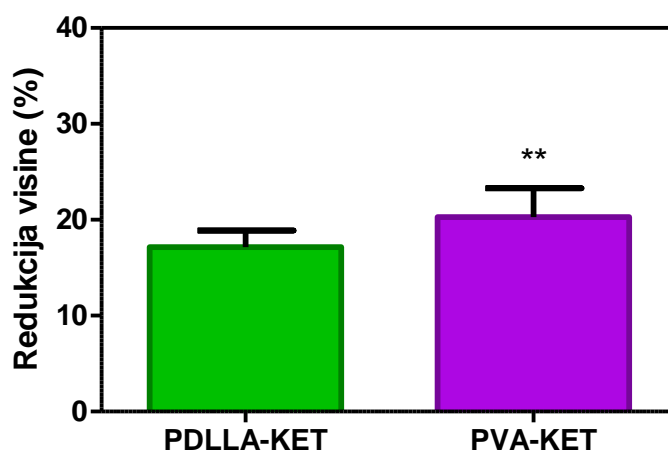
Parametar	DMN 1 (PDLLA-KET)	DMN 2 (PVA-KET)	PDMS kalup (Teorijske vrijednosti)
Visina (μm)	279,81 \pm 16,93	270,74 \pm 11,28	280
Dijametar baze (μm)	205,50 \pm 8,10	203,54 \pm 9,95	200
Međurastojanje baza (μm)	781,20 \pm 28,60	787,89 \pm 25,21	800
Međurastojanje vrhova (μm)	1011,89 \pm 98,88	990,11 \pm 74,35	-
Odnos visine i širine baze	1,36 \pm 0,08	1,33 \pm 0,07	-

Sr. vrijednost \pm SD, n=10.

Mehaničke osobine mikroigala su drugi važan parametar koji utiče na uspješnost penetracije mikroigala, a time i na efikasnu isporuku lijeka u ciljna tkiva. Sposobnost mikroigle da podnese silu prilitiska prilikom aplikacije na kožu, zavisi upravo od njene

mehaničke čvrstine, koja je određena metodom izrade, čvrstinom materijala upotrebljenog za izradu i dimenzijama mikroigle. Najkritičniji korak u izradi mikroigala, od kojeg zavise mehaničke osobine mikroigala je sušenje. Neadekvatno sušenje može dovesti do deformacije polimernog matriksa ili degradacije materijala usljed neadekvatnih temperatura ili vremena sušenja. Uticaj metode izrade i upotrebljenog materijala na mehaničke karakteristike mikroigala objavio je i Park, koji je izradu polimernih mikroigala bazirao na metodi punjenja kalupa mikročesticama prethodno izrađenim od različitih materijala (116). Potom je povezivanje mikrostruktura u kalupu vršio topljenjem ili primjenom ultrazvučne energije, i u posljednjem koraku primjenom vakuuma na temperaturi od 140°C. Međutim, dobijene mikroigle imale su poroznu strukturu koja je bila razlog njihove smanjene mehaničke čvrstine, i neuspješne penetracije u kožu čovjeka *ex vivo*.

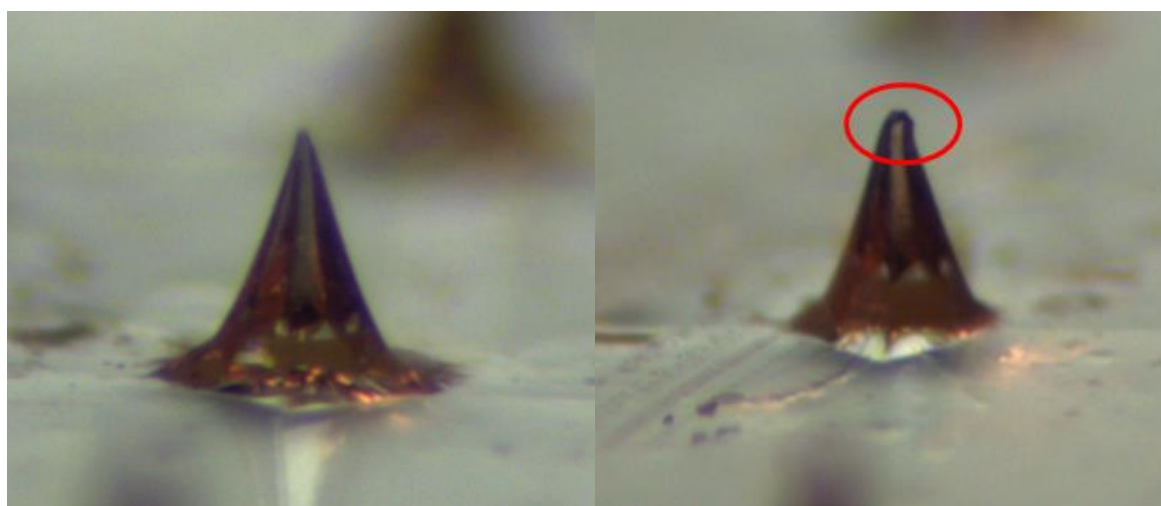
Ispitivanje mehaničkih osobina uzoraka DMN 1 i DMN 2 vršena je pomoću digitalnog mjerača sile potrebne da dovede do smanjenja visine polimernih mikroigala odnosno njihovog loma. Mjerenja su vršena u triplikatu za svaku formulaciju, pri čemu je visina 5 mikroigala svakog od tri niza mjerena prije i poslije primjene aksijalnog opterećenja odnosno sile na nizove mikroigala, koja je iznosila je 2 N/cm², 4 N/cm² i 8 N/cm².



Slika 4-21. Uticaj sile kompresije (pritiska) u iznosu od 8 N/cm² na fizičke dimenzije rastvorljivih mikroigala izrađenih od disperzije PDLLA-KET nanočestica i rastvora PVA koji sadrži ketoprofen (PVA-KET). Sr. vrijednost ± SD, n=15. ANOVA post hoc Tukey test, **

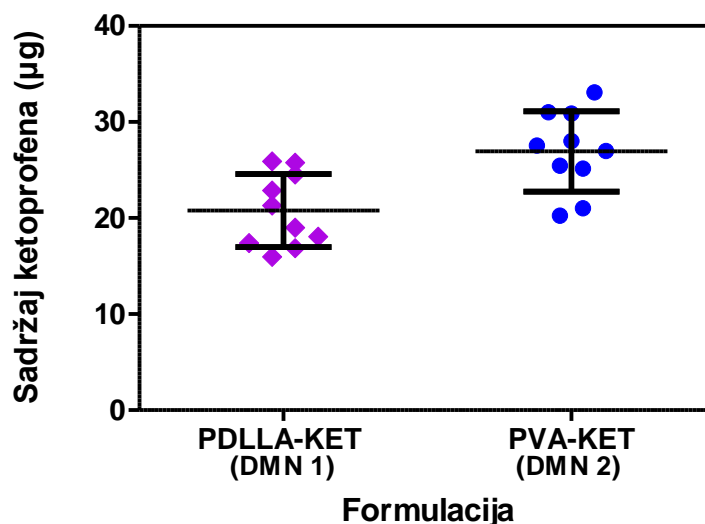
p<0,01.

Dobijeni rezultati pokazali su rigidnu i nefleksibilnu strukturu mikroigala obe formulacije (Slika 4-21). Zanimljivo je da su mikroigle izrađene od PDLA-KET nanočestica pokazale najveću sposobnost otpora kompresiji. Kod ove formulacije, redukcija u visini mikroigala zabilježena je tek nakon primjene pritiska od 8 N/cm^2 i iznosila je svega $17,16 \pm 1,72 \%$. Ovakav rezultat nije u skladu sa podacima iz literature. U već spomenutoj studiji Park i saradnika, koji su analizirali mikroigle izrađene od polimernih mikročestica, dobijena je porozna struktura mikroigala koja je bila uzrok njihovih loših mehaničkih osobina i neuspješne penetracije u kožu (116). Međutim, ključna razlika koja je dovela do ovako oprečnih rezultata jeste metoda izrade. Primjena dizajna horizontalnih slojeva u izradi mikroigala u našem radu, omogućila je dobijanje uniformne strukture mikroigala sa većom gustinom materijala, a samim tim i većom mehaničkom čvrstinom. Mikroigle izrađene od rastvora PVA-KET, su takođe imale zadovoljavajuće mehaničke osobine. Redukcija visine mikroigala u ovim uzorcima, nakon primjene pritiska od 8 N/cm^2 iznosila je $20,27 \pm 3,00 \%$, i statistička analiza je pokazala da se ova vrijednost značajno razlikuje od formulacije DMN 1 (ANOVA, $p < 0,01$). Reprezentativne slike mikroigala prije i nakon eksperimenta prikazane su na Slici 4-22. Mikroskopska inspekcija izgleda mikroigala nakon izvođenja eksperimenta, pokazala je da kompresija mikroigala počinje od vrha mikroigle ka njenoj bazi, i da ni u jednom uzorku nije primjećeno naprsnuće baze mikroigala.



Slika 4-22. Redukcija visine rastvorljivih mikroigala prije i poslije primjene sile kompresije od 8 N/cm^2 .

Jačina pritiska na svaku individualnu mikroiglu zavisi od broja mikroigala po jedinici površine potporne membrane (gustina niza), odnosno od međusobnog rastojanja mikroigala u nizu. Prethodno je već diskutovano da, ako se individualne mikroigle u nizu nalaze na malom rastojanju, pritisak upotrebljen za njihovu aplikaciju se raspoređuje na veliki broj mikroigala i postaje nedovoljan za uspješnu penetraciju u kožu (119). Smatra se da sila potrebna za penetraciju niza mikroigala površine 1 cm^2 u kožu iznosi od $0.1 - 3 \text{ N}$, u zavisnosti od dizajna i geometrije mikroigala. Brojne studije su pokazale da su ove vrijednosti dovoljne za manuelnu aplikaciju (109, 119, 127), a rezultati naših eksperimenata su pokazali da primjena ovih vrijednosti sila ne dovodi do smanjenja visine ili lomljenja rastvorljivih mikroigala izrađenih u ovom radu.



Slika 4-23. Sadržaj ketoprofena u rastvorljivim mikroiglama izrađenim od disperzije PDLLA-KET nanočestica i rastvora PVA koji sadrži ketoprofen (PVA-KET). Sr. vrijednost \pm SD, $n=10$.

Nakon ispitivanja fizičkih osobina, analiziran je sadržaj ketoprofena inkapsuliranog u rastvorljive mikroigle u obliku slobodnog lijeka ili polimernih nanočestica. Ispitivanje ujednačenosti sadržaja zasniva se na određivanju sadržaja ljekovite supstance u određenom broju uzoraka, kako bi se ustanovilo da li je pojedinačni sadržaj unutar postavljenih granica u odnosu na prosječni sadržaj uzorka. Jednodozni preparat rastvorljivih mikroigala izrađenih u ovom radu predstavljao je niz od 144 mikroigle na 1 cm^2 potporne membrane. Deset uzoraka pojedinačnih preparata mikroigala svake od ispitivanih formulacija, prvo su rastvoreni prema protokolu koji je

detaljno prikazan u poglavlju 3.2.5, a potom je sadržaj ketoprofena određen pomoću HPLC metode. Prethodno je urađena optimizacija protokola kako bi se potvrdilo potpuno rastvaranje mikroigala i obezbjedila vjerodostojnost dobijenih rezultata. Sadržaj ketoprofena u mikroiglama izrađenim od PDLLA-KET nanočestica (DMN 1) varirao je u rasponu od 15,99 – 25,91 μg , dok je u mikroiglama sa slobodnim lijekom (DMN 2) sadržaj ketoprofena bio od 20,25 – 33,07 μg (Slika 4-23). Prosječne vrijednosti sadržaja ketoprofena za deset ispitivanih uzoraka iznosile su $20,79 \pm 3,80 \mu\text{g}$ i $26,94 \pm 4,17 \mu\text{g}$ za DMN 1 i DMN 2, respektivno. Dobijeni rezultati ukazuju na dobru ujednačenost sadržaja izrađenih formulacija mikroigala, koja je u skladu sa farmakopejskim zahtjevima za transdermalne flastere prema kojim se sadržaj ketoprofena u svakom pojedinačnom uzorku nalazi u granicama od 75% do 125% (test C) (145).

4.3. Studije stabilnosti

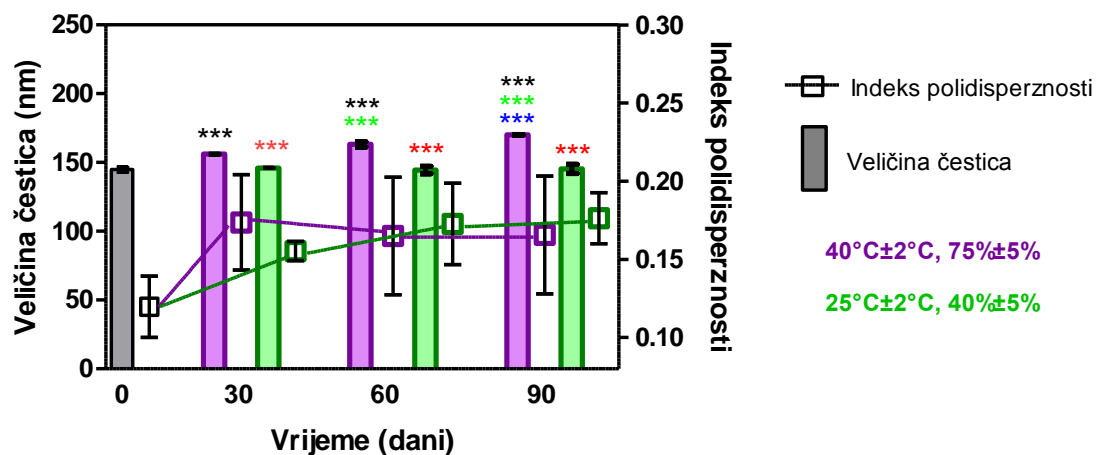
Ispitivanje stabilnosti predstavlja veoma važan i nezaobilazan korak u fazi razvoja formulacije i farmaceutskog oblika budući da svi farmaceutski preparati podliježu fizičkim, hemijskim i mikrobiološkim promjenama tokom skladištenja i čuvanja. Studije stabilnosti zahtjevaju sistematičan i detaljan pristup, kako bi se procijenili svi aspekti koji utiču na stabilnost lijekova i farmaceutskih preparata, uopšte. Hemijska i fizička degradacija ljekovitih supstanci može promijeniti njihov farmakološki efekat što ima za posljedicu promjenu terapijske efikasnosti i pojave toksičnih proizvoda. Budući da se primjena lijekova u terapiji zasniva na njihovoj efikasnosti i bezbjednosti, neophodno je da se osigura njihova stabilnost i kvalitet do momenta upotrebe i određenog roka trajanja, pod različitim uslovima koji se utvrđuju u fazi razvoja proizvoda, imajući u vidu uslove kojima proizvod može biti izložen tokom proizvodnje, skladištenja, transporta i čuvanja. Stoga je razumjevanje faktora koji mijenjaju stabilnost lijeka i ljekovitog proizvoda, kao i identifikovanje načina koji će osigurati stabilnost proizvoda od ključne važnosti (200).

4.3.1. Stabilnost polimernih nanočestica sa inkapsuliranim ketoprofenom

Nanočestice se, zbog svoje koloidne prirode, smatraju veoma stabilnim sistemima (201). Ipak, na stabilnost dispergovanih nanočestica utiče veliki broj fizičkih i hemijskih faktora kao što su sastav, veličina čestica, uslovi sredine i koncentracija nanočestica u

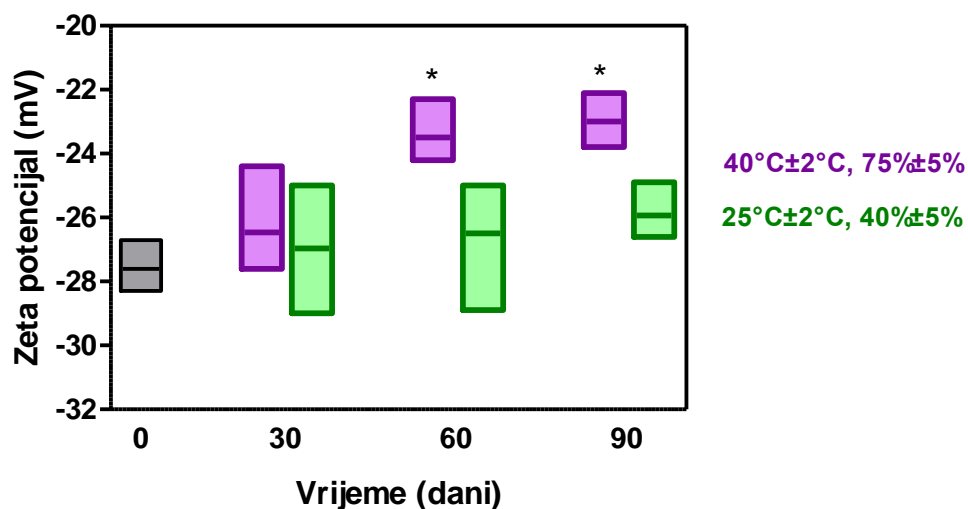
disperzionom medijumu, kao i viskozitet nastalih disperzija (201). Za procjenu fizičke stabilnosti disperzija polimernih nanočestica sa inkapsuliranim ketoprofenom (SS-DN), izrađenih u okviru prve faze eksperimentalnog rada i korištenih za izradu rastvorljivih mikroigala, analizirani su raspodjele veličina čestica, zeta potencijal i efikasnost inkapsulacije lijeka. Uzorci su čuvani u toku 3 mjeseca pod ekstremnim uslovima (uslovi ubrzanog starenja) u klima komorama na $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i relativnoj vlažnosti vazduha od $75\% \pm 5\%$, kao i na temperaturi od $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i relativnoj vlažnosti vazduha od $40\% \pm 5\%$, uobičajeni uslovi dugotrajnog čuvanja (kontrolna grupa). Dobijeni rezultati prikazani su grafički na Slikama 4-24, 4-25 i 4-26.

U okviru ispitivanja stabilnosti, vršen je i vizuelni pregled uzoraka, a rezultati su pokazali da nije došlo do promjene organoleptičkog izgleda ispitivanih disperzija u toku cjelokupnog vremena čuvanja. Svi uzorci su zadržali mliječno bijelu boju a pojava sedimentacije odnosno izdvajanja taloga čvrste faze disperzije, primjećena je tek nakon 60 i 90 dana čuvanja, kako kod uzoraka izloženih ekstremnim uslovima, tako i kod kontrolnih uzoraka. Međutim, laganim protresanjem bilo je omogućeno lako redispersovanje i dobijanje homogenih disperzija nanočestica svih ispitivanih uzoraka, što je u skladu sa zahtjevima Ph. Eur. 7.0 (202).



Slika 4-24. Vrijednosti veličina čestica i indeksa polidisperznosti uzoraka PDLLA-KET nanočestica u periodu od 90 dana. Sr. vrijednost \pm SD, $n=3$. ANOVA post hoc Tukey test statistički značajne razlike $p < 0,001$: *** u odnosu na dan izrade, *** u odnosu na uzorke analizirane nakon 30 dana, *** u odnosu na uzorke analizirane nakon 60 dana, *** između uzoraka izloženih različitim uslovima nakon istog vremenskog perioda.

Promjene u veličini i raspodjeli veličina čestica ispitivanih uzoraka, kao jednog od najvažnijih parametara za procjenu stabilnosti, prikazane su na Slici 4-24. Nakon 90 dana zabilježeno je statistički značajno povećanje veličine nanočestica, u uslovima ubranog starenja (ANOVA, Tukey test, *** $p < 0,001$ nakon 30, 60 i 90 dana). Međutim, vrijednosti indeksa polidisperznosti (PDI) ovih uzoraka su istovremeno ostale nepromjenjene tokom cijelog perioda čuvanja i iznosile su oko 0,17. Disperzije kontrolnih uzoraka su bile fizički stabilne u toku cijelog perioda čuvanja, budući da nije bilo statistički značajnih razlika između uzoraka ispitivanih na dan izrade i nakon 30, 60 i 90 dana čuvanja u ambijentnim uslovima (ANOVA, $p > 0,05$). Zabilježeno povećanje veličine čestica u ovim uzorcima čuvanih na ambijentnim uslovima je bilo manje od 1 nm. U prilog ovom zaključku su i rezultati PDI čije povećanje sa dužim vremenom čuvanja uzoraka takođe nije bilo statički značajno. Anliziranjem dobijenih rezultata između kontrolnih i uzoraka PDLLA-KET nanočestica čuvanih pod ekstremnim uslovima, a u okviru istog vremenskog intervala, primjećene su statistički značajne razlike za svaki vremenski period uzorkovanja (ANOVA, Tukey test, *** $p < 0,001$). Dodatno, ispitivana je i razlika u veličini čestica između uzoraka nakon različitog perioda uzorkovanja, a u okviru istih uslova sredine pod kojim su uzorci čuvani, gdje su se razlike u veličini čestica pokazale statistički značajnim samo kod uzoraka PDLLA-KET nanočestica čuvanih u klima komori na $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i relativnoj vlažnosti vazduha od $75\% \pm 5\%$ (ANOVA, Tukey test, *** $p < 0,001$ uzorci nakon 60 i 90 dana u odnosu na dan 30, i uzorci nakon 60 u poređenju sa uzorcima nakon 90 dana). Ovih razlika nije bilo kod kontrolnih uzoraka čuvanih na $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i relativnoj vlažnosti vazduha od $40\% \pm 5\%$. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da su disperzije PDLLA-KET nanočestica bile stabilne u toku 90 dana čuvanja, na ambijentnim i ekstremnim uslovima sredine. Iako je povećanje veličine nanočestica kod uzoraka koji su čuvani na ekstremnim uslovima temperature i vlažnosti bilo statistički značajno, srednje PDI vrijednosti koje daju informaciju o odstupanju od prosečne veličine čestice, za sve ispitivane uzorke su se zadržale ispod 0,2 što ukazuje na homogenu raspodjelu veličina čestica. Takođe, izgled disperzija nanočestica nije ukazivao na destabilizaciju. Ovi rezultati su u skladu sa nedavno objavljenom studijom stabilnosti, u kojoj su PLLA mikročestice sa inkapsuliranim ketoprofenom čuvane pod istim uslovima povišene temperature i vlage, zadržale stabilnost u toku 45 dana (203).



Slika 4-25. Vrijednosti zeta potencijala uzoraka PDLLA-KET nanočestica u periodu od 90 dana. Sr. vrijednost \pm SD, $n=3$. ANOVA post hoc Tukey test, * $p<0,05$ statistički značajne razlike u odnosu na dan izrade.

Uska raspodjela veličina čestica je indikator veće otpornosti nanodisperzije na pojavu Ostwald-ovog napona (sazrijevanja) u poređenju sa sistemima koji imaju šire raspodjele, odnosno više PDI vrijednosti (204). Ostwald-ovo sazrijevanje predstavlja jedan od glavnih vidova nestabilnosti disperznih sistema koje nastaje usljed razlika u rastvorljivosti čestica različite veličine. Kao posljedica toga javlja se tendencija deponovanja sitnijih čestica na krupnijim, što dovodi do njihovog daljeg ukрупnjavanja i, tokom vremena, potpune separacije faza. Odsustvo čestica različitih veličina sprečava postojanje različitih rastvorljivosti zasićenja, a time i koncentracionih gradijenata u blizini čestica, što onemogućava efekat Ostwald-ovog sazrijevanja i dugoročno stabilizuje sistem (205). Izostanak efekta Ostwald-ovog sazrijevanja u navedenoj studiji stabilnosti pripisuje se uniformnoj raspodjeli veličina dispergovanih čestica, što je slučaj i kod uzoraka ispitivanih u eksperimentima ove disertacije.

Osim Ostwald-ovog sazrijevanja, mogu da se jave i drugi vidovi nestabilnosti nanodisperzija (aglomeracija, sedimentacija). Generalno, koloidne disperzije nanočestica su stabilne budući da je sedimentacija čestica submikronskih dimenzija uglavnom spor proces, koji je spriječen usljed neprestanog haotičnog kretanja dispergovanih čestica (201). Ovakvo kretanje koloidnih čestica naziva se Braunovo kretanje (eng. *Brownian motion*) i nastaje kao rezultat slučajnih sudara čestica sa

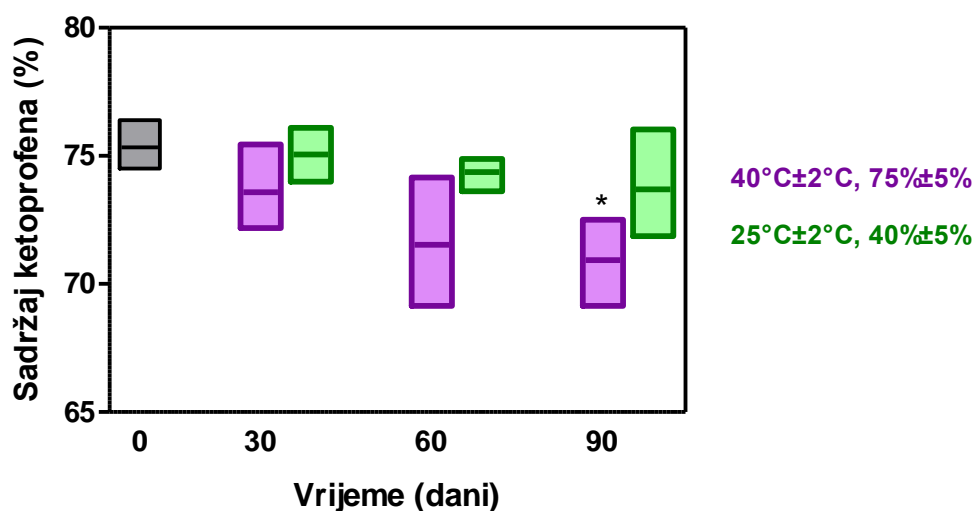
molekulama suspendujućeg medijuma, drugim česticama i zidovima posude. Kao rezultat haotičnog kretanja, koloidne čestice difunduju iz mjesta više koncentracije ka mjestu niže koncentracije dok se koncentracije ne ujednače. Gravitacione sile, koje uzrokuju sedimentaciju, i difuzione sile (Braunovo kretanje) se međusobno suprotstavljaju i zavise od veličine čestica (201). Budući da su koloidne čestice reda veličina u okviru kojih Braunove sile dominiraju nad gravitacionim silama, tendencija da ostanu suspendovane je veća od procesa sedimentacije (206). Ipak, može da dođe do izvjesnog stepena aglomeracije. Zbog toga je neophodno da se u formulaciju uključi i određeni stabilizator, poput PVA. Adsorpcijom na veliku površinu nanočestica, PVA sprečava pojavu aglomeracije i obezbjeđuje koloidnu stabilizaciju uzoraka ispitivanih u okviru kratkoročne studije stabilnosti predstavljene u ovom radu.

Do destabilizacije ispitivane formulacije mogu dovesti i druge komponente iz njenog sastava. Tako npr. adsorpcija aktivne supstance na površinu nanočestica može izazvati pojavu aglomeracije čestica, najvjerojatnije usljed izmještanja dijela stabilizatora adsorbovanog na površini čestice, koji učestvuje u sternoj stabilizaciji. Ovaj efekat primjećen je kod PDLA nanosfera prije i nakon adsorpcije nifedipina (206). Još jedna pojava nestabilnosti predstavlja poseban vid flokulacije koji nastaje kada se dva kraja lanca u molekuli polimera jedne čestice adsorbuju na drugu česticu, što je u literaturi označeno kao flokulacija premošćavanjem (201, 207)

Pored veličine i raspodjele veličina nanočestica u ovom radu, analizirano je i njihovo površinsko nalektrisanje, koje se smatra jednim od ključnih faktora u očuvanju stabilnosti. Zeta potencijal je inherentna karakteristika sistema, i kod fizički stabilnih sistema ne očekuju se njegove značajnije promjene (165). Osim što ukazuju na nestabilnost, promjene u električnoj provodljivosti mogu da utiču i na veličinu čestica nanodisperzija (165). Kao što je već objašnjeno u okviru poglavlja 4.1.3, apsolutne vrijednosti zeta potencijala veće od 30 mV pokazatelj su dobre fizičke stabilnosti, dok vrijednosti preko 60 mV ukazuju na odličnu dugoročnu stabilnost (165, 208). Na Slici 4-25 predstavljen je uporedni prikaz vrijednosti zeta potencijala ispitivanih kontrolnih uzoraka i uzoraka PDLA-KET nanočestica izloženih stresnim uslovima povišene temperature i relativne vlažnosti vazduha. Nakon 90 dana čuvanja na sobnoj temperaturi, vrijednosti zeta potencijala uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi ostale su nepromjenjene u odnosu na dan izrade (oko -27 mV). Istu vrijednost zadržali su i svi

uzorci koji su bili izloženi ekstremnim uslovima temperature i relativne vlažnosti vazduha, ali samo nakon mjesec dana čuvanja. Međutim, nakon vremenskog perioda od 60 dana došlo je do statistički značajnog smanjenja negativnog naelektrisanja svih uzoraka i srednje vrijednosti zeta potencijala su iznosile oko -23 mV (ANOVA, Tukey test, * $p < 0,05$). Dalje promjene nisu primjećene i mjerenje zeta potencijala nakon 90 dana dalo je iste rezultate. Promjene zeta potencijala na višim temperaturama (40°C) mogu se objasniti pojavljivanjem dodatnih faktora koji imaju destabilizujući efekat na nanočestice (209). Naime, molekulska masa PDLLA se smanjuje brže na povišenoj nego na temperaturi od 25°C. Osim toga efekat povišene temperature može biti povećan autokatalitičkim efektom krajeva karboksilnog lanca polimera (27). U literaturi postoje podaci da se za vrijednost zeta potencijala oko -20 mV smatra da obezbeđuje kratkoročnu stabilnost uzoraka koji su elektrostatički stabilizovani (165, 176). Kada je riječ o sternoj stabilizaciji apsolutne vrijednosti zeta potencijala oko 20 mV se, takođe, smatraju dovoljnim za postizanje zadovoljavajuće stabilnosti nanodisperzija. Stabilizacija PDLLA-KET nanočestica je ostvarena kombinacijom oba efekta. Elektrostatička stabilizacija se ostvaruje zahvaljujući prisustvu slobodnih karboksilnih grupa na površini polimera koje nose negativno naelektrisanje, dok sterne stabilizaciju čestica obezbeđuje prisustvo stabilizatora (PVA) na površini nanočestica. Uzimajući u obzir ova zapažanja i dobijene vrijednosti zeta potencijala za uzorke ispitivane u našem radu, može se zaključiti da PVA u upotrebljenoj koncentraciji, mehanizmom sterne stabilizacije, može da obezbijedi zadovoljavajuću stabilnost ispitivanih formulacija nanočestica u toku 90 dana.

Efikasnost inkapsulacije odn. sadržaj ljekovite supstance u izrađenim PDLLA nanočesticama je još jedan od parametara koji je praćen u toku procjene stabilnosti nanočestica. Kao što je prikazano na Slici 4-26, procenat ketoprofena inkapsuliranog u PDLLA nanočestice se smanjivao sa vremenom. Međutim, smanjenje sadržaja lijeka u nanočesticama kontrolnih uzoraka, čuvanih na ambijentnim uslovima temperature i vlažnosti vazduha u toku 90 dana, iznosilo je svega 1% i nema statističku značajnost (ANOVA, $p > 0,05$).



Slika 4-26. Vrijednosti efikasnosti inkapsulacije ketopropfena u uzorcima PDLLA-KET nanočestica u periodu od 90 dana. Sr. vrijednost ± SD, n=3. ANOVA post hoc Tukey test, * p<0,05 statistički značajne razlike u odnosu na dan izrade.

Slični rezultati dobijeni su i za uzorke koji su bili izloženi povišenoj temperaturi i vlažnosti vazduha u toku 30 i 60 dana. Ipak, statistički značajno smanjenje procenta inkapsuliranog lijeka zabilježeno je nakon 90 dana čuvanja na povišenoj temperaturi, i u poređenju sa vrijednostima na dan izrade iznosilo je oko 5% (ANOVA, Tukey test, * p<0,05). Dobijeni rezultati se ponovo mogu objasniti ulogom koju PVA ima u ispitivanim uzorcima PDLLA-KET nanočestica. Smatra se da se u toku procesa izrade nanočestica, hidrofobni dio PVA prožima u lance PDLLA polimera i ostaje zarobljen u PDLLA matriksu nanočestica. Shodno tome, visoke koncentracije PVA dovode do formiranja mreže uzajmno povezanih molekula PDLLA polimera, lijeka i PVA, što utiče na povećanje efikasnosti inkapsulacije lijeka (210).

Iako je u ovom radu prikazana zadovoljavajuća kratkoročna stabilnost ispitivanih uzoraka disperzije PDLLA nanočestica, dobijeni rezultati ukazuju na tendenciju pojave njihove destabilizacije sa vremenom. Budući da su tečne disperzije, generalno, nestabilni sistemi, i da izrađene nanočestice predstavljaju samo polazni materijal za formulaciju odgovarajućeg farmaceutskog oblika, dobijanje praška nanočestica predstavlja jedan od načina ostvarivanja njihove dugoročne stabilnosti. Zbog pomenutih razloga, poslednji korak u izradi PDLLA-KET nanočestica je bio uklanjanje vode iz sistema dobijenih disperzija nanočestica procesom liofilizacije. Liofilizacija ili sušenje

smrzavanjem je metoda koja, pod odgovarajućim uslovima, čuva strukturu čestica na prihvatljiv i efikasan način, tokom njihovog čuvanja i dalje upotrebe u farmaceutskim procesima (211). Međutim, kada je riječ o česticama nanometarskih veličina, liofilizacija je komplikovan proces jer je stabilnost disperzije koloidnih nanočestica, u najvećem broju slučajeva, narušena i dovodi do agregacije prije samog završetka procesa sušenja. Naime, tokom smrzavanja koncentracija nanočestica nesmrznute faze se povećava usljed većeg broja interakcija između čestica, što uz potencijalne promjene jonske jačine i pH vrijednosti, može dovesti do njihove agregacije (211). Osim jonske jačine i pH vrijednosti, postoji još nekoliko promjenljivih parametara koji utiču na konačan rezultat procesa liofilizacije, kao što su brzina i temperatura smrzavanja uzoraka, temperatura sušenja, pritisak i upotreba ekscipijenasa (krioprotektanti i lioprotektanti, koji štite čestice u toku smrzavanja odnosno sušenja) (211). Kada se uzmu u obzir svi fizički i hemijski faktori procesa, liofilizacija koloidnih sistema može biti kontrolisana na način da obezbjedi rok trajanja ovih sistema i do nekoliko godina (201, 212). Uspješnost procesa liofilizacije ogleda se u dobijanju liofilizata nanočestica koji se vrlo lako redisperguje u inicijalnom disperzionom sredstvu, sadrži zanemarljiv procenat rezidua vode (<2%), i da pri tome nije došlo do promjene prvobitnih fizičkih osobina nanočestica (raspodjela veličina i sadržaj lijeka) (201). Brojne studije su pokazale da je upotreba protektivnih ekscipijenasa neizostavna za uspješnu liofilizaciju polimernih nanočestica, ali je izbor ovih pomoćnih supstanci drugačiji za svaku pojedinačnu formulaciju (212-215). Za liofilizaciju uzoraka disperzija PDLLA-KET nanočestica u ovom radu, kao lioprotektant korišćena je trehaloza. Smatra se da protektivni mehanizam trehaloze i ostalih disaharida potiče od amornog matriksa koji se formira u kontaktu šećera sa prisutnom vodom, i koji formira vodonične veze sa nanočesticama substituišući molekule vode i inhibirajući destruktivne efekte kristala leda (216). Stoga je održavanje amornog stanja i izbjegavanje kristalizacije upotrebljenog lioprotektanta od esencijalne važnosti za ovaj proces. To praktično znači da temperatura proizvoda u toku sušenja mora ostati ispod kritične temperature kolapsa (temperature staklastog prelaza, T_g). Ova temperatura za trehalozu iznosi oko -30°C i viša je nego kod drugih šećera, čime je omogućen širi temperaturni opseg za sušenje proizvoda (216).

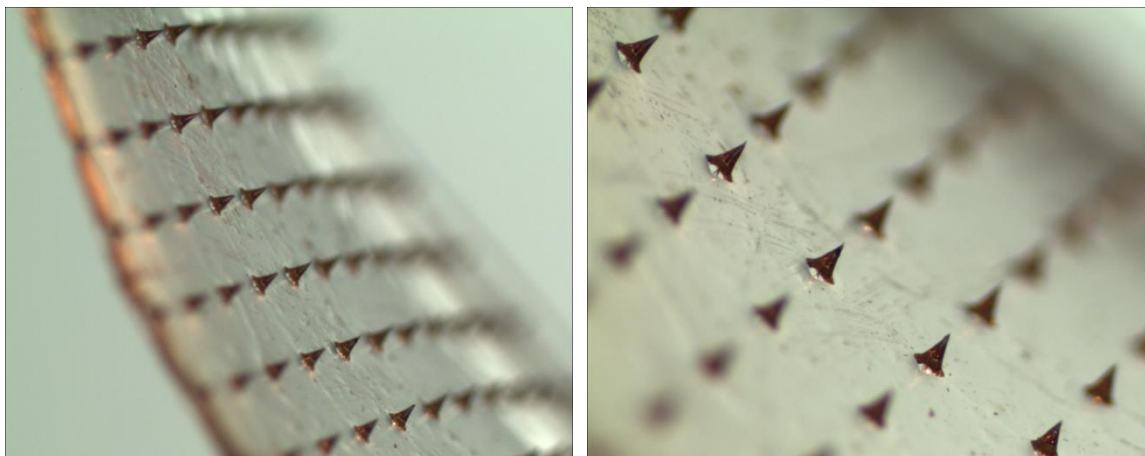
U ovom radu nije ispitivana stabilnost liofiliziranih PDLLA-KET nanočestica, budući da je cilj bio ispitivanje samo kratkoročne stabilnosti izrađenih nanočestica. Ipak, provjera sposobnosti lakog redispergovanja, veličine čestica i sadržaja lijeka vršena je za svaku seriju nanočestica dobijenih sušenjem zamrzavanjem. Razlike u vrijednostima analiziranih parametara, prije i poslije procesa liofilizacije su bile zanemarljive i bez statističke značajnosti (Student T-test, $p > 0.05$).

4.3.2. Stabilnost rastvorljivih mikroigala

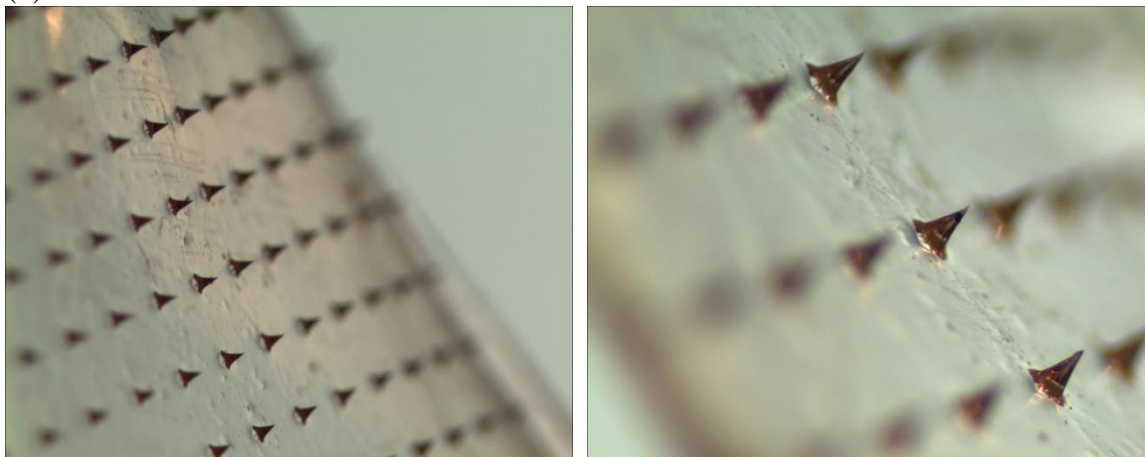
Rastvorljive mikroigle treba da se rastvore nakon penetracije u kožu, i na taj način omoguće oslobađanje ljekovite supstance. Pored ovog zahtjeva, materijal od kojeg su mikroigle izrađene treba da odgovara i zahtjevima za biokompatibilnost. Stoga se ugljeni hidrati, prirodni i sintetski polimeri, odgovarajućih karakteristika, smatraju materijalima izbora za izradu rastvorljivih mikroigala. Kao što je već objašnjeno u okviru poglavlja 1.3.2, materijali koji se koriste za izradu rastvorljivih mikroigala su biodegradabilni i biokompatibilni, i mogu da obezbjede željeno oslobađanje ljekovite supstance (trenutno ili produženo). Međutim, stabilnost ovako izrađenih mikroigala kao i inkorporiranog lijeka se dovodi u pitanje kada se za njihovu izradu upotrebljava materijal koji je osjetljiv na uslove sredine, kao što su vlaga i temperatura. Stoga je u ovom radu jedan od ciljeva bio da se ispita fizička i mehanička stabilnost mikroigala, kao i hemijska stabilnost inkorporiranog lijeka u kratkoročnom vremenskom periodu od 90 dana.

Za određivanje fizičke stabilnosti rastvorljivih mikroigala sa PDLLA-KET nanočesticama vršena je procjena fizičkog integriteta, oblika i izgleda mikroigala pomoću svjetlosnog mikroskopa sa ugrađenom digitalnom kamerom. Ispitivani uzorci su bili izloženi uslovima ubrzanog starenja u klima komori na $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i relativnoj vlažnosti vazduha od $75\% \pm 5\%$, kao i na uslovima dugoročnog čuvanja, na temperaturi od $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i relativnoj vlažnosti vazduha od $40\% \pm 5\%$ (kontrolna grupa). Rezultati su dobijeni vrednovanjem mikroigala na osnovu utvrđenih kriterijuma opisanih u poglavlju 3.2.5, i prikazanih u obliku mikrografija na (Slika 4-27) i grafičkog prikaza (Slika 4-28).

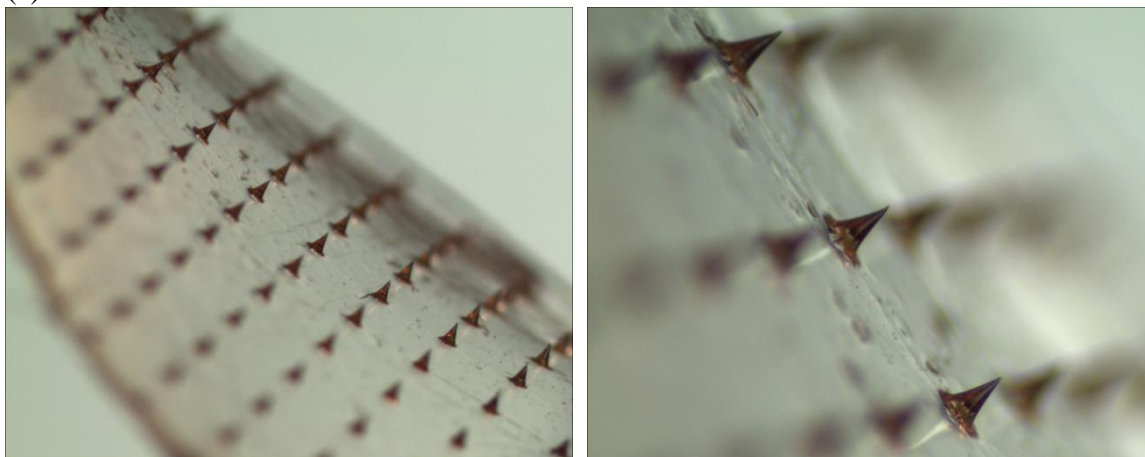
(a) dan 0



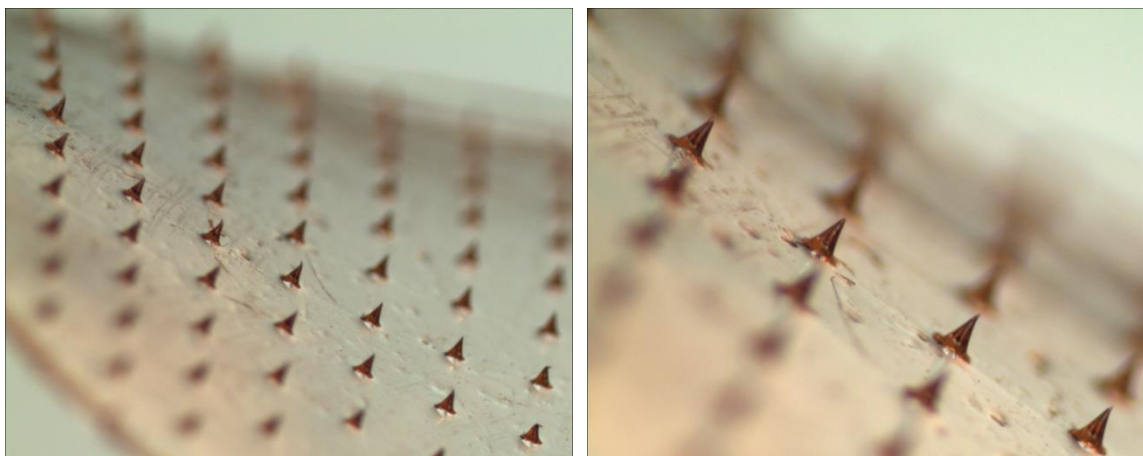
(b) dan 30



(c) dan 60



(d) dan 90



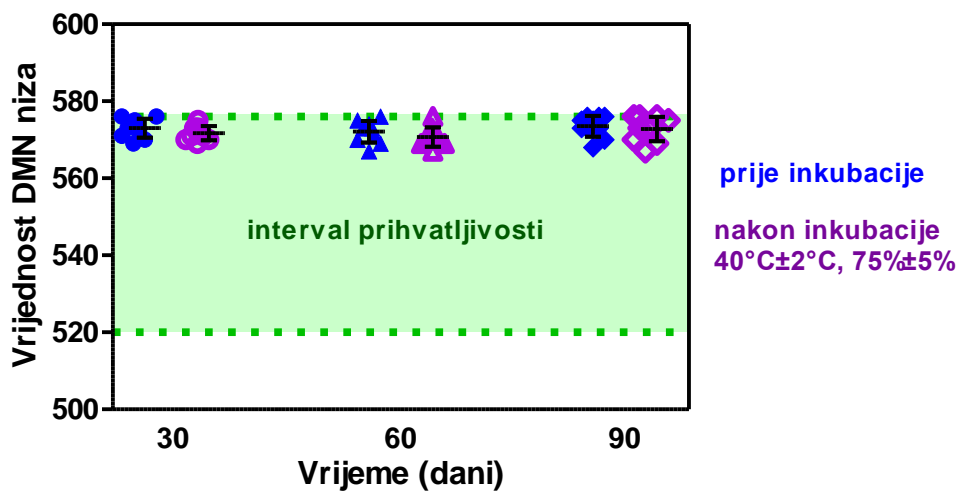
Slika 4-27. Mikrografije rastvorljivih mikroigala izrađenih od PDLLA-KET nanočestica: (a) na dan izrade, i nakon (b) 30 dana, (c) 60 dana, i (d) 90 dana.

Tokom cjelokupnog perioda trajanja kratkoročne studije stabilnosti, svi nizovi mikroigala zadržali su identičan izgled kao na dan izrade. Kao što se može uočiti na Slici 4-27, nije došlo do promjene fizičkog integriteta mikroigala. Različiti uslovi sredine, kojima su bili izloženi ispitivani uzorci, nisu imali značajnog uticaja na njihovu fizičku stabilnost. I nakon 90 dana, mikroigle su bile pravilnog piramidalnog oblika, sa oštrim vrhovima, što je rezultiralo odsustvom statistički značajnih razlika u vrijednosti izgleda i oblika mikroigala, nakon 30, 60 i 90 dana u odnosu na dan izrade (Slika 4-28). Vrijednosti svih ispitivanih nizova mikroigala bile su u intervalu od 566 – 576, što je u skladu sa postavljenim granicama specifikacije da svaki niz sadrži više od 90% mikroigala vrednovanih sa 4, tj. ima vrijednost veću od 520.

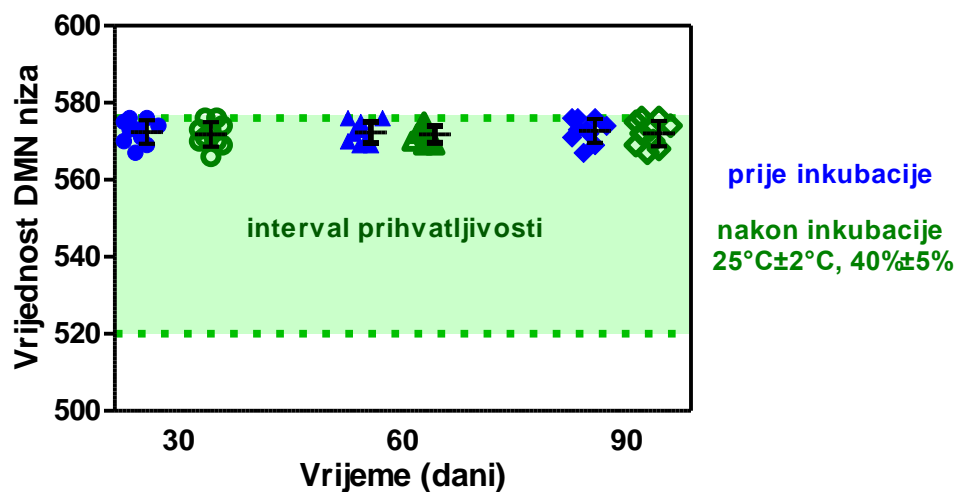
Nakon analize fizičke stabilnosti, nizovi ispitivanih mikroigala su rastvoreni prema protokolu detaljno opisanom u poglavlju 3.2.5. kako bi se odredila hemijska stabilnost ketoprofena. Sadržaj lijeka je određen primjenom HPLC metode, a dobijeni rezultati su potom upoređivani sa sadržajem lijeka u uzorcima na dan izrade (Slika 4-29). Vrijednosti sadržaja ketoprofena na dan izrade bile su $20,79 \pm 3,80 \mu\text{g}$ u uzorku koji je uključivao 144 mikroigle na površini potporne membrane od 1 cm^2 . Nakon 30, 60 i 90 dana inkubacije uzoraka na povišenoj temperaturi i vlažnosti vazduha sadržaj ketoprofena je iznosio $22,07 \pm 4,08 \mu\text{g}$, $20,01 \pm 1,41 \mu\text{g}$ i $21,16 \pm 2,81 \mu\text{g}$ po 1 cm^2 površine, respektivno. Kontrolni uzorci čuvani pod ambijentnim uslovima pokazali su

slične rezultate i sadržaj lijeka je iznosio $21,33 \pm 1,41 \mu\text{g}$, $20,36 \pm 2,70 \mu\text{g}$ i $21,33 \pm 2,45 \mu\text{g}$ nakon 30, 60 i 90 dana, respektivno.

(a)



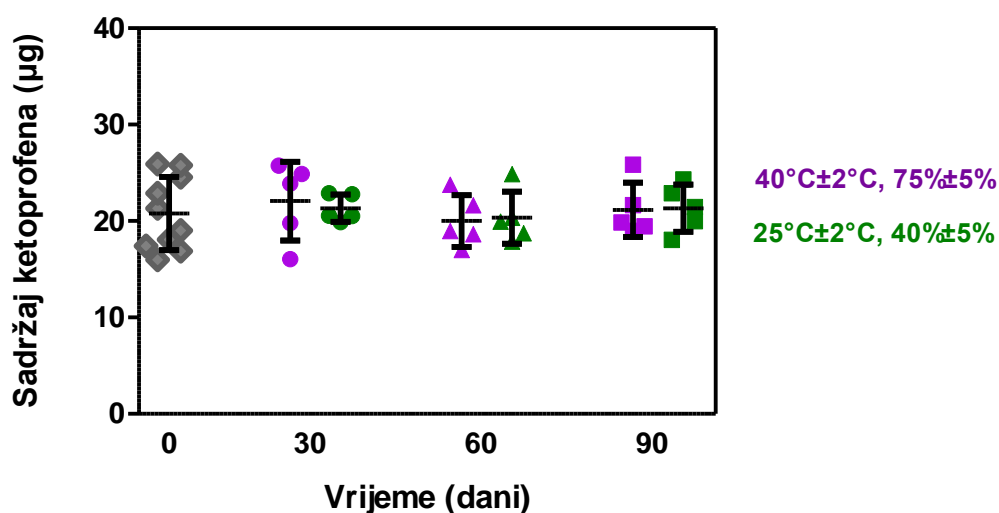
(b)



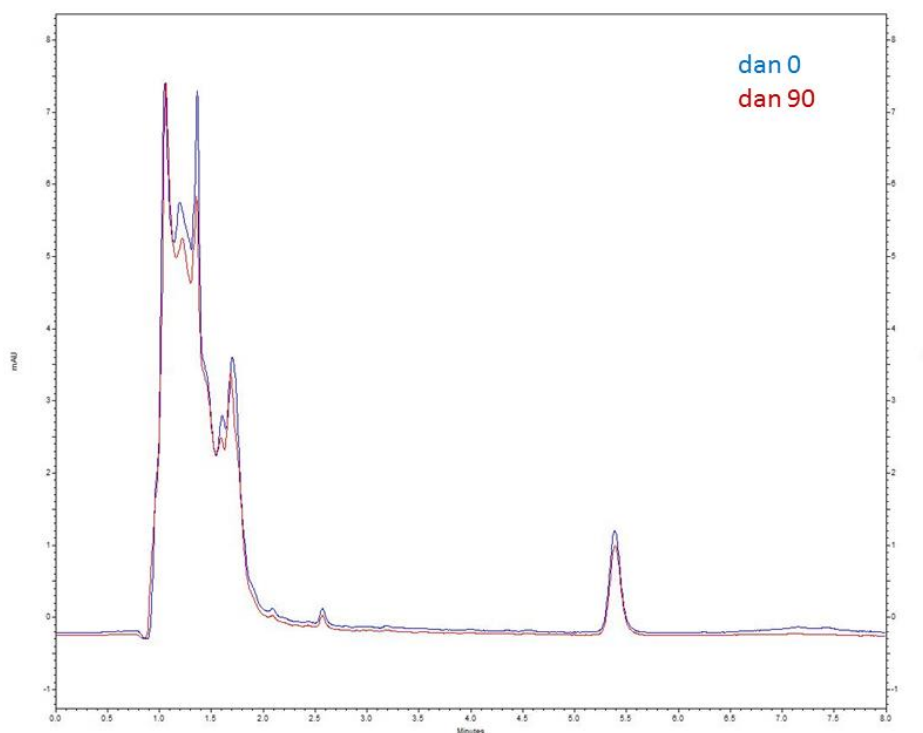
Slika 4-28. Fizička stabilnost (izgled oblika i vrha) rastvorljivih mikroigala izrađenih od PDLLA-KET nanočestica nakon inkubacije na: (a) temperaturi od $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i relativnoj vlažnosti vazduha od $75\% \pm 5\%$, i (b) temperaturi od $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i relativnoj vlažnosti vazduha od $40\% \pm 5\%$. Sr. vrijednost \pm SD, $n=10$. ANOVA, $p>0,05$.

Statistička analiza dobijenih rezultata primjenom jednofaktorske ANOVE, pokazala je da navedene vrijednosti sadržaja ketoprofena u rastvorljivim mikroiglama nisu statistički značajne ($p>0,05$) i da nema razlike između ispitivanih i kontrolnih

uzoraka mikroigala, kao ni rezultata dobijenih u različitim vremenskim intervalima uzoraka čuvanih na istim uslovima temperature i vlažnosti vazduha. Iako je sadržaj ketoprofena ostao nepromjenjen, za potpunu evaluaciju hemijske stabilnosti lijeka neophodno je da se ispita prisustvo degradacionih proizvoda. Na dobijenim hromatogramima nisu se mogli uočiti pikovi koji bi ukazali na eventualno prisustvo degradacionih produkata ketoprofena (3-acetilbenzofenon i 2-(3-karboksifenil) propionska kiselina), te se može zaključiti da hemijska stabilnost lijeka nije bila narušena u toku trajanja kratkoročne studije stabilnosti. Na Slici 4-30. prikazan je reprezentativni hromatogram ispitivanih uzoraka u studiji hemijske stabilnosti lijeka. Dobijeni rezultati koji ukazuju na očuvanu hemijsku stabilnost lijeka mogu se objasniti očuvanom fizičkom stabilnošću mikroigala, a potom i činjenicom da je lijek inkapsuliran u polimerne nanočestice. Iako primarni cilj inkapsulacije ketoprofena nije bila njegova zaštita od hemijske degradacije već postizanje produženog oslobađanja lijeka i poboljšanja njegove terapijske efikasnosti, jasno je da ovi nosači dodatno štite lijek od uticaja spoljašnje sredine.



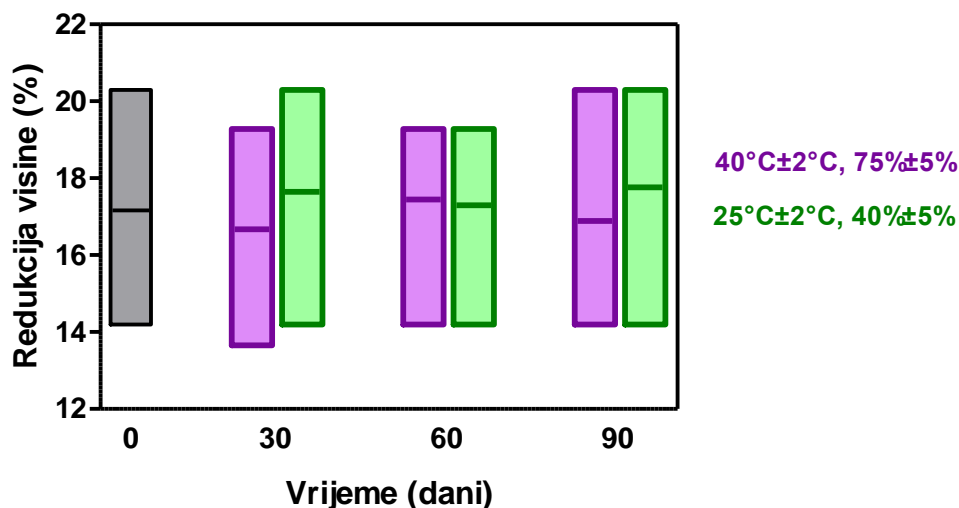
Slika 4-29. Sadržaj ketoprofena u ispitivanim uzorcima rastvorljivih mikroigala izrađenih od PDLLA-KET nanočestica u periodu od 90 dana. Sr. vrijednost ± SD, $n > 5$. ANOVA, $p > 0,05$.



Slika 4-30. Primjer hromatograma ketoprofena uzoraka rastvorljivih mikroigala izrađenih od PDLLA-KET i čuvanih pod uslovima ubrzanog starenja u periodu od 90 dana.

Još jedan važan parametar za stabilnost izrađenih mikroigala je njihova mehanička čvrstina tj procjena mehaničkih osobina. Kao što je prethodno objašnjeno, mehaničke osobine mikroigala imaju presudan uticaj na sposobnost njihove penetracije u kožu, a time i uspješnost isporuke ljekovite supstance, i konačno efikasnost terapije. U zavisnosti od formulacije, metode izrade i samog materijala od kojeg su izrađene, mehaničke osobine mikroigala mogu da se promjene pod uticajem uslova sredine. U ovom radu, ispitivana je sila neophodna da dovede do smanjenja visine ili loma mikroigle, pomoću digitalnog mjerača sile. Dobijeni rezultati ukazuju da su i nakon 3 mjeseca ispitivani uzorci rastvorljivih mikroigala zadržali iste mehaničke osobine koje su imale na dan izrade. Nakon izlaganja uzorka ekstremnim uslovima temperature i vlage, sila manje od 8 N/cm^2 nisu dovele do redukcije visine mikroigala. Slični rezultati dobijeni su i za kontrolne uzorke mikroigala čuvanih pod kontrolisanim ambijentnim uslovima (Slika 4-31). Statistička analiza je pokazala da se vrijednosti procenta

redukovane visine uzoraka mikroigala ispitivanih nakon 30, 60 i 90 dana, u poređenju sa vrijednostima na dan izrade nisu statistički razlokovale (ANOVA, $p > 0.05$).



Slika 4-31. Mehaničke osobine rastvorljivih mikroigala izrađenih od PDLLA-KET nanočestica na dan izrade i nakon inkubacije pod različitim uslovima u toku 90 dana. Sr. vrijednost ± SD, $n=10$. ANOVA, $p > 0,05$.

Jedan od načina zaštite lijeka od uticaja sredine i očuvanja hemijske stabilnosti jeste njegova inkapsulacija u koloidne čestice. Međutim, nije dovoljno zaštititi samo lijek, jer konačan ishod terapije zavisi i od fizičke stabilnosti mikroigala. Degradacija materijala ili bilo koji drugi vid narušavanja fizičkog integriteta mikroigala pod uticajem uslova sredine, ima za posljedicu inhibiciju njihove penetracije u kožu budući da mikroigle gube svoju mehaničku čvrstinu i lako dolazi do njihovog sabijanja pod pritiskom. Osim toga, pod uticajem temperature i vlage može da dođe i do topljenja polimernog matriksa, što može imati za posljedicu da vrh mikroigle postane tup ili zaobljen, što takođe rezultira smanjenjem penetracije u kožu jer zahtjeva primjenu veće sile tokom aplikacije (116). Degradacija materijala može da dovede i do redukovanja visine mikroigle, a time i do smanjenja sadržaja inkorporiranog lijeka i/ili nemogućnosti njegove isporuke na željenu dubinu u odgovarajućem sloju kože (191). Fazne transformacije unutar polimera korišćenog za izradu rastvorljivih mikroigala takođe mogu dovesti do destabilizacije mikroigala kao sistema za isporuku lijeka (106). Ovakav vid nestabilnosti direktno utiče na stabilnost inkorporiranog lijeka. Razmatrajući sve pomunete aspekte, smatra se da polimeri imaju određenu prednost u

odnosu na šećere kada su u pitanju materijali za izradu rastvorljivih mikroigala i obezbjeđuju veću stabilnost ljekovitih supstanci. Međutim, i pojedini polimeri, poput PVP su veoma higroskopni, i mogu dovesti do destabilizacije lijeka, jednako kao i šećeri. Osim toga, veliki uticaj na stabilnost ima i sastav formulacije za izradu rastvorljivih mikroigala, kao i metoda izrade, u okviru koje je najosjetljiviji korak sušenja.

Navedeni problemi i prepreke koje se mogu očekivati u toku izrade i čuvanja rastvorljivih mikroigala, kao konačnog farmaceutskog oblika, zahtjevaju detaljno razmatranje u svim fazama razvoja. Stoga su sveobuhvatna preformulaciona istraživanja, kao i sam postupak formulacije rastvorljivih mikroigala od suštinskog značaja za dobijanje stabilnog farmaceutskog proizvoda. Kako bi rastvorljive mikroigle postale održiva alternativa obloženim čvrstim mikroiglama i konvencionalnoj terapiji iglama, zahtjeva se njihova stabilnost u periodu od najmanje 1 do 2 godine (106). Iz pomenutih razloga, neophodno je sprovesti dalje studije stabilnosti rastvorljivih mikroigala formulisanih u ovom radu, kako bi se potvrdili dobijeni rezultati i dokazala dugoročna stabilnost ovih formulacija.

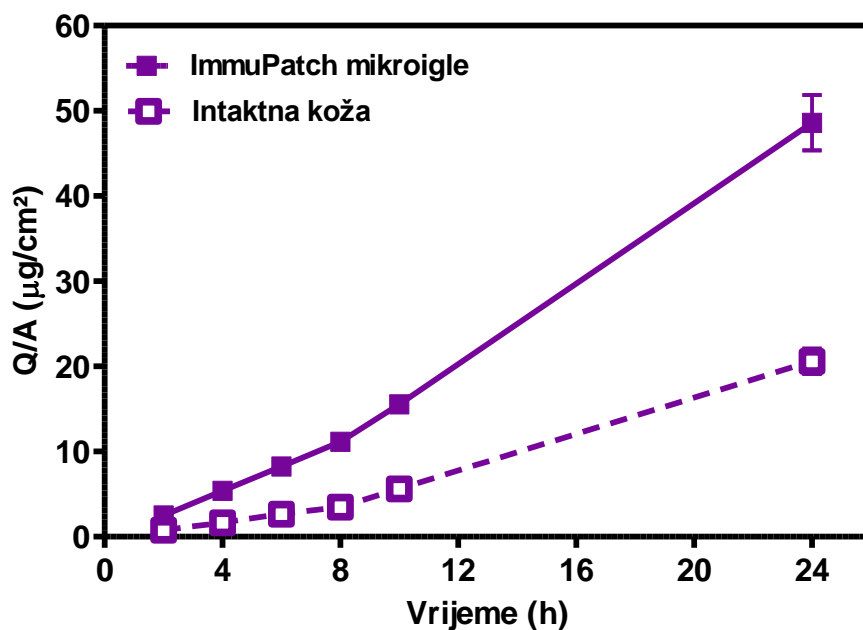
4.4. *Ex vivo* studije intradermalne/transdermalne isporuke ketoprofena

Nakon uspješne izrade i sveobuhvatne karakterizacije polaznih formulacija PDLLA-KET nanočestica i rastvorljivih mikroigala, posljednju fazu eksperimenata u ovom radu obuhvatale su studije intradermalne/transdermalne penetracije/permeacije ispitivanog model lijeka u/kroz uzorke kože svinje u *ex vivo* uslovima. Iako je opšte prihvaćeno da se za procjenu permeacije i/ili perkutane resorpcije najmjerodavniji rezultati dobijaju izvođenjem *in vivo* eksperimenata na ljudima, *in vitro* i *ex vivo* tehnike su mnogo češće zastupljene prije svega zbog potencijalne toksičnosti velikog broja ljekovitih supstanci, koje nisu pogodne za testiranje na ljudima (157). Brojni *in vitro* i *ex vivo* sistemi za ispitivanje perkutane penetracije/permeacije, koji su do sada opisani u literaturi ne pružaju podatke o metabolizmu, distribuciji lijeka i efektima protoka krvi na permeaciju. Ipak, njima se pripisuju brojne druge prednosti zahvaljujući kojim su našli široku primjenu u ispitivanju penetracije i permeacije ljekovite supstance iz farmaceutskih oblika za transdermalnu primjenu i simuliranje *in vivo* ponašanja (53). Svi eksperimenti penetracije/permeacije PDLLA nanočestica i rastvorljivih mikroigala

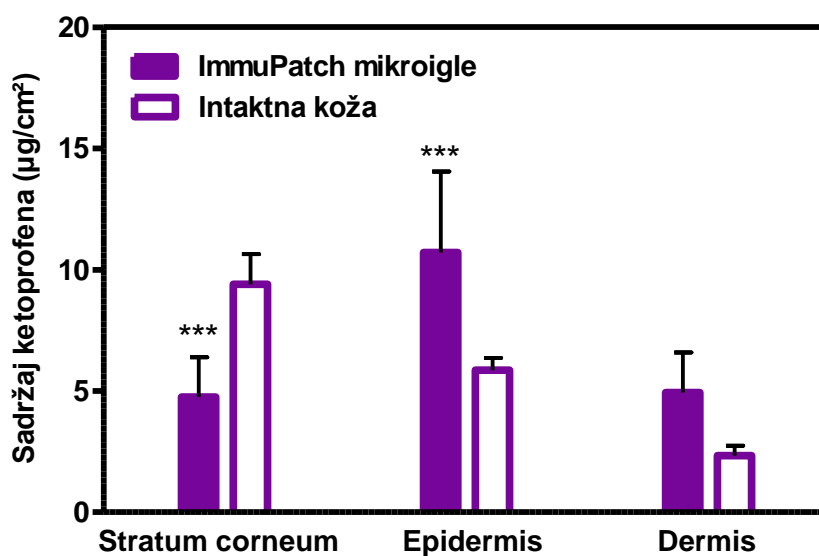
vršeni su *ex vivo*, korišćenjem uzoraka kože svinje ukupne debljine, koja se sastojala od *stratum corneum*-a, vijabilnog epidermisa i dermisa. Iako se sastav lipida u SC-u kože svinje razlikuje od humanog tkiva, koža svinje se ipak smatra najpogodnijom 'prirodnom' membranom za *in vitro* studije permeacije. Osim što imaju približno istu debljinu, humana koža i koža svinje pokazuju i najsličnije osobine permeabilnosti u poređenju sa svim drugim membranama koje se koriste u ovim eksperimentima (55).

Ispitivanje intradermalne/transdermalne penetracije/permeacije ketoprofena inkapsuliranog u polimerne nanočestice vršeno je aplikacijom različitih formulacija lijeka na uzorke kože svinje, kao membrane u Franz-ovim difuzionim ćelijama. U prvom eksperimentu primjenjena je disperzija PDLLA-KET nanočestica na kožu prethodno tretiranu silikonskim ImmuPatch mikroiglama. Dobijeni rezultati su potvrdili prethodno postavljenu hipotezu da primjena mikroigala dovodi do značajnog poboljšanja transporta lijeka u/ kroz kožu, u poređenju sa intaktnom kožom (Slika 4-32). Kumulativna količina ketoprofena koja je permeirala po jedinici površine (Q/A) kroz kožu svinje tretiranu mikroiglama, nakon 24 sata, je iznosila $48,6 \pm 3,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. U istom vremenskom periodu, dvostruko manja količina ketoprofena ($20,6 \pm 1,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) permeirala je iz polimernih nanočestica kroz kontrolne uzorke netretirane, intaktne kože (Slika 4-32.a). Prikazani permeacioni profili su u skladu sa vrijednostima dobijenim za fluks lijeka i koeficijent permeacije (K_p) i za ispitivane uzorke iznose $2,14 \pm 0,11 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ i $4,29 \pm 0,31 \text{ cm}/\text{h}/10^3$, respektivno. Vrijednosti istih parametara za kontrolne uzorke iznosile su $4,29 \pm 0,31$ i $1,87 \pm 0,15$ za fluks i K_p , respektivno (Tabela 4-9). Izračunavanjem odnosa vrijednosti fluksa ispitivanih i kontrolnih uzoraka (eng. *enhancement ratio*, ER) uočava se da je permeacija ketoprofena kroz mikroiglama tretiranu kožu bila 2,3 puta veća od permeacije kroz intaktnu kožu. Takođe, lag-vrijeme ukazuje da je period za postizanje ravnotežnog stanja koncentracije lijeka kroz membranu (koža ukupne debljine) bilo duže kod kontrolnih uzoraka (Tabela 4-9).

(a)



(b)



Slika 4-32. Rezultati penetracije/permeacije ketoprofena poslije primjene disperzije PDLLA-KET nanočestica: (a) kumulativna količina ketoprofena koja je permeirala u akceptorski medijum po jedinici površine kože svinje (Q/A) u toku 24 sata, i (b) količina ketoprofena deponovana u različitim slojevima kože svinje nakon 24 sata. Sr. vrijednost \pm SD, n=3.

Parametar lag-vrijeme je značajan sa aspekta određivanja difuzionog koeficijenta lijeka, ali samo ako se radi o jednostavnim izotropnim fizičkim membranama, čija je

debljina poznata. Međutim, koža svakako ne predstavlja izotropnu membranu, već kompleksan sistem. Drugi veoma važan aspekt je debljina kože, budući da je lag-vrijeme direktno proporcionalno kvadratu debljine membrane. Postavlja se pitanje da li se debljina kože odnosi samo na SC, ili barijeru za permeaciju ljekovitih supstanci predstavljaju i dublji slojevi kože? Odgovor na ovo pitanje u najvećoj mjeri zavisi od fizičko-hemijskih osobina samog permeanta (ljekovita supstanca ili koloidni nosač). Osim toga, jednostavno mjerenje debljine isječaka kože koja se koristi u *in vitro* eksperimentima ne uzima u obzir da difuzija lijeka kroz različite slojeve kože nije pravolinijski put, nego mnogo vjerovatnije krivudava putanja (55). Smatra se da lag-vrijeme treba da bude zanemarljivi dio (najčešće 1/10) projektovanog vremena upotrebe transdermalnog sistema. Tako na primjer, ukoliko je sistem za transdermalnu isporuku lijeka dizajniran da bude primjenjen na kožu i otpušta ljekovitu supstancu u toku 24 sata, optimalno lag-vrijeme bi bilo 2-3 sata. Sve vrijednosti veće od ovih otvaraju pitanje korisnosti formulacije ovakvog sistema (217). Budući da je jedan od ciljeva inkapsulacije ketoprofena u PDLLA nanočestice u našem radu bilo i postizanje produženog oslobađanja lijeka, na osnovu iznijetog tumačenja može se zaključiti da lag-vrijeme <2 h opravdava formulaciju ovih sistema.

Količina ketoprofena deponovana u različitim slojevima kože prikazana je na Slici 4-32.b. Primjenom tehnike adhezivnih traka, iz *stratum corneum*-a ekstrahovano je $4,8 \pm 1,6$ μg ketoprofena, dok je u epidermisu i dermisu bilo deponovano $10,7 \pm 3,3$ i $4,9 \pm 1,7$ μg lijeka na površini kože od 1 cm^2 koja je tretirana mikroiglama. Dobijene vrijednosti sadržaja ketoprofena u SC i u epidermisu se statistički značajno razlikuju, u poređenju sa vrijednostima za kontrolne uzorke (ANOVA, Tukey test $p < 0.001$). Dobijeni rezultati ukazuju na sposobnost ImmuPatch silikonskih mikroigala da poboljšaju permeabilnost kože za PDLLA-KET nanočestice stvaranjem mikropora u SC-u. Pokazalo se da je na ovaj način narušena glavna barijera za isporuku lijeka u/kroz kožu, što je bio jedan od ciljeva ovog rada. Ova zapažanja su u skladu sa nedavno objavljenom studijom u kojoj su ImmuPatch mikroigle uspješno formirale pore u SC, epidermisu i dermisu kože miševa, i time dovele do poboljšanja permeabilnosti ove barijere (193). Takođe, u nekoliko radova drugih istraživačkih grupa objavljeni su slični rezultati poboljšanja permeacije ljekovitih supstanci inkapsuliranih u koloidne nosače i primjenjenih lokalno na kožu prethodno tretiranu čvrstim mikroiglama (218-220). Kada

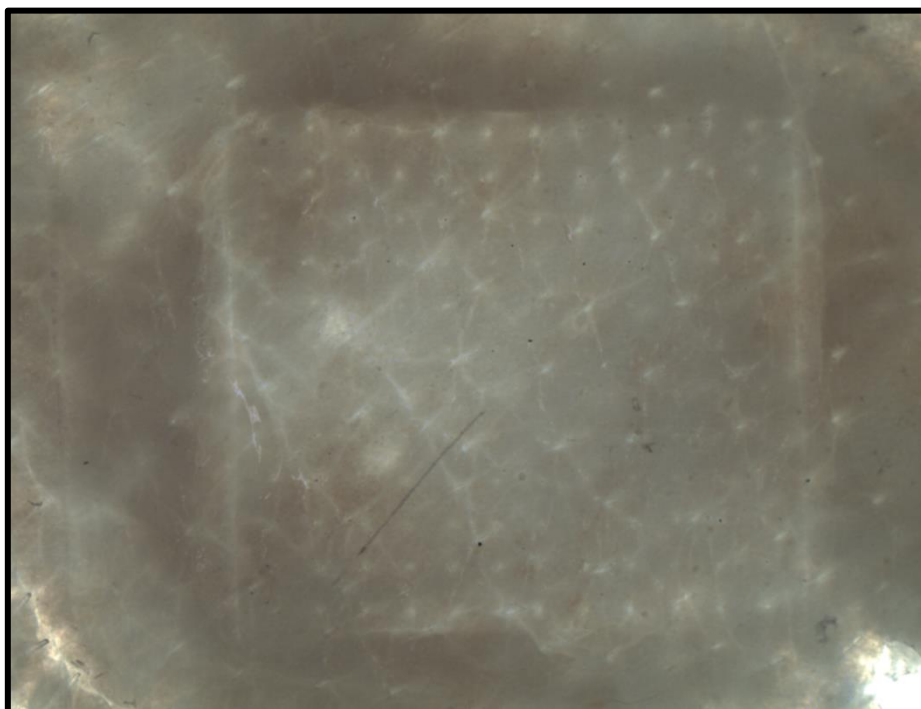
je riječ o ketoprofenu, Stahl i saradnici su primjenili čvrste mikroigle od titanijuma za pred-tretman kože u svojoj *in vitro* studiji ispitivanja permeacije slobodnog ketoprofena i takođe pokazali poboljšanje permeacije ovog lijeka (221). Efekat tretmana kože čvrstim mikroiglama na prelazak/resorpciju ketoprofena u kožu, formulisanog u obliku hidrogela, u *in vivo* studijama na miševima, pokazalo se pozitivnim jer je dovelo do poboljšne transdermalne resorpcije slobodnog lijeka (222). Međutim, postoje brojni faktori koji treba da se razmotre kada se upoređuju rezultati koji su objavljeni u različitim studijama. To su prije svega mehaničke i fizičke osobine mikroigala, način njihove primjene, kao i vrsta uzorka kože koja se koristi za ispitivanje. Rezultati eksperimenata na intaktnoj koži, u ovom radu pokazali su da je najveća količina lijeka deponovana u SC-u, kao i da inkapsulacija lijeka u čestice nanovelčina ne poboljšava njihovu penetraciju u statistički značajnoj mjeri. Nedavna studija u kojoj je, u *in vitro* uslovima, ispitivana primjena PLGA nanočestica na intaktnu kožu u toku 24 sata, pokazala je da je moguća detekcija inkapsuliranog lijeka u akceptorskom medijumu, što ukazuje na njegovu uspješnu permeaciju (162). Međutim, površina ovih nanočestica je bila obložena citozanom i modifikovana primjenom PEG i oleinske kiseline, koja se smatra veoma potentnim hemijskim inhenserom. Stoga se dobijeni rezultati u navedenoj studiji mogu objasniti modifikacijama površinskih karaktiristika nanonosaa lijeka. U većini drugih studija, primjećena je samo ograničena penetracija polimernih nanočestica kroz intaktnu kožu, koja se pripisuje penetraciji kroz otvore folikula dlaka na koži (96, 162, 223). Međutim, mikroigle formiraju mnogo gušće kanale, u poređenju sa folikulima dlake, omogućavajući bolju penetraciju nanočestica (220). Na osnovu ovih zaključaka i prethodno prikazanih rezultata, slijedi da mikrokanali formirani u koži nakon primjene čvrstih ImmuPatch mikroigala omogućavaju uspješnu penetraciju PDLLA-KET nanočestica kroz epidermalnu membranu, njihovo deponovanje u dermisu, i istovremeno postepenu permeaciju kroz ovaj sloj kože u toku 24 sata. U poređenju sa pasivnim transportom kroz intaktnu kožu, ovakav pristup smatra se efikasnijim za isporuku lijeka inkapsuliranog u nanočestice do ciljnih tkiva.

Tabela 4-9. Vrijednosti fluksa, lag-vremena i koeficijenta permeacije (K_p) u *ex vivo* studijama permeacije PDLLA-KET nanočestica kroz uzorke kože svinje.

Parametar	ImmuPatch	Intaktna koža
Fluks ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	$2,14 \pm 0,11$	$0,93 \pm 0,07$
Lag-vrijeme (h)	$1,89 \pm 0,20$	$2,81 \pm 0,11$
K_p ($\text{cm}/\text{h}/10^{-3}$)	$4,29 \pm 0,31$	$1,87 \pm 0,15$

U drugom eksperimentu, ispitivana je penetracija/permeacija PDLLA-KET nanočestica formuliranih u obliku čvrstih rastvorljivih mikroigala (DMN 1). Cilj ove studije bio je da se istraži mogućnost isporuke lijeka u kožu iz rastvorljivih mikroigala izrađenih metodom atomizacije i raspršivanja tečnosti, kao čvrstog farmaceutskog oblika. Pored toga, korišćenjem kontrolnih uzoraka rastvorljivih mikroigala izrađenih od PVA i slobodnog lijeka (DMN 2), bilo je moguće ispitati potencijalno produženo oslobađanje ketoprofena inkapsuliranog u nanočestice. Kada je riječ o primjeni rastvorljivih mikroigala, osnovni preduslov za isporuku lijeka je njihova uspješna penetracija. Sposobnost penetracije rastvorljivih mikroigala zavisi od velikog broja faktora, o kojima je detaljno diskutovano u okviru prethodnih poglavlja. Zahvaljujući prvenstveno svom obliku i dobrim mehaničkim osobinama, rastvorljive mikroigle sa slobodnim i inkapsuliranim lijekom uspješno su penetrirale kroz uzorke kože svinje (Slika 4-33). Jasno se uočava patern od 12×12 mikropora na uzorcima kože, koji dokazuje da je penetracija svih 144 mikroigala bila uspješna. U prilog ovome su i rezultati analize sadržaja ketoprofena deponovanog u SC-u, epidermisu i dermisu, u različitim vremenskim intervalima, koji takođe dokazuju da je došlo do penetracije mikroigala i oslobađanja lijeka u kožu.

(a)

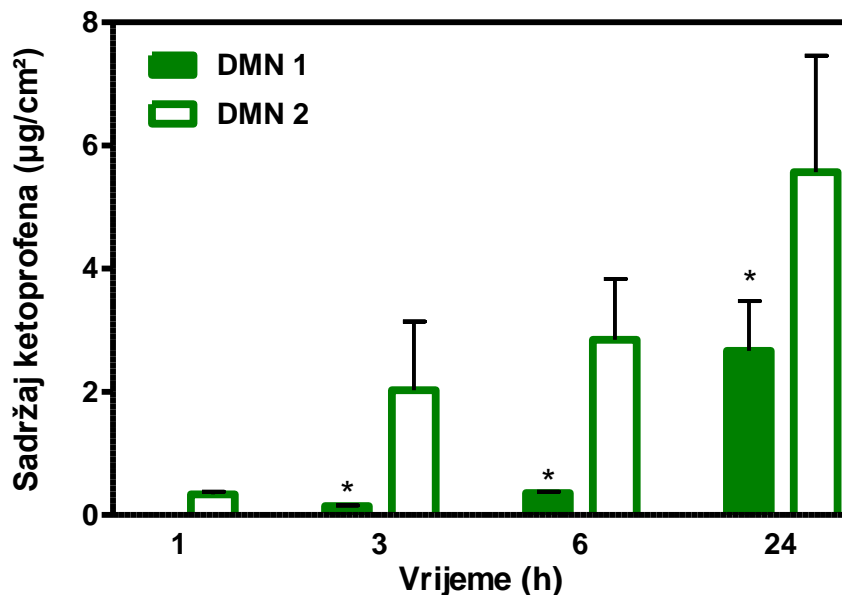


(b)



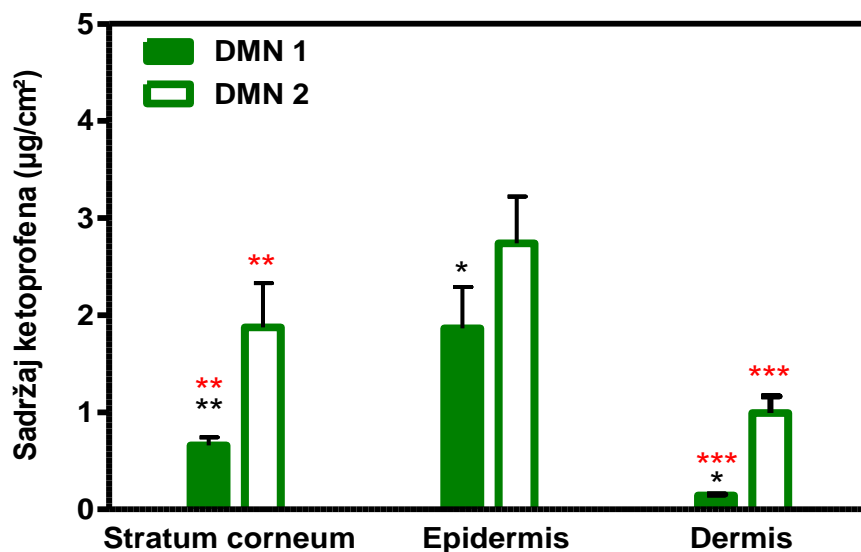
Slika 4-33. Mikrografije uzoraka kože svinje nakon aplikacije rastvorljivih mikroigala sa: (a) PDLLA-KET nanočesticama – DMN 1, i (b) PVA-KET – DMN 2.

Na Slici 4-34. data je ukupna količina deponovanog lijeka u uzorcima kože svinje u toku cjelokupnog trajanja eksperimenta. Nakon 60 minuta, nije bilo moguće izmjeriti količinu ketoprofena iz DMN 1 ni u jednom sloju kože, iako se analizom izgleda mikroigala ustanovilo da su se, nakon ovog vremena, mikroigle djelimično rastvorile u koži, što dokazuje smanjenje dužine mikroigala i prisustvo zaobljenih vrhova u poređenju sa oštrim vrhovima prisutnim prije aplikacije. Ovakav rezultat je očekivan i ukazuje da, u roku od 60 minuta, nije došlo do oslobađanja inkapsuliranog ketoprofena iz PDLLA nanočestica, ili su eventualno oslobođene količine lijeka bile nemjerljive (ispod limita detekcije lijeka). Istovremeno u kontrolnim uzorcima, ukupna količina slobodnog lijeka oslobođenog iz DMN 2 je iznosila $0,33 \pm 0,04 \mu\text{g}$. Nakon 3 i 6 sati, ukupne količine ketoprofena oslobođenog iz PDLLA nanočestica i deponovanog u koži bile su $0,14 \pm 0,01 \mu\text{g}$ i $0,36 \pm 0,03 \mu\text{g}$, respektivno. Ove vrijednosti su se značajno razlikovale od količine ketoprofena oslobođenog iz uzoraka DMN 2 (ANOVA, $p < 0,001$). Slični rezultati dobijeni su i nakon 24 sata, kada je iz uzoraka DMN 1 i DMN2 oslobođeno ukupno $0,14 \pm 0,01 \mu\text{g}$ i $0,36 \pm 0,03 \mu\text{g}$, lijeka, respektivno.



Slika 4-34. Vrijednosti ukupne količine ketoprofena primjenjenog u formi nosača DMN 1 i DMN 2 i deponovanog u uzorcima kože svinje u toku 24 h. Sr. vrijednost \pm SD, $n=3$. ANOVA post hoc Tukey test, * $p < 0,05$ statistički značajne razlike u odnosu na DMN 2.

(a)



(b) DMN 1



(c) DMN 2



Slika 4-35. Usporedni prikaz: (a) vrijednosti količine ketoprofena deponovanog u uzorcima kože svinje, i izgleda (b) DMN 1 i (c) DMN 2 mikroigala 24 h nakon aplikacije. Sr. vrijednost \pm SD, $n=3$. ANOVA post hoc Tukey test, *** $p<0,001$, ** $p<0,01$ statistički značajne razlike SC-a i dermisa u odnosu na epidermis. ** $p<0,01$, * $p<0,05$ statistički značajne razlike DMN 1 u odnosu na DMN 2.

Nakon 24 sata, mikroigle su bile potpuno rastvorene i na 3M trakama mogu se vidjeti samo ostaci CMC potporne membrane (Slika 4-35). U slučaju kontrolnih uzoraka (DMN 2), brzina rastvaranja mikroigala je bila u skladu sa kinetikom oslobađanja i deponovanja lijeka u koži, tokom cijelog trajanja eksperimenta. Međutim, to nije bio slučaj kada su u pitanju uzorci DMN 1, budući da su, i nakon potpunog rastvaranja mikroigala, iz kože ekstrahirane znatno niže količine lijeka. Ovakvi

rezultati ukazuju na tačnost postavljene hipoteze da je inkapsulacija lijeka u PDLLA nanočestice dovela do njegovog produženog oslobađanja u poređenju sa slobodnim lijekom formulisanim u uzorku DMN 2. Rezultati su takođe pokazali da je, u svim ispitivanim vremenskim intervalima, najveća količina ketoprofena deponovana u epidermisu, potom u SC-u, a najmanja u dermisu. Ovakvi rezultati mogu se objasniti dužinom mikroigala koja je iznosila $<280 \mu\text{m}$, što je znatno kraće od svih rastvorljivih mikroigala do sada korištenih u sličnim eksperimentima, gdje je dužina mikroigala uglavnom iznosila $>500 \mu\text{m}$ (117, 129, 224). U prethodno objavljenim studijama o ispitivanju penetracije čvrstih silikonskih mikroigala (dužine $280 \mu\text{m}$) na humanoj koži, tehnikom optičke koherentne tomografije (OCT) je pokazano da samo oko 61–64% od dužine mikroigle penetrira u kožu (225). Takođe, uočeno je da, pri penetraciji u *in vivo* uslovima, silikonske mikroigle deformišu epidermis na način da vrše njegovu kompresiju ispod mikropore. Uzimajući u obzir navedena zapažanja, kao i dužinu rastvorljivih mikroigala korištenih u prikazanim eksperimentima, može se zaključiti da su male količine ketoprofena deponovane u dermisu očekivane.

Efikasnost penetracije rastvorljivih mikroigala u najvećoj mjeri zavisi od njihovih mehaničkih osobina koje su rezultat sastava polazne formulacije. Značajnost uticaja materijala upotrebljenog za izradu rastvorljivih mikroigala metodom atomizacije i raspršivanja tečnosti, na kapacitet njihove penetracije u različite slojeve kože svinje ispitivali su McGrath i sar. (194). Za izradu rastvorljivih mikroigala autori ove studije su koristili različite materijale na bazi polimera i ugljenih hidrata, i sve izrađene mikroigle su uspješno penetrirale u SC. Međutim, kada je riječ o penetraciji u dublji sloj vijabilnog epidermisa, samo neke od formulacija su dovele do uspješne penetracije (PVA, PVP, HPMC, trehaloza), dok je većina dovela samo do kompresije ovog sloja kože, ali ne i penetracije (Na-alginat, CMC, fruktoza). Zanimljivo je i da nijedna od ispitivanih formulacija mikroigala nije dovela do penetracije u dermis, vjerovatno zbog njihove dužine od $280 \mu\text{m}$. Rezultati opisane studije se mogu dovesti u vezu sa rezultatima eksperimenata rađenih u okviru ove disertacije, budući da su u oba slučaja korišćene mikroigle na bazi polimera, koje su imale iste dužine i bile izrađene istom metodom. Iako uzorci kože u eksperimentima *ex vivo* penetracije u ovom radu nisu histološki analizirani jer je osnovni cilj bila kvantifikacija deponovanog lijeka u koži, na osnovu dobijenih rezultata gdje je značajno veća količina lijeka deponovana u

epidermisu u poređenju sa SC, može se zaključiti da su DMN 1 i DMN 2 mikroigle uspješno penetrirale u oba sloja kože (SC i epidermis). Da je došlo samo do kompresije epidermisa a ne do potpune penetracije u ovaj sloj, očekivane vrijednosti za količinu ekstrahovanog lijeka bile bi u korist SC. Takođe, može se zaključiti da su male količine ketoprofena u dermisu najvjerovatnije posljedica difuzije ketoprofena iz epidermisa u dermis, a ne direktne penetracije mikroigala i oslobađanja lijeka u najdublji sloj kože. Dodatno, treba imati u vidu da efikasnost i dubina penetracije mikroigala u kožu, osim već pomenutih mehaničkih osobina i materijala izrade mikroigala, dijelom zavisi i od pritiska odn. sile primjenjene tokom aplikacije, kao i dužine trajanja aplikacije. Naime, pokazano je da ova dva faktora u značajnoj mjeri mogu povećati dubinu penetracije, u zavisnosti od anatomskog mjesta primjene (226). U okviru eksperimenata rađenih u ovom radu, parametri pritiska i dužine aplikacije bili su konstantni, i zapažena je visoka efikasnost penetracije svih mikroigala u nizu (Slika 4-33), koja se može smatrati ekvivalentnom u poređenju sa drugim studijama gdje su korišćene mnogo duže mikroigle (226). Ipak neophodne su detaljnije studije histološke analize uzoraka kože primjenom odgovarajućih tehnika (OCT, konfokalna fluorescentna mikroskopija i dr.) kako bi se potvrdila ova tumačenja i optimizovala dubina penetracije svake pojedinačne mikroigle u izrađenom nizu.

Kada je riječ o permeaciji ketoprofena nakon primjene rastvorljivih mikroigala na kožu, u datim uslovima nije bilo moguće detektovati ljekovitu supstancu u akceptorskom medijumu. Objašnjenje ovakvog rezultata je vjerovatno u veoma niskom sadržaju lijeka u ispitivanom farmaceutskom obliku ($20,79 \pm 3,80 \mu\text{g}$ i $26,94 \pm 4,17 \mu\text{g}$ za DMN 1 i DMN 2, respektivno) i velikom volumenu akceptorskog medijuma (15 ml), zajedno sa osjetljivošću analitičke metode (dobijene vrijednosti limita detekcije i kvantifikacije ketoprofena iznosile su 0.04 i $0.12 \mu\text{g/ml}$, respektivno). Osim toga, nivo permeacije lijeka u eksperimentima na Franz-ovim ćelijama zavisi i od vrste upotrebene membrane (koža ukupne debljine ili isječki samo određenih slojeva kože) (55). Kada se koristi cijela koža, kao što je slučaj u našem radu, permeacija lipofilnih lijekova poput ketoprofena može biti redukovana u poređenju sa izdvojenim jednoslojnim membranama kože (227). Razlog za to je prisustvo dermisa koji kao hidrofilni sloj kože predstavlja barijeru za prolazak lipofilnih molekula (55). Ovaj zaključak potvrdio je i Garland sa saradnicima istražujući transdermalnu isporuku

različitih ljekovitih supstanci formuliranih u obliku rastvorljivih PMVE/MA (polimetilvinil eter-ko-maleinska kiselina) mikroigala (228). Rezultati ove studije su pokazali smanjenu permeaciju svih ispitivanih supstanci kroz uzorke kože svinje ukupne debljine, u poređenju sa isječcima kože. Upravo zbog toga, upotreba cijele kože je od koristi u testiranju lipofilnih lijekova kako bi se dobili što vjerodostojniji rezultati fluksa lijeka i što približnije oponašali *in vivo* uslovi. Permeacija ljekovite supstance je uspješno dokazana u brojnim radovima samo primjenom silikonskih mikroigala i već pomenutih principa 'poke and patch' (73, 218-220). Uspješnost istog principa perkutane isporuke lijeka pokazana je i u našem radu, u okviru prvog eksperimenta primjene disperzije PDLLA-KET nanočestica na uzorke kože svinje, prethodno tretirane ImmuPatch mikroiglama. Ipak, do sada nema objavljenih radova o isporuci lijekova putem rastvorljivih mikroigala izrađenih metodom atomizacije i raspršivanja tečnosti. Većina studija koje su se bavile istraživanjem perkutane isporuke lijeka pomoću rastvorljivih mikroigala dobijenih drugim metodama, bile su ograničene samo na rezultate penetracije i deponovanja lijeka u različite slojeve kože (lokalna, intradermalna isporuka) (192, 228-230). Podaci o permeaciji i fluksu lijeka kroz uzorke kože u *in vitro* uslovima, kao i malobrojne *in vivo* studije na miševima, objavljene su samo za rastvorljive mikroigle čija se dužina kreće od 600-1000 μm (228, 231, 232) Sadržaj ketoprofena u disperziji PDLLA-KET nanočestica je bio više od 6 puta veći od sadržaja lijeka u DMN 1 i DMN 2 mikroiglama. Stoga je, u našem posebnom slučaju, vjerovatnije da je razlog neuspješne permeacije doza ljekovite supstance primjenjene po jedinici površine kože nego tip upotrebljenih mikroigala. Transdermalna isporuka ketoprofena u obliku rastvorljivih mikroigala može se značajno poboljšati primjenom nizova mikroigala veće površine i gustine, kao i formulacijom viših doza lijeka u duže mikroigle većeg volumena (219, 233). Konačno, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da rastvorljive mikroigle izrađene metodom atomizacije i raspršivanja tečnosti mogu uspješno penetrirati u kožu i biti upotrebljene kao sistemi za trenutnu ili produženu isporuku lijeka u/kroz kožu, u zavisnosti od osobina lijeka/nosača i same formulacije, što je bio i osnovni cilj ove faze eksperimentalnog rada.

Prikazanim studijama nedostaju *in vivo* ispitivanja formulacija razvijenih u ovoj disertaciji, kako bi se ispitaio uticaj različitih efekata koji nisu prisutni/uključeni u *ex*

vivo istraživanja, i postigao potpuniji uvid u karakteristike i efekte lijeka primjenjenog u obliku ovakvih vrsta nosača.

5. ZAKLJUČCI

U ovoj doktorskoj disertaciji primjenom modifikovane metode izmještanja solvensa izrađene su PDLLA nanočestice u koje je inkapsuliran ketoprofen, ljekovita supstanca teško rastvorljiva u vodi. Nakon sveobuhvatne karakterizacije dobijenih PDLLA nanočestica sa inkapsuliranim ketoprofenom, ova formulacija je korišćena za izradu rastvorljivih mikroigala metodom atomizacije i raspršivanja tečnosti. Na osnovu prikazanih rezultata, može se zaključiti sljedeće:

- ❖ Razvijena je HPLC metoda za određivanje ketoprofena u nanočesticama i svi parametri validacije metode odgovaraju kriterijumima prihvatljivosti i dokazuju da je predložena metoda specifična, selektivna, precizna, tačna i reproduktivna za kvalitativno i kvantitativno određivanje ketoprofena inkapsuliranog u polimerne nanočestice.
- ❖ Optimizacijom metode primjenjene za izradu polimernih nanočestica uspješno je inkapsuliran lijek u velikom procentu ($75,3 \pm 0,96\%$). Utvrđeno je da visoke koncentracije ketoprofena i primjena PVA, kao stabilizatora, dovode do povećane količine inkapsuliranog lijeka.
- ❖ Poređenjem aktivnih i placebo uzoraka polimernih nanočestica pokazano je da proces inkapsulacije ketoprofena nije doveo do promjene morfoloških karakteristika, oblika i raspodjele veličina izrađenih PDLLA nanočestica. Dobijene su nanočestice sfernog oblika, koje je odlikovao visok stepen uniformnosti veličina, u opsegu od $117,6 \pm 0,55$ do $144,8 \pm 1,80$ nm. U poređenju sa literaturnim podacima, može se zaključiti da je kod izrađenih nanočestica postignuta optimalna korelacija između željenog oblika, veličine čestica i ostvarene efikasnosti inkapsulacije.
- ❖ Fizička karakterizacija PDLLA nanočestica je potvrdila prisustvo lijeka u PDLLA nanočesticama, ali i postojanje interakcija između polimera i inkapsuliranog lijeka, i ulogu ketoprofena kao plastifikatora u ispitivanim uzorcima PDLLA-KET nanočestica. Na osnovu ovih rezultata došlo se do zaključka da interakcije između ketoprofena i PDLLA utiču na kinetiku oslobađanja lijeka iz polimernog matriksa i odgovorne su za efekat inicijalnog naglog otpuštanja lijeka. Pored ovog efekta, rezultati termalne analize su pokazali da ketoprofen najvjerojatnije ima i aktivnu

termičku ulogu u ispitivanom sistemu, budući da je uočeno da su nanočestice termički blago stabilnije.

- ❖ Rezultati ispitivanja degradacije polimera i brzine oslobađanja lijeka, potvrdili su postavljenu hipotezu da se inkapsulacijom ketoprofena u PDLLA nanočestice može postići produženo oslobađanje lijeka, u odnosu na konvencionalne nosače. U toku 7 dana, oslobođeno je oko 60% lijeka inkapsuliranog u PDLLA nanočestice. Zaključeno je da se oslobađanje ketoprofena iz nanosfera odvija procesima difuzije i erozije matriksa, ali i da se difuzija, dešava brže nego erozija PDLLA matriksa, te predstavlja glavni mehanizam oslobađanja ketoprofena. Tokom difundovanja ka vodenoj sredini, lijek interaguje sa polimernim lancima, povećava njihovu pokretljivost i omogućava penetraciju vode unutar materijala i na taj način utiče na kinetiku procesa degradacije polimera.
- ❖ Merenjem zeta potencijala uzoraka nanočestica dobijeni su očekivani rezultati koji ukazuju na negativno naelektrisanu površinu PDLLA-KET nanočestica, i elektrostatičke interakcije koje polarne grupena krajevima lanaca polimera uspostavljaju sa ketoprofenom. Uz elektrostatičku, i sterna stabilizacija, koja je posljedica prisustva PVA kao stabilizatora, doprinijela je zadovoljavajućoj kratkoročnoj stabilnosti nanočestica.
- ❖ Rezultati dobijeni u drugom dijelu doktorske disertacije su pokazali da se primjenom tehnike atomizacije i raspršivanja disperzije PDLLA-KET nanočestica mogu dobiti mikrokapljice koje omogućavaju bolje kvašenje unutrašnjih zidova šupljina kalupa za izradu mikroigala, čime je bilo omogućeno dobijanje mikroigala oštih vrhova i pravilne piramidalne strukture. Zadovoljavajuće morfološke karakteristike mikroigala ostvarene su primjenom Taguchi eksperimentalnog dizajna za optimizaciju procesa. Uočeno je da metoda atomizacije i raspršivanja tečnog uzorka prevazilazi nedostatke drugih metoda za punjenje kalupa, poput slabog kvašenja njegovih unutrašnjih šupljina, i na taj način obezbjeđuje izradu rastvorljivih mikroigala sa ujednačenim sadržajem ljekovite supstance.

- ❖ Budući da je potvrđeno da primjena oštrijih mikroigala rezultira uspješnijom isporukom lijeka u poređenju sa mikroiglama ravnih ivica i vrha, primjenjena metoda atomizacije i raspršivanja tečnosti može biti istaknuta kao jednostavna, ekonomična i izuzetno efikasna metoda izrade rastvorljivih mikroigala. Dodatno, došlo se do zaključka da ova metoda pruža mogućnost za izradu mikroigala različitog dizajna i od različitih materijala, što može donijeti značajan napredak na polju kontrolisanog oslobađanja lijeka i/ili primjene kombinovane terapije, odnosno dva lijeka u istom nosaču.
- ❖ Rezultati procjene mehaničkih osobina izrađenih rastvorljivih mikroigala pokazali su rigidnu, nefleksibilnu i veoma čvrstu strukturu mikroigala, koja je rezultat njihovog slojevitog dizajna. Budući da sposobnost mikroigle da podnese silu/pritisak prilikom aplikacije na kožu, zavisi upravo od njene mehaničke čvrstine (koja je određena metodom izrade, čvrstinom materijala upotrebljenog za izradu i dimenzijama mikroigle), može se očekivati da će mikroigle ovakvih karakteristika uspješno penetrirati i dovesti do isporuke lijeka u ciljna tkiva.
- ❖ U prilog prethodnom zaključku govore i rezultati *ex vivo* studija na uzorcima kože svinje, gdje je potvrđena uspješna penetracija izrađenih rastvorljivih mikroigala, ali i produženo oslobađanje ketoprofena iz PDLLA nanočestica ugrađenih u rastvorljive mikroigle, u poređenju sa oslobađanjem lijeka iz konvencionalnih nosača primjenjenih na intaktnu kožu. Zaključeno je da se nakon primjene rastvorljivih mikroigala u koži formiraju mikrokanali, koji omogućavaju uspješnu isporuku PDLLA nanočestica sa inkapsuliranim lijekom.
- ❖ Međutim, uočeno je i ograničenje izrađenih nizova rastvorljivih mikroigala, koje se ogleda u malom procentu sadržaja lijeka, što je, u ovom radu, otežalo detekciju ketoprofena u najdubljim slojevima kože. Ipak, primjena istog uzorka nanočestica u obliku disperzije na kožu tretiranu silikonskim mikroiglama sličnih osobina kao izrađene rastvorljive mikroigle, dovela je do permeacije lijeka kroz kožu, što ukazuje na moguću transdermalnu primjenu. Navedeno ograničenje

rastvorljivih mikroigala može lako biti prevaziđeno primjenom površinski većih nizova sa dužim mikroiglama, većeg volumena i gustine po jedinici površine potporne membrane.

- ❖ Rezultati kratkoročne studije stabilnosti ukazali su da nije došlo fizičkih i hemijskih promjena u toku 90 dana. Ipak, kako bi rastvorljive mikroigle postale održiva alternativa obloženim čvrstim mikroiglama i terapiji konvencionalnim iglama, zahtjeva se njihova stabilnost u periodu od najmanje 1 do 2 godine. Stoga je neophodno sprovesti dalje studije stabilnosti rastvorljivih mikroigala formulisanih u ovom radu, kako bi se potvrdili dobijeni rezultati i dokazala dugoročna stabilnost ovih formulacija.
- ❖ Shodno dobijenim rezultatima kroz sve faze doktorske disertacije, može se izvesti generalni zaključak da su dobijene formulacije PDLA nanočestica sa inkapsuliranim ketoprofenom, koje su formulisane u obliku rastvorljivih mikroigala, pokazale veliki potencijal za produženu intradermalnu i transdermalnu isporuku leka. Izrađene rastvorljive mikroigle, kao novi sistemi za isporuku leka u/kroz kožu mogu dati veliki doprinos unapređenju konvencionalne terapije i poboljšanju terapijske efikasnosti lijeka i adherence pacijenta, što je konačan cilj u razvoju svakog farmaceutskog oblika.

6. LITERATURA

1. Veerapandian M, Yun K. The state of the art in biomaterials as nanobiopharmaceuticals. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 2009;4(2):243-262.
2. Balać I, Bugarski B, Ćosić I, Dramićanin M, Đorđević D, Filipović N, Ignjatović N, Janačković Đ, Kojić M, Manojlović V, Marković Z, Obradović B, Pajić Lijaković I, Pavlov M. *Biomaterijali*. Beograd: Institut tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti: Društvo za istraživanje materijala; 2010.
3. Morrow Jr KJ, Bawa R, Wei C. Recent advances in basic and clinical nanomedicine. *Medical Clinics of North America*. 2007;91(5):805-843.
4. Mohanraj V, Chen Y. Nanoparticles-a review. *Trop J Pharm Res*. 2007;5(1):561-573.
5. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Nanomedicine: Current status and future prospects. *The FASEB Journal*. 2005;19(3):311-330.
6. Lane ME. Nanoparticles and the skin-applications and limitations. *Journal of Microencapsulation*. 2011;28(8):709-716.
7. Šetrajić JP, Popović JK, Šetrajić-Tomić AJ. Nanotechnologies in medicine: Nanostructured materials in biopharmacy. *MD-Medical data*. 2012;4(4):395-403.
8. Ignjatovic N, Ninkov P, Ajdukovic Z, Vasiljevic-Radovic D, Uskokovic D. Biphasic calcium phosphate coated with poly-d, l-lactide-co-glycolide biomaterial as a bone substitute. *Journal of the european ceramic society*. 2007;27(2):1589-1594.
9. Cegnar M, Kristl J, Kos J. Nanoscale polymer carriers to deliver chemotherapeutic agents to tumours. 2005.
10. Sathe TR, Agrawal A, Nie S. Mesoporous silica beads embedded with semiconductor quantum dots and iron oxide nanocrystals: Dual-function microcarriers for optical encoding and magnetic separation. *Analytical Chemistry*. 2006;78(16):5627-5632.
11. Hughes GA. Nanostructure-mediated drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2005;1(1):22-30.
12. Hallab N, Jacobs J, Katz J, Ratner B, Hoffman A, Schoen F, Lemons J. *Biomaterials science, an introduction to materials in medicine*. BD Ratner, AS Hoffman, FJ Schoen and JE Lemons; 2004.
13. Suggs LJ, Moore SA, Mikos AG. Synthetic biodegradable polymers for medical applications. *Physical properties of polymers handbook*: Springer; 2007. p. 939-950.
14. Suh KY, Seong J, Khademhosseini A, Laibinis PE, Langer R. A simple soft lithographic route to fabrication of poly (ethylene glycol) microstructures for protein and cell patterning. *Biomaterials*. 2004;25(3):557-563.
15. Colombo G, Langer R, Kohane DS. Effect of excipient composition on the biocompatibility of bupivacaine-containing microparticles at the sciatic nerve. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2004;68(4):651-659.
16. Ignjatovic N, Uskokovic D. Kompozitni biomaterijali na bazi hidroksiapatita i polimera kao supstituenti tvrdog tkiva. *Tehnika*. 2002;57(2):a-1.
17. Torbica S, Vuleta G. Savremeni nosači za transdermalnu primjenu lijekovitih supstanci. *Arhiv za farmaciju*. 2009;59(6):524-535.
18. Savić S, Gluščević I, Milić J, Vuleta G. Nanodisperzni sistemi kao nosači lekovitih supstanci. *Arhiv za farmaciju*. 2005;55(3):237-254.
19. Hans M, Lowman A. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2002;6(4):319-327.
20. Owens III DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006;307(1):93-102.
21. Torbica S, Vuleta G, Ignjatović N, Uskoković D. Polimerne nanočestice - nosači za transdermalnu primjenu lijekovitih supstanci. *Tehnika-Novi materijali*. 2009;18(4):1-14.
22. Guillet J, Gilead D, Scott G. *Degradable polymers: Principles and applications*. Chapman & Hall, London, UK. 1995.

23. Ahlers M, Krone V, Walch A. Microparticles from biodegradable polymers. *Advanced Materials*. 1992;4(3):230-234.
24. Wischke C, Schwendeman SP. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in pla/plga microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;364(2):298-327.
25. Ignjatović NL, Ninkov P, Sabetrasekh R, Uskoković DP. A novel nano drug delivery system based on tigecycline-loaded calciumphosphate coated with poly-dl-lactide-co-glycolide. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2010;21(1):231-239.
26. Ignjatović N, Uskoković V, Ajduković Z, Uskoković D. Multifunctional hydroxyapatite and poly (d, l-lactide-co-glycolide) nanoparticles for the local delivery of cholecalciferol. *Materials Science and Engineering: C*. 2012.
27. Lemoine D, Francois C, Kedzierewicz F, Preat V, Hoffman M, Maincent P. Stability study of nanoparticles of poly (ϵ -caprolactone), poly (d, l-lactide) and poly (d, l-lactide-co-glycolide). *Biomaterials*. 1996;17(22):2191-2197.
28. Hayashi T. Biodegradable polymers for biomedical uses. *Progress in Polymer Science*. 1994;19(4):663-702.
29. Stevanović MM, Jordović B, Uskoković DP. Preparation and characterization of poly (d, l-lactide-co-glycolide) nanoparticles containing ascorbic acid. *BioMed Research International*. 2007;2007.
30. O'Hagan DT, Singh M, Gupta RK. Poly (lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled-release vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1998;32(3):225-246.
31. Göpferich A, Teßmar J. Polyanhydride degradation and erosion. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002;54(7):911-931.
32. Burkersroda Fv, Schedl L, Göpferich A. Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials*. 2002;23(21):4221-4231.
33. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*. 2000;21(23):2335-2346.
34. Gunatillake PA, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 2003;5(1):1-16.
35. Gupta A, Kumar V. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers—polylactide: A critique. *European Polymer Journal*. 2007;43(10):4053-4074.
36. Kumar M. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *J Pharm Pharm Sci*. 2000;3(2):234-258.
37. Shah S, Cha Y, Pitt C. Poly (glycolic acid-co-dl-lactic acid): Diffusion or degradation controlled drug delivery? *Journal of Controlled Release*. 1992;18(3):261-270.
38. Jovanovic I, Jordovic B, Petkovic M, Ingngjatovic N, Uskokovic D. Preparation of smallest microparticles of poly-d,l-lactide by modified precipitation method: Influence of the process parameters. *Microscopy Research and Technique*. 2008;71(2):86-92.
39. Hu H-T, Shin T-C, Lee S-Y, Chen C-C, Yang J-C. Influence of hydrolytic degradation on the surface properties of poly-5d/95l-lactide resorbable bone plates. *Polymer Degradation and Stability*. 2011;96(8):1522-1529.
40. Rowe RC, Sheskey PJ, Cook WG, Quinn ME. *Handbook of pharmaceutical excipients—7th edition*. 2013.
41. Morrow D, McCarron P, Woolfson A, Donnelly R. Innovative strategies for enhancing topical and transdermal drug delivery. *The Open Drug Delivery Journal*. 2007;1:36-59.
42. Surber C, Smith EW. The mystical effects of dermatological vehicles. *Dermatology*. 2005;210(2):157-168.
43. Blank IH. Further observations on factors which influence the water content of the stratum corneum¹. *Journal of Investigative Dermatology*. 1953;21(4):259-271.

44. Scheuplein RJ. Mechanism of percutaneous absorption. *Journal of Investigative Dermatology*. 1967;48(1):79-88.
45. Thomas BJ, Finnin BC. The transdermal revolution. *Drug Discovery Today*. 2004;9(16):697-703.
46. Benson HA. Transdermal drug delivery: Penetration enhancement techniques. *Current Drug Delivery*. 2005;2(1):23-33.
47. Committee JF, Britain RPSoG. British national formulary (bnf): Pharmaceutical Press; 2012.
48. Holbrook KA, Odland GF. Regional differences in the thickness (cell layers) of the human stratum corneum: An ultrastructural analysis. *Journal of Investigative Dermatology*. 1974;62(4):415-422.
49. Lazo ND, Meine JG, Downing DT. Lipids are covalently attached to rigid corneocyte protein envelopes existing predominantly as β -sheets: A solid-state nuclear magnetic resonance study. *Journal of Investigative Dermatology*. 1995;105(2):296-300.
50. Hill J, Paslin D, Wertz P. A new covalently bound ceramide from human stratum corneum— ω -hydroxyacylphytosphingosine. *International Journal of Cosmetic Science*. 2006;28(3):225-230.
51. Norlen L, Plasencia I, Bagatolli L. Stratum corneum lipid organization as observed by atomic force, confocal and two-photon excitation fluorescence microscopy. *International Journal of Cosmetic Science*. 2008;30(6):391-411.
52. Potts RO, Francoeur ML. The influence of stratum corneum morphology on water permeability. *Journal of Investigative Dermatology*. 1991;96(4):495-499.
53. Gibson M. *Pharmaceutical preformulation and formulation: A practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form*: Interpharm Press; 2001.
54. Chu LY. *Dissolving microneedles for cutaneous drug and vaccine delivery*: PhD Thesis, Georgia Institute of Technology; 2009.
55. Williams A. *Transdermal and topical drug delivery from theory to clinical practice*. London: Pharmaceutical Press; 2003.
56. Geerligs M. *Skin layer mechanics*: PhD Thesis, TU Eindhoven; 2010.
57. Haut RC. *Biomechanics of soft tissue. Accidental injury*: Springer; 2002. p. 228-253.
58. Roberts MS, Cross SE, Pellett MA. Skin transport. *DRUGS AND THE PHARMACEUTICAL SCIENCES*. 2002;119:89-196.
59. Roxhed N. *A fully integrated microneedle-based transdermal drug delivery system*: KTH; 2007.
60. Dokka S, Cooper SR, Kelly S, Hardee GE, Karras JG. Dermal delivery of topically applied oligonucleotides via follicular transport in mouse skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 2005;124(5):971-975.
61. Potts RO, Francoeur ML. Lipid biophysics of water loss through the skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990;87(10):3871-3873.
62. Mills SB, Bloch M, Bruckner F. Double-blind cross-over study of ketoprofen and ibuprofen in management of rheumatoid arthritis. *British Medical Journal*. 1973;4(5884):82.
63. Sridevi S, Diwan PVR. Optimized transdermal delivery of ketoprofen using ph and hydroxypropyl- β -cyclodextrin as co-enhancers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2002;54(2):151-154.
64. Hadgraft J, Plessis Jd, Goosen C. The selection of non-steroidal anti-inflammatory agents for dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000;207(1):31-37.
65. Kalia YN, Guy RH. Modeling transdermal drug release. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;48(2-3):159-172.
66. Barratt GM. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharmaceutical Science & Technology Today*. 2000;3(5):163-171.

67. Shohin IE, Kulinich JI, Ramenskaya GV, Abrahamsson B, Kopp S, Langguth P, . . . Barends DM. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: Ketoprofen. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;101(10):3593-3603.
68. White S. Topical non-steroidal anti-inflammatory drugs (nsaids) in the treatment of inflammatory musculoskeletal disorders. Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids. 1991;43(4):209-222.
69. Halpern S. Topical non-steroidal anti-inflammatory drugs: A review of their use and toxicity. *Journal of dermatological treatment*. 1994;5(2):103-107.
70. Tettey-Amlalo RNO. In vitro release of ketoprofen from proprietary and extemporaneously manufactured gels: PhD Thesis, Rhodes University; 2006.
71. Ignjatović N, Liu C, Czernuszka J, Uskoković D. Micro-and nano-injectable composite biomaterials containing calcium phosphate coated with poly (dl-lactide-co-glycolide). *Acta Biomaterialia*. 2007;3(6):927-935.
72. Brown MB, Martin GP, Jones SA, Akomeah FK. Dermal and transdermal drug delivery systems: Current and future prospects. *Drug Delivery*. 2006;13(3):175-187.
73. Bariya SH, Gohel MC, Mehta TA, Sharma OP. Microneedles: An emerging transdermal drug delivery system. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012;64(1):11-29.
74. Stevanovic M, Ignjatovic N, Jordovic B, Uskokovic D. Stereological analysis of the poly-(dl-lactide-co-glycolide) submicron sphere prepared by solvent/non-solvent chemical methods and centrifugal processing. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2007;18(7):1339-1344.
75. Wagenblast G. Method for producing polymer nanoparticles. Google Patents; 2007.
76. Coombes AGA, Davis SS, Schacht EH. Polymer microspheres and a method of production thereof. WO Patent App. PCT/GB1995/000,686; 1995.
77. Sonnevile-Aubrun O, Simonnet J-T, L'alloret F. Nanoemulsions: A new vehicle for skincare products. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2004;108:145-149.
78. Cappa Silva A, Koester L, Mayorga P, Linck Bassani V, Teixeira H. Development and validation of a HPLC method for determination of genistein in topical nanoemulsions. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007;62(10):732-734.
79. Jenning V, Schäfer-Korting M, Gohla S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: Drug release properties. *Journal of Controlled Release*. 2000;66(2):115-126.
80. Lippacher A, Müller R, Mäder K. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001;214(1):9-12.
81. Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001;47(2):165-196.
82. Müller R, Radtke M, Wissing S. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002;54:S131-S155.
83. Milić J, Kovačević A, Savić S, Vuleta G. Solid lipid nanoparticles: Properties and applications. *Arhiv za farmaciju*. 2005;55(5-6):540-558.
84. Kreilgaard M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002;54:S77-S98.
85. Kogan A, Garti N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2006;123:369-385.
86. Đekić L, Primorac M. Microemulsion systems: Characteristics and application in drug delivery. *Arhiv za farmaciju*. 2007;57(6):355-374.
87. El Maghraby GM, Williams AC, Barry BW. Oestradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: Refinement of surfactant concentration. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000;196(1):63-74.

88. Fang J-Y, Hwang T-L, Huang Y-L. Liposomes as vehicles for enhancing drug delivery via skin routes. *Current Nanoscience*. 2006;2(1):55-70.
89. Verma D, Verma S, Blume G, Fahr A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003;258(1):141-151.
90. Dragicevic-Curic N, Winter S, Stupar M, Milic J, Krajišnik D, Gitter B, Fahr A. Temoporfin-loaded liposomal gels: Viscoelastic properties and *in vitro* skin penetration. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009;373(1):77-84.
91. Choi M, Maibach H. Liposomes and niosomes as topical drug delivery systems. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2005;18(5):209-219.
92. Shahiwala A, Misra A. Studies in topical application of niosomally entrapped nimesulide. *J Pharm Pharm Sci*. 2002;5(3):220.
93. Vauthier C, Couvreur P. Developing nanoparticle drug carriers. *Pharmaceutical Technology Europe*. 2007;19(1).
94. Lövestam G, Rauscher H, Roebben G, Klüttgen BS, Gibson N, Putaud J-P, Stamm H. Considerations on a definition of nanomaterial for regulatory purposes. *Joint Research Centre (JRC) Reference Reports*. 2010:80004-80001.
95. Garnett M, Kallinteri P. Nanomedicines and nanotoxicology: Some physiological principles. *Occupational Medicine*. 2006;56(5):307-311.
96. Alvarez-Román R, Naik A, Kalia Y, Guy RH, Fessi H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J Control Release*. 2004;99(1):53-62.
97. Lboutounne H, Chaulet J-F, Ploton C, Falson F, Pirot F. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly (ϵ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. *Journal of Controlled Release*. 2002;82(2):319-334.
98. Shim J, Seok Kang H, Park W-S, Han S-H, Kim J, Chang I-S. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2004;97(3):477-484.
99. Cevc G, Mazgareanu S, Rother M. Preclinical characterisation of nsoids in ultradeformable carriers or conventional topical gels. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;360(1):29-39.
100. Alves MP, Scarrone AL, Santos M, Pohlmann AR, Guterres SS. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007;341(1):215-220.
101. Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug target insights*. 2007;2:147-157.
102. Luengo J, Weiss B, Schneider M, Ehlers A, Stracke F, König K, . . . Schaefer U. Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2006;19(4):190-197.
103. Eerikäinen H, Peltonen L, Raula J, Hirvonen J, Kauppinen EI. Nanoparticles containing ketoprofen and acrylic polymers prepared by an aerosol flow reactor method. *AAPS PharmSciTech*. 2004;5(4):129-137.
104. Rother M, Lavins BJ, Kneer W, Lehnhardt K, Seidel EJ, Mazgareanu S. Efficacy and safety of epicutaneous ketoprofen in transfersome (idea-033) versus oral celecoxib and placebo in osteoarthritis of the knee: Multicentre randomised controlled trial. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2007;66(9):1178-1183.
105. Donnelly RF, Majithiya R, Singh TRR, Morrow DI, Garland MJ, Demir YK, . . . Scott CJ. Design, optimization and characterisation of polymeric microneedle arrays prepared by a novel laser-based micromoulding technique. *Pharmaceutical Research*. 2011;28(1):41-57.
106. McGrath M. Design and characterisation of microneedles for percutaneous vaccine delivery: PhD Thesis, University College Cork; 2011.
107. Gerstel MS, Place VA. Drug delivery device. *Google Patents*; 1976.

108. Hashmi S, Ling P, Hashmi G, Reed M, Gaugler R, Trimmer W. Genetic transformation of nematodes using arrays of micromechanical piercing structures. *Biotechniques*. 1995;19(5):766-770.
109. Henry S, McAllister DV, Allen MG, Prausnitz MR. Microfabricated microneedles: A novel approach to transdermal drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1998;87(8):922-925.
110. Kaushik S, Hord AH, Denson DD, McAllister DV, Smitra S, Allen MG, Prausnitz MR. Lack of pain associated with microfabricated microneedles. *Anesthesia & Analgesia*. 2001;92(2):502-504.
111. Xie Y, Xu B, Gao Y. Controlled transdermal delivery of model drug compounds by mems microneedle array. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2005;1(2):184-190.
112. Shawgo RS, Richards Grayson AC, Li Y, Cima MJ. Biomems for drug delivery. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2002;6(4):329-334.
113. Escobar-Chávez JJ, Bonilla-Martínez D, Angélica M, Molina-Trinidad E, Casas-Alancaster N, Revilla-Vázquez AL. Microneedles: A valuable physical enhancer to increase transdermal drug delivery. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2011;51(7):964-977.
114. McAllister DV, Allen MG, Prausnitz MR. Microfabricated microneedles for gene and drug delivery. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2000;2(1):289-313.
115. Park J-H, Allen MG, Prausnitz MR. Biodegradable polymer microneedles: Fabrication, mechanics and transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2005;104(1):51-66.
116. Park J-H, Choi S-O, Kamath R, Yoon Y-K, Allen MG, Prausnitz MR. Polymer particle-based micromolding to fabricate novel microstructures. *Biomedical Microdevices*. 2007;9(2):223-234.
117. Chu LY, Choi SO, Prausnitz MR. Fabrication of dissolving polymer microneedles for controlled drug encapsulation and delivery: Bubble and pedestal microneedle designs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;99(10):4228-4238.
118. McGrath MG, Vrdoljak A, O'Mahony C, Oliveira JC, Moore AC, Crean AM. Determination of parameters for successful spray coating of silicon microneedle arrays. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;415(1-2):140-149.
119. Banga AK. *Transdermal and intradermal delivery of therapeutic agents: Application of physical technologies*. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2011.
120. Wang PM, Cornwell M, Prausnitz MR. Minimally invasive extraction of dermal interstitial fluid for glucose monitoring using microneedles. *Diabetes technology & therapeutics*. 2005;7(1):131-141.
121. Miyano T, Tobinaga Y, Kanno T, Matsuzaki Y, Takeda H, Wakui M, Hanada K. Sugar micro needles as transdermic drug delivery system. *Biomedical Microdevices*. 2005;7(3):185-188.
122. Milewski M, Brogden NK, Stinchcomb AL. Current aspects of formulation efforts and pore lifetime related to microneedle treatment of skin. *Expert opinion on drug delivery*. 2010;7(5):617-629.
123. Wang P-C, Wester BA, Rajaraman S, Paik S-J, Kim S-H, Allen MG, editors. *Hollow polymer microneedle array fabricated by photolithography process combined with micromolding technique*. Engineering in Medicine and Biology Society, 2009 EMBC 2009 Annual International Conference of the IEEE; 2009: IEEE.
124. Davis SP, Landis BJ, Adams ZH, Allen MG, Prausnitz MR. Insertion of microneedles into skin: Measurement and prediction of insertion force and needle fracture force. *Journal of Biomechanics*. 2004;37(8):1155-1163.
125. Teo MAL, Shearwood C, Ng KC, Lu J, Moochhala S. In vitro and in vivo characterization of mems microneedles. *Biomedical Microdevices*. 2005;7(1):47-52.
126. Jin CY, Han MH, Lee SS, Choi YH. Mass producible and biocompatible microneedle patch and functional verification of its usefulness for transdermal drug delivery. *Biomedical Microdevices*. 2009;11(6):1195-1203.

127. Aggarwal P, Johnston C. Geometrical effects in mechanical characterizing of microneedle for biomedical applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2004;102(2):226-234.
128. Donnelly RF, Morrow DI, McCarron PA, Woolfson AD, Morrissey A, Juzenas P, . . . Moan J. Microneedle-mediated intradermal delivery of 5-aminolevulinic acid: Potential for enhanced topical photodynamic therapy. *Journal of Controlled Release*. 2008;129(3):154-162.
129. Park J-H, Choi S-O, Seo S, Choy YB, Prausnitz MR. A microneedle roller for transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010;76(2):282-289.
130. Laurent PE, Bonnet S, Alchas P, Regolini P, Mikszta JA, Pettis R, Harvey NG. Evaluation of the clinical performance of a new intradermal vaccine administration technique and associated delivery system. *Vaccine*. 2007;25(52):8833-8842.
131. Alarcon JB, Hartley AW, Harvey NG, Mikszta JA. Preclinical evaluation of microneedle technology for intradermal delivery of influenza vaccines. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2007;14(4):375-381.
132. Holland D, Booy R, De Looze F, Eizenberg P, McDonald J, Karrasch J, . . . Reid J. Intradermal influenza vaccine administered using a new microinjection system produces superior immunogenicity in elderly adults: A randomized controlled trial. *Journal of Infectious Diseases*. 2008;198(5):650-658.
133. Laurent PE, Bourhy H, Fantino M, Alchas P, Mikszta JA. Safety and efficacy of novel dermal and epidermal microneedle delivery systems for rabies vaccination in healthy adults. *Vaccine*. 2010;28(36):5850-5856.
134. Matriano JA, Cormier M, Johnson J, Young WA, Buttery M, Nyam K, Daddona PE. Macroflux[®] microprojection array patch technology: A new and efficient approach for intracutaneous immunization. *Pharmaceutical Research*. 2002;19(1):63-70.
135. Lin W, Cormier M, Samiee A, Griffin A, Johnson B, Teng C-L, . . . Daddona PE. Transdermal delivery of antisense oligonucleotides with microprojection patch (macroflux[®]) technology. *Pharmaceutical Research*. 2001;18(12):1789-1793.
136. Daddona PE, Matriano JA, Mandema J, Maa Y-F. Parathyroid hormone (1-34)-coated microneedle patch system: Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics for treatment of osteoporosis. *Pharmaceutical Research*. 2011;28(1):159-165.
137. Haq M, Smith E, John D, Kalavala M, Edwards C, Anstey A, . . . Birchall J. Clinical administration of microneedles: Skin puncture, pain and sensation. *Biomedical Microdevices*. 2009;11(1):35-47.
138. Gill HS, Denson DD, Burris BA, Prausnitz MR. Effect of microneedle design on pain in human subjects. *The Clinical journal of pain*. 2008;24(7):585.
139. Donnelly RF, Singh TRR, Tunney MM, Morrow DI, McCarron PA, O'Mahony C, Woolfson AD. Microneedle arrays allow lower microbial penetration than hypodermic needles in vitro. *Pharmaceutical Research*. 2009;26(11):2513-2522.
140. Donnelly RF, Singh TRR, Woolfson AD. Microneedle-based drug delivery systems: Microfabrication, drug delivery, and safety. *Drug Delivery*. 2010;17(4):187-207.
141. Bal SM, Caussin J, Pavel S, Bouwstra JA. *In vivo* assessment of safety of microneedle arrays in human skin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;35(3):193-202.
142. Sivamani RK, Stoeber B, Wu GC, Zhai H, Liepmann D, Maibach H. Clinical microneedle injection of methyl nicotinate: Stratum corneum penetration. *Skin Research and Technology*. 2005;11(2):152-156.
143. Wermeling DP, Banks SL, Hudson DA, Gill HS, Gupta J, Prausnitz MR, Stinchcomb AL. Microneedles permit transdermal delivery of a skin-impermeant medication to humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(6):2058-2063.
144. Mitranic I, Stevanovic M, Nedeljkovic B, Ignjatovic N, Uskokovic D. Controllable synthesis of horseradish peroxidase loaded poly (d, l-lactide) nanospheres. *J Bionanosci*. 2009;3:1-11.

145. Commission BP, Council GM, Commission GBM. British pharmacopoeia: Her Majesty's Stationery Office; 2001.
146. Ich guideline q2 (r1): Validation of analytical procedures: Text and methodology IFPMA: Geneva. 2005.
147. Malvern. Mastersizer 2000 product brochure. 2012 [cited 2012 June]; Available from: <http://www.malvern.com/common/downloads/MRK501.pdf>.
148. Trimaille T, Pichot C, Elaissari A, Fessi H, Briancon S, Delair T. Poly(d,l-lactic acid) nanoparticle preparation and colloidal characterization. *Colloid Polym Sci*. 2003;281(12):1184-1190.
149. Popović S. Razvoj i primjena rentgenskih difrakcijskih metoda. *Kristalografija u hrvatskoj*. Zagreb: HAZU-razred za matematičke, fizičke i kemijske znanosti i Hrvatska kristalografska zajednica; 2013. p. 203-214.
150. Vukomanović M. Kontrolisano oslobađanje antibiotika iz nanosfera poli(d,l-laktid-koglikolid)/hidroksiapatita sintetisanih u ultrazvučnom polju. 2011.
151. Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 2010;67(3):217-223.
152. Wilke N, Mulcahy A, Ye S-R, Morrissey A. Process optimization and characterization of silicon microneedles fabricated by wet etch technology. *Microelectronics journal*. 2005;36(7):650-656.
153. Bachmann J, Ellies A, Hartge K. Development and application of a new sessile drop contact angle method to assess soil water repellency. *Journal of Hydrology*. 2000;231:66-75.
154. Aulton ME, Twitchell AM. *Solution properties and atomization in film coating*. Pharmaceutical Coating Technology London, UK: Taylor & Francis. 1995:65-117.
155. Roy R. *A primer on the taguchi method*: SME; 2010.
156. Guideline IHT, editor. Evaluation for stability data q1e. *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*; 2003.
157. Vuleta G, Kovačević A, Savić S, Milić J. Dissolution test for pharmaceutical semisolid dosage forms. *Arhiv za farmaciju*. 2007;57(6):375-398.
158. Gallagher S, Heard C. Solvent content and macroviscosity effects on the in vitro transcutaneous delivery and skin distribution of ketoprofen from simple gel formulations. *Skin Pharmacol Physiol*. 2005;18(4):186-194.
159. Dvořák J, Hajkova R, Matysova L, Novakova L, Koupparis M, Solich P. Simultaneous hplc determination of ketoprofen and its degradation products in the presence of preservatives in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2004;36(3):625-629.
160. SANTOS Kcd, SILVA MFGd, FERNANDES JB, VIEIRA PC, POLIKARPOV I, ZUCOLOTTI V, FORIM MR. Development and validation of a fast rp-hplc method to determine the analogue of the thyroid hormone, 3, 5, 3'-triiodothyroacetic acid (triac), in polymeric nanoparticles. *Analytical Methods*. 2011;3(9):1936-1942.
161. Jelvehgari M, Barar J, Valizadeh H, HEYDARI N. Preparation and evaluation of poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles-in-microparticles by w/o/w emulsion method. *Iran J Basic Med Sci*. 2010.
162. Shah P, Desai P, Singh M. Effect of oleic acid modified polymeric bilayered nanoparticles on percutaneous delivery of spantide ii and ketoprofen. *J Control Release*. 2011.
163. Ricci M, Blasi P, Giovagnoli S, Rossi C, Macchiarulo G, Luca G, . . . Calafiore R. Ketoprofen controlled release from composite microcapsules for cell encapsulation: Effect on post-transplant acute inflammation. *J Control Release*. 2005;107(3):395-407.
164. Del Gaudio P, Russo P, Rosaria Lauro M, Colombo P, Aquino RP. Encapsulation of ketoprofen and ketoprofen lysinate by prilling for controlled drug release. *AAPS PharmSciTech*. 2009;10(4):1178-1185.

165. Đorđević SM, Cekić ND, Isailović TM, Milić JR, Vuleta GM, Lazić ML, Savić SD. Nanoemulsions produced with varied type of emulsifier and oil content: An influence of formulation and process parameters on the characteristics and physical stability. *Hemijska industrija*. 2013(00):5-5.
166. Anton N, Gayet P, Benoit J-P, Saulnier P. Nano-emulsions and nanocapsules by the pit method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007;344(1):44-52.
167. ISO13321 IS. Methods for determination of particle size distribution part 8: Photon correlation spectroscopy. International Organisation for Standardisation (ISO) 1996.
168. Muthu M, Singh S. Poly (d, l-lactide) nanosuspensions of risperidone for parenteral delivery: Formulation and in-vitro evaluation. *Current Drug Delivery*. 2009;6(1):62-68.
169. Sheihet L, Chandra P, Batheja P, Devore D, Kohn J, Michniak B. Tyrosine-derived nanospheres for enhanced topical skin penetration. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;350(1):312-319.
170. Rancan F, Papakostas D, Hadam S, Hackbarth S, Delair T, Primard C, . . . Vogt A. Investigation of polylactic acid (pla) nanoparticles as drug delivery systems for local dermatotherapy. *Pharmaceutical Research*. 2009;26(8):2027-2036.
171. QuintanarGuerrero D, Fessi H, Allemann E, Doelker E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(d,l-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics*. 1996;143(2):133-141.
172. Freitas MN, Marchetti JM. Nimesulide pla microspheres as a potential sustained release system for the treatment of inflammatory diseases. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005;295(1-2):201-211.
173. Feng SS, Huang GF. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (taxol (r)) from nanospheres of biodegradable polymers. *J Control Release*. 2001;71(1):53-69.
174. Teixeira Z, Zanchetta B, Melo BAG, Oliveira LL, Santana MHA, Paredes-Gamero EJ, . . . Durán N. Retinyl palmitate flexible polymeric nanocapsules: Characterization and permeation studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010;81(1):374-380.
175. Bodhak S, Bose S, Bandyopadhyay A. Electrically polarized hap-coated ti< i> in vitro</i> bone cell–material interactions. *Acta Biomaterialia*. 2010;6(2):641-651.
176. Mishra PR, Shaal LA, Müller RH, Keck CM. Production and characterization of hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009;371(1):182-189.
177. Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in plga nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1999;25(4):471-476.
178. Blasi P, Schoubben A, Giovagnoli S, Perioli L, Ricci M, Rossi C. Ketoprofen poly (lactide-co-glycolide) physical interaction. *AAPS PharmSciTech*. 2007;8(2):E78-E85.
179. Zhang J, Sato H, Tsuji H, Noda I, Ozaki Y. Differences in the ch< sub> 3</sub>… oc interactions among poly (l-lactide), poly (l-lactide)/poly (d-lactide) stereocomplex, and poly (3-hydroxybutyrate) studied by infrared spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*. 2005;735:249-257.
180. Nikolic L, Ristic I, Adnadjevic B, Nikolic V, Jovanovic J, Stankovic M. Novel microwave-assisted synthesis of poly (d, l-lactide): The influence of monomer/initiator molar ratio on the product properties. *Sensors*. 2010;10(5):5063-5073.
181. Milicevic D, Trifunovic S, Dojcilovic J, Ignjatovic N, Suljovrucic E. The influence of gamma radiation on the molecular weight and glass transition of plla and hap/plla nanocomposite. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*. 2010;268(17-18):2744-2749.

182. Fox TG, Flory PJ. Viscosity-molecular weight and viscosity-temperature relationships for polystyrene and polyisobutylene Journal of the American Chemical Society. 1948;70(7):2384-2395.
183. Qian RY, Wu LH, Shen DY, Napper DH, Mann RA, Sangster DF. Single-chain polystyrene glasses. *Macromolecules*. 1993;26(11):2950-2953.
184. Liao KR, Quan DP, Lu ZJ. Effects of physical aging on glass transition behavior of poly(DL-lactide). *Eur Polym J*. 2002;38(1):157-162.
185. Zhou Q, Xanthos M. Nanosize and microsize clay effects on the kinetics of the thermal degradation of polylactides. *Polym Degrad Stab*. 2009;94(3):327-338.
186. Mello VA, Ricci-Júnior E. Encapsulation of naproxen in nanostructured system: Structural characterization and *in vitro* release studies. *Quim Nova*.34(6):933-939.
187. Corrigan OI, Li X. Quantifying drug release from plga nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;37(3-4):477-485.
188. Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas NA. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers *International Journal of Pharmaceutics*. 1983;15(1):25-35.
189. Kosmidis K, Rinaki E, Argyrakis P, Macheras P. Analysis of case ii drug transport with radial and axial release from cylinders. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003;254(2):183-188.
190. Kolli CS, Banga AK. Characterization of solid maltose microneedles and their use for transdermal delivery. *Pharmaceutical Research*. 2008;25(1):104-113.
191. Donnelly RF, Morrow DI, Singh TR, Migalska K, McCarron PA, O'Mahony C, Woolfson AD. Processing difficulties and instability of carbohydrate microneedle arrays. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2009;35(10):1242-1254.
192. Park J-H, Allen MG, Prausnitz MR. Polymer microneedles for controlled-release drug delivery. *Pharmaceutical Research*. 2006;23(5):1008-1019.
193. Vrdoljak A, McGrath MG, Carey JB, Draper SJ, Hill AVS, O'Mahony C, . . . Moore AC. Coated microneedle arrays for transcutaneous delivery of live virus vaccines. *J Control Release*. 2012;159(1):34-42.
194. McGrath MG, Vucen S, Vrdoljak A, Kelly A, O'Mahony C, Crean AM, Moore AC. Production of dissolvable microneedles using an atomized spray process: Effect of microneedle composition on skin penetration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013.
195. Page S, Baumann K-H, Kleinebudde P. Mathematical modeling of an aqueous film coating process in a bohle lab-coater, part 1: Development of the model. *AAPS PharmSciTech*. 2006;7(2):E79-E86.
196. Nandal P, Ravella SR, Kuhad RC. Laccase production by *coriopsis caperata* rck2011: Optimization under solid state fermentation by taguchi doe methodology. *Scientific reports*. 2013;3.
197. Yang W, Tarng Y. Design optimization of cutting parameters for turning operations based on the taguchi method. *Journal of Materials Processing Technology*. 1998;84(1):122-129.
198. Ibrić S. Razvoj matematičke teorije eksperimenata u farmaceutskoj tehnologiji. Beograd: Konstisi; 2006.
199. Hamzah A, Aziz NA, Majlis BY, Yunas J, Dee C, Bais B. Optimization of hna etching parameters to produce high aspect ratio solid silicon microneedles. *Journal of Micromechanics and Microengineering*. 2012;22(9):095017.
200. Yoshioka S, Stella VJ. *Stability of drugs and dosage forms*: Springer; 2000.
201. Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006;58(15):1688-1713.
202. Committee CoEPPH, Commission EP. *European pharmacopoeia 7.02011*.

203. Swami G, Pooja D, Kulhari H, Kymonil K, Saraf S. Surface modification of poly (l-lactic acid) microspheres for site-specific delivery of ketoprofen for chronic inflammatory disease. *Journal of Drug Targeting*. 2013;21(3):232-239.
204. Tadros T, Kessell L. Stabilizing nanodispersions in personal care and cosmetic applications. *Cosmetics and toiletries*. 2004;119(8):41-46.
205. Patravale V, Kulkarni R. Nanosuspensions: A promising drug delivery strategy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2004;56(7):827-840.
206. Attwood D. Disperse systems. *Pharmaceutics: the science of dosage form design 2nd ed* Edinburgh: Churchill Livingstone. 2002:85-89.
207. Hunter RJ, White LR, Chan DY. *Foundations of colloid science*: Clarendon Press Oxford; 1987.
208. Riddick TM. Control of colloid stability through zeta potential. *Blood*. 1968;10:1.
209. Kovacevic A, Savic S, Vuleta G, Müller R, Keck C. Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (sln and nlc): Effects on size, physical stability and particle matrix structure. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;406(1):163-172.
210. Mehrotra A PJ. Critical process parameters evaluation of modified nanoprecipitation method on lomustine nanoparticles and cytostatic activity study on l132 human cancer cell line. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*. 2012.
211. Hirsjarvi S, Peltonen L, Kainu L, Hirvonen J. Freeze-drying of low molecular weight poly (l-lactic acid) nanoparticles: Effect of cryo-and lyoprotectants. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2006;6(9-10):9-10.
212. Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A, Allemann E, Fessi H, Doelker E. Influence of the stabilizer coating layer on the purification and freeze-drying of poly (d, l-lactic acid) nanoparticles prepared by an emulsion-diffusion technique. *Journal of Microencapsulation*. 1998;15(1):107-119.
213. Lemarchand C, Couvreur P, Besnard M, Costantini D, Gref R. Novel polyester-polysaccharide nanoparticles. *Pharmaceutical Research*. 2003;20(8):1284-1292.
214. Konan YN, Gurny R, Allémann E. Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002;233(1):239-252.
215. Saez A, Guzman M, Molpeceres J, Aberturas M. Freeze-drying of polycaprolactone and poly (d, l-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2000;50(3):379-387.
216. Miller DP, de Pablo JJ, Corti H. Thermophysical properties of trehalose and its concentrated aqueous solutions. *Pharmaceutical Research*. 1997;14(5):578-590.
217. Flynn GL, Stewart B. Percutaneous drug penetration: Choosing candidates for transdermal development. *Drug Development Research*. 1988;13(2-3):169-185.
218. Qiu Y, Gao Y, Hu K, Li F. Enhancement of skin permeation of docetaxel: A novel approach combining microneedle and elastic liposomes. *J Control Release*. 2008;129(2):144-150.
219. Gomaa YA, El-Khordagui LK, Garland MJ, Donnelly RF, McInnes F, Meidan VM. Effect of microneedle treatment on the skin permeation of a nanoencapsulated dye. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012;64(11):1592-1602.
220. Zhang W, Gao J, Zhu Q, Zhang M, Ding X, Wang X, . . . Gao S. Penetration and distribution of plga nanoparticles in the human skin treated with microneedles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010;402(1-2):205-212.
221. Stahl J, Wohler M, Kietzmann M. Microneedle pretreatment enhances the percutaneous permeation of hydrophilic compounds with high melting points. *BMC Pharmacology and Toxicology*. 2012;13(1):5.

222. So J-W, Park H-H, Lee SS, Kim D-C, Shin S-C, Cho C-W. Effect of microneedle on the pharmacokinetics of ketoprofen from its transdermal formulations. *Drug Delivery*. 2009;16(1):52-56.
223. Patlolla RR, Desai PR, Belay K, Singh MS. Translocation of cell penetrating peptide engrafted nanoparticles across skin layers. *Biomaterials*. 2010;31(21):5598-5607.
224. Sullivan SP, Koutsoukos DG, del Pilar Martin M, Lee JW, Zarnitsyn V, Choi S-O, . . . Prausnitz MR. Dissolving polymer microneedle patches for influenza vaccination. *Nature Medicine*. 2010;16(8):915-920.
225. Enfield J, O'Connell M-L, Lawlor K, Jonathan E, O'Mahony C, Leahy M. In-vivo dynamic characterization of microneedle skin penetration using optical coherence tomography. *Journal of biomedical optics*. 2010;15(4):046001-046001-046007.
226. Duan D, Moeckly C, Gysbers J, Novak C, Prochnow G, Siebenaler K, . . . Hansen K. Enhanced delivery of topically-applied formulations following skin pre-treatment with a hand-applied, plastic microneedle array. *Current Drug Delivery*. 2011;8(5):557-565.
227. Garland MJ, Caffarel-Salvador E, Migalska K, Woolfson AD, Donnelly RF. Dissolving polymeric microneedle arrays for electrically assisted transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2012;159(1):52-59.
228. Garland MJ, Migalska K, Tuan-Mahmood T-M, Raghu Raj Singh T, Majithija R, Caffarel-Salvador E, . . . Donnelly RF. Influence of skin model on *in vitro* performance of drug-loaded soluble microneedle arrays. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012;434(1):80-89.
229. Donnelly RF, Morrow DI, Fay F, Scott CJ, Abdelghany S, Singh RRT, . . . David Woolfson A. Microneedle-mediated intradermal nanoparticle delivery: Potential for enhanced local administration of hydrophobic pre-formed photosensitisers. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2010;7(4):222-231.
230. Lee SH, Lee HH, Choi SS. Nanoparticle popsicle: Transdermal delivery of nanoparticles using polymeric microneedle array. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2011;28(9):1913-1917.
231. Chen M-C, Huang S-F, Lai K-Y, Ling M-H. Fully embeddable chitosan microneedles as a sustained release depot for intradermal vaccination. *Biomaterials*. 2013.
232. DeMuth PC, Su X, Samuel RE, Hammond PT, Irvine DJ. Nano-layered microneedles for transcutaneous delivery of polymer nanoparticles and plasmid DNA. *Advanced Materials*. 2010;22(43):4851-4856.
233. Ito Y, Yoshimura M, Tanaka T, Takada K. Effect of lipophilicity on the bioavailability of drugs after percutaneous administration by dissolving microneedles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;101(3):1145-1156.

7. PRILOZI

7.1. Publikovani i saopšteni radovi koji čine dio doktorske disertacije

Radovi u međunarodnim časopisima (M22 i M23)

- [1] McGrath MG, Vučen S, Vrdoljak A, Kelly A, O'Mahony C, Crean AM, Moore AC. Production of dissolvable microneedles using an atomised spray process: Effect of microneedle composition on skin penetration. *European Journal of Pharmaceutical Science*. 2013; May 29. [Epub ahead of print] doi: 10.1016/j.ejpb.2013.04.023. (IF 2012: 2,987).
- [2] Vučen S, Vuleta G, Crean A, Moore A, Ignjatović N, Uskoković D. Improved percutaneous delivery of ketoprofen using combined application of nanocarriers and silicon microneedles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013; 65 (10): 1451-1462. doi: 10.1111/jphp.12118. (IF 2012: 2,033).

Radovi u naučnim časopisima (M53)

- [1] Torbica S, Vuleta G, Ignjatović N, Uskoković D. Polimerne nanočestice - nosači za transdermalnu primjenu ljekovitih supstanci. *Tehnika - Novi materijali*. 2009; 18(4): 1-14.
- [2] Torbica S, Vuleta G. Savremeni nosači za transdermalnu primjenu ljekovitih supstanci. *Arhiv za farmaciju*. 2009; 59(6): 524-535.

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)

- [1] Vučen S, Vuleta G, Ignjatović N, Uskoković D. Ketoprofen Loaded Poly(D,L-lactic acid) Nanospheres for Potential Transdermal/Dermal Application: Preparation and Physical Characterization. Abstracts of the 8th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology (CESPT), Satellite Symposium: 4th International Graz Congress on Pharmaceutical Engineering, 16–18. September 2010. Graz, Austria, *Scientia Pharmaceutica*, 78 (2010) 680.
- [2] Vučen S, Vuleta G, Ignjatović N, Uskoković D. Comparative study of biodegradable polymers on the particle size, surface morphology and encapsulation efficiency of

ketoprofen loaded nanoparticles. 3rd Summer School of Nanomedicine (u organizaciji European Science Foundation), 19-24. June 2011. Wittenberg, Germany.

- [3] Vučen S, Vuleta G, Crean A, Moore A, Ignjatović N, Uskoković D. *In vitro* transdermal delivery and distribution of ketoprofen loaded polymeric nanoparticles in intact and microneedle-treated skin. 2nd International Conference on Microneedles, 13-15. May 2012. Cork, Ireland.

Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)

- [1] Vučen S, Vuleta G, Ignjatović N, Uskoković D. Izrada i karakterizacija PDLA nanočestica kao nosača za transdermalnu isporuku ketoprofena. Program i knjiga apstrakata / Osmo konferencija mladih istraživača Nauka i inženjerstvo novih materijala, Beograd, 21–23. decembar 2009, [organizatori] Društvo za istraživanje materijala [i] Institut tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti; [urednik Nenad Ignjatović], Beograd: Institut tehničkih nauka SANU, 2009, str. 1. ISBN 978-86-80321-22-6 (usmeno izlaganje)
- [2] Vučen S, Vuleta G, Ignjatović N, Uskoković D. Uticaj vrste biodegradabilnog polimera na submikronske čestice sa ketoprofenom - ispitivanje fizičkih karakteristika i efikasnosti inkapsulacije lijeka. V Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija, 13.–17. Oktobar 2010. Arhiv za farmaciju 2010, 60/5:728-729 (usmeno izlaganje).

7.2. Biografija autora

Sonja Vučen rođena je 3.12.1979. godine u Sarajevu. Opštu gimnaziju je završila u Banjoj Luci, gde je i diplomirala 2005. godine na odsjeku farmacije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci. U periodu od 2000-2003. godine bila je stipendista Ministarstva prosvete i kulture Republike Srpske. Doktorske akademske studije iz farmaceutske tehnologije na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu upisala je školske 2006/2007 godine.

Od maja do novembra 2007. godine radila je kao saradnik u nastavi, nakon čega je izabrana u zvanje asistenta na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Medicinskog fakulteta u Banjoj Luci. U januaru 2012. godine birana je u zvanje višeg asistenta na istoj Katedri.

Od oktobra 2011. godine boravi u Irskoj, na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Korku, gdje je angažovana kao istraživač na projektu *Immupatch*, Od 2011. godine učestvuje i na projektu tehnološkog razvoja pod nazivom "Razvoj molekula sa antiinflamatornim i kardioprotektivnim dejstvom: strukturne modifikacije, modelovanje, fizičko-hemijska karakterizacija i formulaciona ispitivanja" (OI-172041) Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

7.3. Izjava o autorstvu

Potpisana: Sonja Vučen

Broj indeksa: 31/06

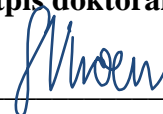
Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Formulacija i karakterizacija rastvorljivih mikroigala za kontrolisanu transdermalnu isporuku ketoprofena inkapsularinog u polimerne nanočestice

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u cjelini ni u dijelovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda



U Beogradu, 18. novembar, 2013.

7.4. Izjava o istovjetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Ime i prezime autora: Sonja Vučen

Broj indeksa: 31/06

Studijski program: Doktorske akademske studije iz Farmaceutске tehnologije

Naslov rada: Formulacija i karakterizacija rastvorljivih mikroigala za kontrolisanu transdermalnu isporuku ketoprofena inkapsularinog u polimerne nanočestice

Mentor: prof. dr Gordana Vuleta

Potpisana: Sonja Vučen

Izjavljujem da je štampana verzija mog dokorskog rada istovjetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

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

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

Potpis doktoranda



U Beogradu, 18. novembar, 2013.

7.5. Izjava o korišćenju

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

Formulacija i karakterizacija rastvorljivih mikroigala za kontrolisanu transdermalnu isporuku ketoprofena inkapsularinog u polimerne nanočestice

koja je moje autorsko djelo.

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

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda



U Beogradu, 18. novembar, 2013.