

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

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKE STUDIJE

Nastavno-naučno veće Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, na sednici održanoj 30.01.2020. godine, donelo je **Odluku (01 broj 161/2)** kojom je imenovana **Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije** pod naslovom: „**Hemijski i fizički pojačivači dermalne isporuke slabo rastvorljivih lekovitih supstanci: uporedna ispitivanja mikroemulzija, čvrstih i rastvorljivih mikroigala**“, kandidata **dipl. farm. Nataše Bubić Pajić**, višeg asistenta na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Medicinskog fakulteta – studijski program Farmacija, Univerziteta u Banjoj Luci.

Komisija u sastavu:

- 1. Dr sc. Snežana Savić, redovni profesor, mentor,**
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
- 2. Dr sc. Sonja Vučen, docent, mentor,**
Univerzitet u Korku, Farmaceutski fakultet
- 3. Dr sc. Ivana Pantelić, docent,**
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
- 4. Dr sc. Ranko Škrbić, redovni profesor,**
Univerzitet u Banjoj Luci, Medicinski fakultet

pročitala je priloženu doktorsku disertaciju, pregledala kompletnu dokumentaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta sledeći

I Z V E Š T A J

1 PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija dipl. farm. Nataše Bubić Pajić pod nazivom „**Hemijski i fizički pojačivači dermalne isporuke slabo rastvorljivih lekovitih supstanci: uporedna ispitivanja mikroemulzija, čvrstih i rastvorljivih mikroigala**“ napisana je na 164 strane standardnog formata (prored 1; font *Times New Roman* - 12). Doktorska disertacija sadrži **Sažetak** na srpskom i **Abstract** na engleskom jeziku, a sastoji se iz sledećih poglavlja: **1. Uvod (str. 1-38)**, **2. Ciljevi rada (str. 39-42)**, **3. Eksperimentalni deo (str. 43-62)**, **4. Rezultati i diskusija (str. 63-136)**, **5. Zaključci (str.137-144)**, **6. Literatura (str. 145-164)**. Na kraju je dat spisak publikovanih i saopštenih radova koji čine deo doktorske disertacije, kratka biografija kandidata, i potpisane izjave kandidata o autorstvu, istovetnosti štampane i elektronske verzije i korišćenju.

Disertacija je napisana jasnim stilom, pregledna je i sadrži 56 slika (12 u Uvodu, 5 u Eksperimentalnom delu i 39 u Rezultatima i diskusiji), 22 tabele (7 u Uvodu, 4 u Eksperimentalnom delu i 11 u Rezultatima i diskusiji) i 248 literaturnih navoda.

U **Uvodu** je, kroz 4 potpoglavlja dat pregled naučnih saznanja značajnih za predmet proučavanja doktorske disertacije: *Teorijski aspekti dermalne isporuke lekova; Mikroemulzije*

kao nosači za isporuku lekova u/kroz kožu; Mikroigle kao fizički pojačivači penetracije leka u/kroz kožu; Model lekovite supstance – kandidati za dermalnu isporuku.

U prvom potpoglavlju **Uvoda** su prikazane najznačajnije informacije o građi kože i putevima kojima se odvija transport lekovitih supstanci u/kroz kožu, pri čemu je poseban osvrt stavljen na građu folikula dlake i potencijal transfolikularnog puta isporuke lekovitih suspastanci. U nastavku su ukratko opisani najznačajniji biološki faktori, te fizičko-hemijske osobine lekovitih supstanci i nosača u koje su lekovi inkorporirani, koji mogu na različite načine da utiču na penetraciju i penetraciju lekovitih supstanci primenjenih lokalno na kožu. Kandidatkinja je na kraju ovog potpoglavlja dala pregled metoda kojima se može povećati isporuka lekovitih supstanci u/kroz kožu, a odabrani pristupi koji su predmet proučavanja doktorske disertacije su detaljnije prikazani u naredna dva dela Uvoda.

Drugi dio **Uvoda** je posvećen mikroemulzijama kao naprednim nosačima za isporuku lekovitih supstanci u/kroz kožu, odnosno kao opcijom hemijskog inženjera penetracije lekova. U ovom delu je data definicija mikroemulzija, istaknute su njihove jedinstvene karakteristike, naročito naspram druge vrste submikronskih emulzija (nanoemulzija), konvencionalnih emulzija i micelarnih rastvora. Takođe je razmotren kvalitativni sastav mikroemulzija, sa posebnim osvrtom na izbor surfaktanata u njihovoj formulaciji. Budući da je uloga surfaktanta kritična, ne samo za obrazovanje mikroemulzionog sistema određene unutrašnje strukture, nego i za njegovu bezbednost i potencijal pojačavanja isporuke leka u/kroz kožu, ukazano na prednost korišćenja novijih surfaktanata povoljnijeg bezbednosnog profila. U tom smislu, u fokus su stavljeni alkil poliglukozidi i gliceret-7-kaprilat/kaprat kao retko korišćeni noviji surfaktanti kojima je posvećen značajan deo ovog potpoglavlja. Detaljnim pregledom literaturnih navoda ukazano je na prednosti njihove primene u mikroemulzijama kao nosačima za poboljšanu (trans)dermalnu isporuku lekovitih supstanci. Takođe, kandidat je u okviru ovog dela prepoznao izazove u formulaciji i karakterizaciji mikroemulzija zasnovanih na pomenutim surfaktantima, čemu je posvećen veći deo ove doktorske disertacije. Imajući u vidu da, iako je generalno prihvaćeno da mikroemulzije povećavaju transport solubilizovanih lekovitih supstanci, tačan mehanizam kojim se ovaj cilj postiže još uvek nije potpuno razjašnjen, kandidatkinja je dala pregled najznačajnijih faktora koji doprinose poboljšanju penetracije lekovitih supstanci primenjenih putem mikroemulzija.

U trećem potpoglavlju **Uvoda** su izloženi najznačajniji podaci o različitim vrstama mikroigala, kao relativno novom pristupu fizičkog premošćivanja barijere *stratum corneum*. Dat je i pregled njihovih prednosti i nedostataka, kao i savremenih metoda za njihovu izradu, sa posebnim osvrtom na izradu rastvorljivih mikroigala, koje su zbog svojih prednosti u odnosu na druge vrste mikroigala, pre svega zbog svoje biodegradabilnosti, odabrane kao predmet proučavanja ove doktorske disertacije. Kandidatkinja je dodatno razmotrila faktore od značaja za uspešnu penetraciju mikroigala u kožu, odnosno za poboljšanje isporuke vakcina i lekovitih supstanci u/kroz kožu koje je demonstrirano na brojnim primerima, a neki od njih su u poslednjih nekoliko godina dospeli i na tržište.

U četvrtom potpoglavlju uvodnog dela doktorske disertacije je dat detaljan prikaz fizičko-hemijskih osobina, delovanje i upotreba sertakonazol-nitrata i adapalena kao model lekovitih supstanci za dermalnu isporuku, koje se odlikuju različitim fizičko-hemijskom prirodom, terapijskim koncentracijama, te pripadaju različitim farmakoterapijskim grupama. Međutim, ciljnom isporuke ove dve model lekovite supstance u specifične odeljke kože se može obezbediti efikasna terapija gljivičnih infekcija kože, odnosno akni, uz umanjenje sistemskih neželjenih efekata. Budući da obe model lekovite supstance imaju slabu rastvorljivost u vodi, koja je istovremeno i uzrok njihove niske dermalne raspoloživosti, razvoj formulacija kojima se može prevazići ovaj problem i poboljšati njihova dermalna isporuka je u fokusu proučavanja brojnih istraživačkih grupa. Najznačajnije strategije koje se

aktuelne tokom poslednjih nekoliko godina je i kandidatkinja i istaknula i prepoznala potrebu za daljim razvojem nosača za sertakonazol-nitrat i adapalen kao istraživački izazov.

Osnovni *cilj istraživanja* je definisan na jasan način - procena mogućnosti unapređenja/poboljšanja dermalne isporuke slabo rastvorljivih model lekovitih supstanci kroz razvoj emulzionih nosača sa nanostrukturnom, odnosno mikroemulzija na bazi nejonskih surfaktanata (kao hemijskih inhensera penetracije), posebno onih novije generacije tipa alkil poligukozida i polioksietilen(glicerol) estara masnih kiselina, te njihova sveobuhvatna fizičkohemijska karakterizacija. Dodatno, cilj disertacije je i primena inoviranih *in vitro/in vitro* tehnika biofarmaceutске karakterizacije na mikroemulzione sisteme, odnosno procena dermalne raspoloživosti dva model leka različitih fizičkohemijskih karakteristika, iz različitih farmakoterapijskih grupa, tj. primenjenih u različitim terapijskim koncentracijama (sertakonazol-nitrat i adapalen), iz prethodno formuliranih biokompatibilnih mikroemulzija. U cilju komparativnih istraživanja doprinosu različitih tipova nosača dermalnoj raspoloživosti model leka, posebna pažnja je posvećena proceni sposobnosti mikroigala, kao fizičkih inhensera penetracije, da značajno poboljšaju isporuku sertakonazol-nitrata u/kroz kožu (rastvorljive vs. čvrste silikonske mikroigle), preciznije upoređen je efekat fizičkih inhensera penetracije (mikroigle) naspram upotrebe koloidnog nosača sa nanostrukturnom, kao opcije hemijskog poboljšivača penetracije (mikroemulzije). Kandidat je postavljene ciljeve realizovao kroz četiri faze istraživačkog rada, čiji opis je dat u eksperimentalnom delu rada.

U poglavlju *Eksperimentalni deo* navedene su karakteristike korišćenih polaznih materijala i prikazan je detaljan opis eksperimentalnih procedura, uređaja i opreme koji su korišćeni kako bi se realizovali postavljeni ciljevi istraživanja. Eksperimentalni rad odvijao se kroz četiri faze.

U prvoj *fazi eksperimentalnog rada* je najpre ispitivan potencijal različitih surfaktanata da obrazuju mikroemulzione sisteme konstruisanjem pseudoternarnih faznih dijagrama (ulje/surfaktant-kosurfaktant/visokoprečišćena voda), a na osnovu rezultata dobijenih primenom konvencionalne metode titracije vodom. Identifikacija mikroemulzione oblasti je vršena vizuelno (praćenjem pojave zamućenja) nakon sukcesivnog dodavanja visokoprečišćene vode u malim zapreminama od po 10 μL u pseudobinarni sistem ulje/surfaktant-kosurfaktant. Prilikom ispitivanja efikasnosti decil-glukozida i kaprilil/kaprilglukozida kao kosurfaktant je primenjen propilenglikol, a kao uljana faza propilenglikol-monokaprilat. Dodatno, na primeru decil-glukozida su razmotrene različite vrste ulja (estri masnih kiselina sa alkanolima različite dužine lanca). U slučaju ispitivanja efikasnosti gliceret-7-kaprilat/kaprat, kao uljana faza je bio variran tip kosurfaktanta (dietilenglikol monoetiletar, etanol, izopropanol, propilenglikol), a propilenglikol-monokaprilat je bio odabran kao uljana faza u svim sistemima. Kako bi se objektivno procenila sposobnost etoksilovanog surfaktanta u formulaciji mikroemulzija, paralelno je ispitano je fazno ponašanje odabranog sistema u kojem je gliceret-7-kaprilat/kaprat zamenjen polisorbitom 80. Potom je, u cilju pronalaženja optimalnog sastava mikroemulzija, određen solubilizacioni kapacitet dodatkom terapijske koncentracije sertakonazol-nitrata (2% *m/m*) i adapalena (0,1% *m/m*) u formulacije sa rastućim sadržajem visokoprečišćene vode. Formulacija sa maksimalnim sadržajem visokoprečišćene vode, tj. sa minimalnim sadržajem surfaktanta i kosurfaktanta, kod koje nije došlo do pojave taloga, niti zamućenja nakon dodatka model lekovite supstance u datoj koncentraciji, odabrana je kao optimalna formulacija za dermalnu primenu model lekovitih supstanci. Dodatno, kombinovanom primenom indirektnih fizičkohemijskih tehnika (konduktometrijska, reološka merenja, termogrami hlađenja dobijeni diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom, elektronska paramagnetna rezonantna spektroskopija, saturaciona rastvorljivost model lekova u mikroemulzijama), i direktnih

mikroskopskih tehnika (polarizaciona i mikroskopija atomskih sila) izvršena je karakterizacija strukture mikroemulzija duž odabrane linije razblaženja.

U drugoj fazi eksperimentalnog rada opisane su metode koje su upotrebljene za sveobuhvatnu fizičko-hemijsku i biofarmaceutsku karakterizaciju placebo uzoraka i uzoraka sa lekovima u cilju procene njihove pogodnosti za dermalnu primenu. Osim toga, kako bi se procenio i uticaj sastava formulacije (tip surfaktanta/ulja na performanse uzoraka sa alkil poliglukozidima, odnosno tipa etoksiliranog surfaktanta i vrste kosurfaktanta na ispitivane karakteristike sistema sa etoksilovanim surfaktantom), dat je detaljan pregled metoda kojima su mikroemulzije okarakterisane u pogledu pH vrednosti, viskoziteta (reološka merenja), električne provodljivosti, morfologije (polarizaciona mikroskopija), kao i interakcija lek-nosač i lokalizacije leka u sistemima (solubilizacioni kapacitet sastojaka za lek, elektronska paramagnetna rezonantna spektroskopija, merenje dinamičkog međupovršinskog napona između odabrane uljane i vodene faze, infracrvena spektroskopija sa Furijevom transformacijom). Na kraju je opisana metodologija koja je korišćena za preliminarnu bezbednosnu procenu odabranih formulacija bez lekovite supstance *in vivo* na humanim dobrovoljcima, što je podrazumevalo primenu neinvazivnih tehnika bioinženjeringa kože, zasnovanih na merenju transepidermalnog gubitka vode (TEGV), stepena hidratisanosti *stratum corneum*-a (SCH) i eritema indeksa (EI).

U trećoj fazi eksperimentalnog rada prikazan je opis metoda koje su se koristile za procenu predviđanja *in vivo* ponašanja i ispitivanja mehanizma kinetike oslobađanja model lekova inkorporiranih u mikroemulzije nosače – *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance kroz veštačku membranu primenom Franz-ovih difuzionih ćelija iz mikroemulzija. Imajući na umu da ne postoji farmakopejska metoda za *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja leka iz mikroemulzija, opisana je i metoda za ispitivanje formulacija sa sertakonazol-nitratom na imerzionim ćelijama kako bi se identifikovala adekvatna metoda za ovu vrstu sistema koja može da detektuje potencijalne razlike u *in vitro* brzini oslobađanja leka iz razvijenih formulacija. Nakon toga je usledio detaljan opis procedura, opreme i uređaja pomoću kojih je vršena procena (trans)dermalne raspoloživosti lekova iz uzoraka iz kojih je oslobođen najveći procenat inkorporirane lekovite supstance (*in vitro* ispitivanje permeacije/penetracije primenom Franz-ovih difuzionih ćelija kroz kožu uha svinje pune debljine). Potom je dat opis metode za evaluaciju *in vitro* antifungalne aktivnosti odabranih mikroemulzionih formulacija sa sertakonazol-nitratom na soju *Candida* spp. Nakon toga je usledio opis metoda za procenu dermalne raspoloživosti adapalena (*in vitro* ispitivanje permeacije/penetracije primenom Franz-ovih difuzionih ćelija kroz kožu uha svinje pune debljine, *tape stripping* metoda na koži uha svinje pune debljine pod *infinite dose* uslovima). Nakon toga, kako bi se stekao potpuniji uvid u distribuciju adapalena u pojedinim kompartmentima kože, a imajući na umu značaj njegove lokalizacije u folikulima dlaka prilikom tretmana akni, dat je detaljan opis cijanoakrilatne biopsije kože uha svinje (koja sa *tape strippingom* čini *diferencijalni tape stripping*).

U okviru četvrte faze eksperimentalnog rada koja je posvećena proceni i poređenju različitih pristupa za poboljšanje penetracije leka u/kroz kožu – fizičkih (rastvorljive mikroigle), formulacionih (mikroemulzije) i njihove kombinacije (čvrste silikonske mikroigle udružene sa mikroemulzijama), najpre je dat prikaz metoda pomoću kojih je razmotrena mogućnost prevođenja mikroemulzija sa sertakonazol-nitratom u rastvorljive mikroigle dodatkom različitih biodegradabilnih polimera, odnosno metoda za paralelno fabrikovanje rastvorljivih mikroigala rastvaranjem različitih koncentracija leka u rastvoru biodegradabilnog polimera (polivinilpirolidona), pri čemu je varirana i koncentracija polimera. Prikazani su detaljni metodologije korišćene za karakterizaciju dobijenih rastvorljivih mikroigala u pogledu morfoloških osobina (svetlosna mikroskopija, skenirajuća elektronska mikroskopija) i

mehaničke otpornosti, koje utiču na mogućnost njihove insercije u kožu. Za procenu efikasnost penetracije mikroigala u kožu, tj. sposobnosti mikroigala da naruše integritet kožne barijere obrazovanjem mikropora, predložena je i opisna studija bojenja kože uha svinje metilenskim plavim odmah nakon uklanjanja mikroigala (engl. *dye-binding study*). Osim toga, opisna je metoda za određivanje sadržaja leka u rastvorljivim mikroiglama (HPLC metodom), kao i *in vitro* brzina njihovog rastvaranja. Nadalje, prikazana je metodologija za procenu sposobnosti mikroigala da poboljšaju isporuku sertakonazol-nitrata u/kroz kožu – *in vitro* studija penetracije/permeacije sertakonazol-nitrata nakon aplikacije rastvorljivih mikroigala („*poke and release*“ pristup) i odabrane mikroemulzione formulacije na kožu uha svinje pune debljine, sa ili bez prethodnog tretmana čvrstim silikonskim mikroiglama („*poke and patch*“ pristup), uz korišćenje modifikovanih Franz-ovih ćelija.

Sve metode i eksperimentalne procedure korišćene u eksperimentalnom radu ove doktorske disertacije su prikladne i u saglasnosti sa savremenim zahtevima naučnoistraživačkog rada u relevantnoj oblasti, što je omogućilo dobijanje objektivnih i pouzdanih rezultata na osnovu kojih je bilo moguće donošenje adekvatnih naučnih zaključaka.

Ispitivanja na humanim dobrovoljcima opisana u izrađenoj doktorskoj disertaciji sprovedena su u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a primenjeni protokol je odobren od strane Etičkog komiteta za biomedicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta (Odluka br. 355/2) .

Poglavlje **Rezultati i diskusija**, koje prate četiri prethodno navedene faze eksperimentalnog rada, je prikazano na 72 stranice teksta, uključujući 39 slika i 11 tabela, a podeljeno je na četiri potpoglavlja: *Rezultati i diskusija prve faze istraživanja*; *Rezultati i diskusija druge faze istraživanja*; *Rezultati i diskusija treće faze istraživanja*; i *Rezultati i diskusija četvrte faze istraživanja*. Analiza rezultata i diskusija dobijenih rezultata i postavljenih hipoteza je iznesena na razumljiv način i uz sveobuhvatnu komparaciju sa podacima dobijenim u sličnim relevantnim naučnim istraživanjima.

U pogavlju **Zaključci** je kroz pet potpoglavlja dat pregled izvedenih zaključaka iz analize dobijenih rezultata u svakoj fazi eksperimentalnog rada pojedinačno, kao i opšti zaključak doktorske disertacije koji je prikazan kroz potpoglavlje *Konačan osvrt i budući koraci*.

U pogavlju **Reference** naveden je speak od 248 referenci citiranih u okviru doktorske disertacije.

2 OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Rezultati doktorske disertacije podeljeni su u četiri celine, shodno postavljenim ciljevima i u skladu sa načinom sprovođenja eksperimentalnog dela istraživanja.

U *prvom delu* je pokazano da APG surfaktanti, koji su dostupni na tržištu u obliku vodenih rastvora, mogu da obrazuju mikroemulzione sisteme uz eksperimentalne uslove korišćene u okviru ove doktorske disertacije (estri masnih kiselina srednje dužine lanca kao uljana faza, propilenglikol kao kosurfaktant (maseni odnos S-CoS je bio 1-1). Diskretne razlike u strukturi korišćenih parcijalnih estara masnih kiselina, kao što je dužina alkil lanca kiseline ili tip esterifikovanog alkanola, su se odrazile na veličinu mikroemulzionih oblasti u sistemu ulje/decil-glukozid-propilenglikol/voda. Takođe, veličina mikroemulzione oblasti na pseudoternarnim dijagramima dobijenim korišćenjem različitih APG surfaktanata –decil-glukozid i kaprilil/kapril-glukozid je bila zavisna od njihovih karakteristika. Preciznije, dobijeni rezultati su ukazali na trend da APG surfaktant sa višom vrednošću HLB i kraćim

alkil lancem (kaprilil/kapril-glukozid) obrazuje mikroemulzije u širem opsegu koncentracija korišćenih sastojaka. Rezultati dobijeni u ovoj fazi su pokazali da polietoksilovani surfaktant koji je retko korišćen u formulaciji farmaceutskih preparata – gliceret-7-kaprilat/kaprat može uspešno da se koristi u formulaciji mikroemulzija kao koloidnih nosača lekova za dermalnu isporuku, i to u sprezi sa Transcutol®-om P, etanolom, izopropanolom i propilenglikolom kao kosurfaktantima. Pri tome je pokazano da je mogućnost da kosurfaktant penetrira na međupovršinu između uljane i vodene faze bila obrnuto proporcionalna polarnosti kosurfaktanta. Međutim, efikasnost gliceret-7-kaprilat/kaprata u stabilizaciji mikroemulzija u poređenju sa polisorbitom 80, bila je nešto niža. Upotrebom različitih indirektnih fizičko-hemijskih metoda karakterizacije unutrašnje strukture sistema odabranih duž linije razblaženja S-CoS:uljana faza = 8:2 pokazano je da sistemi zasnovani na APG emulgatorima prevashodno obrazuju mikroemulzije bikontinuiranog ili invertnog bikontinuiranog tipa, bez kompletno razvijene kapljične U/V strukture. Prelaz iz kapljične V/U unutrašnje strukture u mikroemulzije sa bikontinuiranom strukturom je detektovan u sistemima Capryol™ 90/gliceret-7-kaprilat/kaprat/kosurfaktant/voda duž linije razblaženja S-CoS:uljana faza = 8:2, a frakcija vodene faze pri kojoj je do promene došlo (perkolacioni prag) je ponovo bila povezana sa polarnošću kosurfaktanta. Na osnovu solubilizacionog kapaciteta formulacija odabranih duž linije razblaženja S-CoS:uljana faza = 8:2 za model lekovite supstance različitih fizičko-hemijskih osobina i terapijskih koncentracija – adapalen i sertakonazol-nitrat, odabrani su optimalni vehikulumi za njihovu topikalnu primenu. Kao pogodni nosači za adapalen su se pokazale kako APG-mikroemulzije, tako i formulacija zasnovana na gliceret-7-kaprilat/kapratu. Sa druge strane, zbog niže rastvorljivosti sertakonazol-nitrata u APGs, njihovih visokih pH vrednosti i više terapijske koncentracije SN, APG-uzorci su se pokazali neefikasni za solubilizaciju ovog leka. Nasuprot tome, mikroemulzije sa polietoksilovanim surfaktantima su uspešno rastvorile 2% (m/m) sertakonazol-nitrata. Detaljnija karakterizacija unutrašnje strukture odabranih mikroemulzija kao nosača za dermalnu isporuku ADA i SN je potvrdila njihovu invertnu bikontinuiranu strukturu. Međutim, kod ispitivanog seta uzoraka je uočena teškoća u primeni AFM, kao direktne tehnike za karakterizaciju strukture mikroemulzija. Naasuprot tome, EPR tehnika se pokazala kao pogodna za rasvetljavanje interakcija sastojaka sistema koje se direktno odražavaju na karakteristike međufaznog filma mikroemulzija (polarnost i pokretljivost međupovršine) i veličinu mikroemulzionih oblasti formiranih primenom različitih surfaktanata ili kosurfaktanata. Konačno, tokom karakterizacije strukture je uočeno da primena indirektnih tehnika (poput DSC) u nekim slučajevima može da generiše rezultate koji mogu otežano da se tumače ili navedu na pogrešne zaključke, čime je neophodnost primene više različitih metoda u ove svrhe istaknuta u prvi plan.

Drugi deo prikazuje rezultate ispitivanja karakteristika mikroemulzija sa solubilizovanim model lekovitim supstancama, procene lokalizacije lekova u vehikulumima, ispitivanja stabilnosti uzoraka sa i bez lekovitih supstanci, kao i *in vivo* bezbednosni profil placebo formulacija, što je sve skupa nedvosmisleno ukazalo na pogodnost primene odabranih uzoraka kao nosača za lokalnu primenu adapalena i sertakonazol-nitrata. Pokazano je da inkorporiranje 0,1% (m/m) adapalena u odabrane nosače nije promenilo značajno njihove fizičko-hemijske karakteristike (električnu provodljivost, prividni viskozitet i pH). Ipak, iako je je solubilizovani adapalena snizio pH vrednost svih vehikuluma, pH vrednosti uzoraka sa APG su bile nešto više i nepogodne za aplikaciju na kožu, te su dodatkom rastvora kiseline bile podešene na prihvatljiv nivo. Nasuprot tome, solubilizacijom sertakonazol-nitrata (2%, m/m) je zbog rastvaranja nitratnih anjona u vodenoj fazi mikroemulzionih nosača došlo do očekivano značajnog porasta električne provodljivosti, odnosno pada pH. Međutim, uzorci su ostali prikladni za dermalnu primenu. Nasuprot tome, kao rezultat rastvaranja ove model lekovite supstance u mikroemulzijama njihov viskozitet je neznatno porastao. Indirektnim

metodama (rastvorljivost u sastojcima mikroemulzija, merenja međupovršinskog napona i EPR) je međufazni film amfifila određen kao glavno mesto solubilizacije model lekovitih supstanci u odabranim nosačima, pri čemu je sertakonazol-nitrat bio rastvoren na delu međupovršine bliže uljanoj fazi, dok se u slučaju adapalena nije moglo isključiti njegovo delimično prisustvo u vodenoj fazi. Studijama stabilnosti je potvrđena inherentna termodinamička stabilnost svih uzoraka sa inkorporiranim model lekovitim supstancama, uprkos određenim promenama pH vrednosti i električne provodljivosti, što je u slučaju uzoraka sa adapalenom bilo izraženije. Hemijske interakcije model lekova sa ostalim sastojcima mikroemulzionih nosača su takođe isključene FTIR spektroskopskom analizom. Dodatno, *in vivo* procena bezbednosnog profila ispitivanih placebo mikroemulzija zasnovanih na APG i polietoksilovanim surfaktantima je otkrila njihovu dobru podnošljivost, bez obzira na vrstu surfaktanta. Značajne razlike u merenim biofizičkim parametrima (EI, SCH i TEWL) nisu uočene između formulacija stabilizovanih surfaktantima koji pripadaju različitim grupama (APG i polietoksilovani surfaktanti), niti između uzoraka zasnovanih na surfaktantima u okviru iste grupe. Takođe, vrsta ulja nije značajno uticala na iritacioni potencijal uzoraka sa decil-glukozidom (Plantacare® 2000 UP), premda su monogliceridi ispoljili veću tendenciju ka narušavanju barijerne funkcije kože u odnosu na monoestar propilenglikola.

Rezultati dobijeni u trećoj fazi eksperimentalnog rada, tokom koje su procenjene biofarmaceutske karakteristike mikroemulzija sa solubilizovanim model lekovitim supstancama, su prikazani u potpoglavlju *Rezultati i diskusija treće faze eksperimentalnog rada*. Količina sertakonazol-nitrata ekstrahovanog iz svinjske kože pune debljine po završetku *in vitro* ispitivanja permeacije/penetracije leka primenom Franz-ovih difuzionih ćelija je bila do 4,25 puta viša iz uzoraka kože tretiranih mikroemulzijama nego preparatom sa tržišta, što je bilo u korelaciji sa rezultatima dobijenim u *in vitro* ispitivanju oslobađanja ovog leka, a koji su bili obrnuto proporcionalni saturacionoj rastvorljivosti leka u mikroemulzijama. Štaviše, ciljna dermalna isporuka leka je postignuta aplikacijom mikroemulzija, jer pod korišćenim eksperimentalnim uslovima nije došlo do permacije sertakonazol-nitrata. Mikroemulzioni uzorci čijom je primenom ostvarena nešto niža dermalna isporuka sertakonazol-nitrata u odnosu na druge mikroemulzione formulacije su ovaj efekat kompenzovali nešto jačom antifungalnom aktivnošću, koja je u svim slučajevima bila značajno viša u odnosu na kontrolni komercijalni preparat. Takođe, primenom mikroemulzija postignuto je poboljšanje u *in vitro* dermalnoj isporuci druge model lekovite supstance (adapalena) u odnosu na komercijalni preparat, pri čemu su količine leka ekstrahovane iz svinjske kože pune debljine bile više do 5,9 puta. Ipak, tokom biofarmaceutske karakterizacije uzoraka sa adapalenom zapažene su teškoće u uspostavljanju veza između rezultata dobijenih u odvojenim eksperimentima, što je bilo uslovljeno različitim eksperimentalnim uslovima (sintetske membrane ili svinjska koža, *infinite* i *finite* doziranje leka, primena ili odsustvo okluzije, dužina trajanja eksperimenta). Naime, unatoč tome što je kumulativna količina adapalena oslobođenog u receptorski medijum kroz dijalizne membrane bila niža iz mikroemulzija nego iz kontrolnog uzorka sa tržišta, zadržavanje leka u koži svinje pune debljine je bilo veće. Prema tome, sintetske membrane nisu bile potpuno sposobne da predvide kompleksne interakcije koje se odvijaju između kože i sastojaka mikroemulzionih sistema. U studiji sprovedenoj pod *finite dose* uslovima, sprovođenjem *diferencijalnog tape stripping-a*, deponovanje adapalena u *stratum corneum* i folikule dlaka primenom mikroemulzija bilo je komparabilno akumulaciji leka u ovim odeljcima kože postignutoj aplikacijom komercijalnog preparata i ukazalo na relativno nizak udeo transfolikularnog puta transporta ukupnoj penetraciji adapalena u kožu, unatoč pretpostavci da bi kapi submikronskih dimenzija mogle značajno da se akumuliraju u folikulima dlaka. Međutim, iako je nedvosmisleno pokazano da se primenom mikroemulzija može značajno poboljšati deponovanje adapalena u kožu,

permeacija leka u receptorski medijum, korišćen u *in vitro* proceni penetracije/permacije leka, koja je zabeležena nakon 24 h ispitivanja, može da bude ograničavajući faktor za kliničku primenu mikroemulzija. Konačno, iako je na primeru adapalena pokazano da odsustvo sposobnosti sintetskih membrana za donošenje zaključaka o efektima mikroemulzionih uzoraka na koži, njihovom primenom mogu da se detektuju varijacije u sastavu mikroemulzionih nosača, što je potvrđeno i u slučaju *in vitro* ispitivanja sistema sa drugom model lekovitim supstancom. Osim toga, podjednaku sposobnost su pokazale i imerzione (inhenser) ćelije, čijom upotrebom je dobijen identičan poredak stepena oslobađanja sertakonazol-nitrata iz mikroemulzija stabilizovanih različitim surfaktantima, odnosno različitim kosurfaktantima.

U poslednjem, *četvrtom delu*, prezentovani su rezultati o mogućnostima razvoja rastvorljivih mikroigala kao fizičkih pojačivača dermalne isporuke slabo rastvorljivog leka – sertakonazol-nitrata, kao i rezultati procene njihove efikasnosti u odnosu na prethodno razvijene mikroemulzije kao opciju hemijskog pojačivača penetracije ispitivane model lekovite supstance, kada se primene same ili u kombinaciji sa predtretmanom kože čvrstim silikonskim mikroiglama. Pokazano je da rastvorljive mikroigle kao nosači za antifungalni lek nisu mogle da budu formulisane iz odabranih dveju mikroemulzija pri korišćenim eksperimentalnim uslovima, nagoveštavajući nepogodnost mikroemulzija za ovakvu vrstu manipulacija. Međutim, izrada nizova rastvorljivih mikroigala zadovoljavajućih geometrijskih i mehaničkih karakteristika je bila uspešna kada je kao polazna formulacija korišćen rastvor sertakonazol-nitrata (25 mg/ml) u metanolnom rastvoru PVP (30%, m/V). Demonstrirano je potpuno i veoma brzo (5 min) *in vitro* rastvaranje dobijenih nizova rastvorljivih mikroigala i leka. Nadalje, zbog nižeg sadržaja leka u rastvorljivim mikroiglama i ograničene površine dostupne za izvođenje *in vitro* studije penetracije/permeacije, sprovođenje uporednih ispitivanja efikasnosti hemijskih i fizičkih pojačivača penetracije sertakonazol-nitrata (mikroemulzije i mikrogle) u dermalnoj isporuci ovog leka je pod *infinite* uslovima doziranja bilo moguće samo u slučaju jedne vrste mikroigala – čvrstih silikonskih mikroigala koje su na kožu aplikovane kao predtremam, pre aplikacije mikroemulzija. Pokazano je da je fizičko narušavanje barijerne funkcije kože, ostvareno aplikacijom čvrstih silikonskih mikroigala neposredno pred primenu mikroemulzionih vehikuluma, dovelo do povećanja transporta leka u kožu, koje je bilo 1,90-2,02 puta više nego nakon lokalne primene istih mikroemulzija na intaktnu kožu. Međutim, u slučaju primene kombinovanog pristupa je došlo do permeacije leka nakon 24-h kontakta formulacija sa kožom. Doprinos rastvorljivih mikroigala u poboljšanju isporuke leka u/kroz kožu u odnosu na ostale ispitivane pristupe, procenjen pod *finite dose* uslovima, je bio sličan efektu lokalno primenjene najperspektivnije mikroemulzione formulacije. Zadržavanje sertakonazol-nitrata u koži korišćenjem mikroemulzije, odnosno rastvorljivih mikroigala, je bilo značajno niže nego kada su udruženi mehanizmi delovanja fizičkog i hemijskog inhensera penetracije (sinergistički efekat čvrstih silikonskih mikroigala i mikroemulzije). U slučaju korišćenja fizičkih premošćivača kožne barijere uočen je prolazak leka kroz svinjsku kožu u akceptorsku fazu kod obe vrste mikroigala.

3 UPOREDNA ANALIZA REZULTATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

U poslednjih nekoliko decenija, različiti mikro- i nanostrukturirani sistemi se ispituju kao potencijalni nosači koji mogu da pojačaju penetraciju i malih, ali i makromolekula, koji ne mogu na drugi način premostiti barijeru SC u dovoljnim količinama za postizanje terapijskog odgovora. Među njima posebno su privlačne mikroemulzije za lokalnu primenu lekovitih

supstanci kao emulzioni nosači sa nanostrukturom, a permanentni istraživački interes su privukle zahvaljujući svojim brojnim prednostima koje uključuju jednostavnu izradu, malu veličinu kapi (10-100 nm), dugoročnu stabilnost, niske troškovi izrade, visok solubilizacioni kapacitet, poboljšanje penetracije/permeacije hidrofobnih i hidrofilnih lekovitih supstanci u/kroz kožu, izbegavanje sistemskih neželjenih efekata lekova [1-4]. Shodno tome, mikroemulzije predstavljaju pogodnu formulacionu strategiju za isporuku slabo rastvorljivih supstanci koje se koriste u tretmanu različitih oboljenja i stanja kože, poput gljivičnih infekcija kože ili akni, gde je za postizanje efikasne terapije primarni cilj da se dostigne odgovarajuća koncentracija leka u vijabilnom epidermisu, odnosno vijabilnom epidemisu i folikulima dlaka, respektivno [5-8], bez prolaska lekova u sistemsku cirkulaciju čime se mogu posledično umanjiti neželjeni efekti postojećih formulacija, a time i osigurati bolja komplijansa pacijenata. Međutim, prema rezultatima brojnih studija očigledno je da potpuno odvajanje dermalne i transdermalne isporuke leka nije moguće, ali pažljivim dizajnom formulacije može da se postigne optimalan balans kojim bi se favorizovala isporuka leka u kožu odnosno u sistemsku cirkulaciju [2]. Zaista, sposobnost mikroemulzionog sistema da poboljša transport lekovitih supstanci u/kroz kožu u velikoj meri zavisi od unutrašnje strukture sistema i tipa mikroemulzije, koji su određeni sastavom i koncentracijom sastojaka. Pokazano je da vrsta surfaktanta i/ili kosurfaktanta, njihov međusobni odnos, vrsta korišćenog ulja i prisustvo inhensera penetracije u formulaciji određuju penetracioni profil leka [9,10]. Dakle, zavisno od fizičko-hemijskih osobina aktivne supstance, različiti tipovi mikroemulzija mogu da budu njen optimalan nosač. Međutim, nije dovoljno samo da se kombinuju različiti sastojci i obrazuje mikroemulzija pogodnih karakteristika, nego je neophodno da se pronađu odgovarajući sastojci u optimalnoj koncentraciji kako bi se maksimalno pojačala efikasnost sistema. Prema tome, imajući u vidu da isporuka lekova zavisi od mikrostrukture nosača i interakcije leka sa nosačem [4,11,12], od izuzetnog je značaja da se ispituju ove karakteristike. Međutim, s obzirom na kompleksnost i dinamički karakter strukture ovih koloidnih nosača, karakterizacija strukture mikroemulzija predstavlja priličan izazov i zahteva kombinovanu primenu više različitih eksperimentalnih tehnika. Pokazano je da je sveobuhvatna karakterizacija strukture odabranih mikroemulzionih sistema koja je sprovedena u prvoj fazi eksperimentalnog rada bila opravdana, što je verifikovano nizom prikazanih rezultata za čije je objašnjenje bilo neophodno pozivanje na relevantne literaturne izvore. Štaviše, tokom karakterizacije strukture je uočeno da primena indirektnih tehnika u nekim slučajevima može da generiše rezultate koji mogu otežano da se tumače ili navedu na pogrešne zaključke, čime je neophodnost primene više različitih metoda i povezivanje rezultata dobijenih različitim metodama istaknuta u prvi plan, kako bi se odabrala mikroemulzionaa formulacija određene strukture koja bi bi optimalna za svaku model lekovitu supstancu.

Pored uticaja na penetracioni/permeacioni profil inorporiranog leka, sastav mikroemulzione formulacije utiče i na njen bezbednosni profil, naročito ako se uzme u obzir da je koncentracija surfaktanata i kosurfaktanata neophodna za formiranje mikroemulzija pogodnih fizičko-hemijskih i biofarmaceutskih karakteristika često relativno visoka. Iz tog razloga su savremena istraživanja u (trans)dermalnoj isporuci lekova putem mikroemulzija usmerena na korišćenje surfaktanata koji su dobro podnošljivi kako bi se rizik od iritacije kože sveo na minimum [1,13,14]. Kao alternativa tradicionalnim etoksiliranim nejonskim surfaktantima (npr. polisorbati), koji su pokazali dobru funkcionalnost u formulaciji mikroemulzija [15], ali i potencijal da iritiraju kožu [16,17], u fokus su stavljeni noviji nejonski, biodegradabilni i netoksični surfaktanti, prirodnog ili sintetskog porekla. Stoga, rezultati ove doktorske disertacije značajno doprinose saznanjima o funkcionalnosti alkil poliglukozida u formulaciji mikroemulzija, ali i novijeg poletoksilovanog surfaktanta – gliceret-7-karilat/kaprilata. U tom kontekstu, treba da se naglasi da je unatoč povećanom interesu za surfaktante prirodnog

porekla, fazno ponašanje alkil poliglukoziida, naročito onih komercijalno dostupnih u obliku smeša sa vodom, oskudno ispitivano [18-20], dok gliceret-7-kaprilat/kaprat do sada nije proučavan kao stabilizator farmaceutskih mikroemulzija. U tom smislu, dobijeni nalazi o uticaju sadržaja vode u polaznom proizvodu, HLB vrednosti i dužini alkil lanca surfaktanta, kao i uticaju vrste korišćenog ulja na mogućnost obrazovanja mikroemulzija sa alkil poliglukoziidima, predstavljaju proširivanje postojećih naučnih saznanja, sa kojim su delimično u saglasnosti. U okviru ove doktorske disertacije se došlo takođe do saznanja da polietoksilovani surfaktant gliceret-7-kaprilat/kaprat koji je retko korišćen u formulaciji farmaceutskih preparata može uspešno da se koristi u formulaciji mikroemulzija kao koloidnih nosača lekova za dermalnu isporuku, te su identifikovane najvažnije karakteristike kosurfaktanata koje utiču na njegovu funkcionalnost.

S obzirom da je generalno prihvaćeno da surfaktanti prirodnog porekla ispoljavaju manji rizik za iritacijom kože [21], odnosno povoljniji bezbednosni profil u odnosu na polietoksilovane surfaktante, treba da se istakne da relevantna literatura ne beleži slučajeve procene delovanja mikroemulzija na bazi alkil poliglukoziida niti gliceret-7-kaprilat/kaprilata *in vivo* na humanim subjektima, premda su ranije studije sprovedene *in vitro* ili *in vivo* na životinjama ukazale na dobru podnošljivost mikroemulzija zasnovanih na alkil poliglukoziidnim surfaktantima [18-20,22], odnosno kozmetičkih proizvoda zasnovanih na gliceret-7-kaprilat/kaprilatu. Stoga, preliminarno pokazan povoljan bezbednosni profil mikroemulzija sa alkil poliglukoziidima, odnosno gliceret-7-kaprilat/kaprilatom, koji je kompaarabilan iritacionom potencijalu kontrolne mikroemulzije zasnovane na konvencionalno korišćenom polisorbatu 80, direktno upućuje na značaj i doprinos jednog od rezultata drugog dela eksperimentalnog rada disertacije.

Takođe, značajan doprinos disertacije predstavlja i ispitivanje mogućnosti postizanja kontrolisane dermalne isporuke slabo rastvorljivih lekovitih supstancom primenom mikroemulzija zasnovanih na korišćenim surfaktantima. Pokazalo se da je sveobuhvatna fizičko-hemijska karakterizacija optimalnih uzoraka sa i bez ikorporiranih model lekovitih supstanci, koja je sprovedena u drugoj fazi eksperimentalnog rada, bila nedvosmisleno neophodna i opravdana, jer je pružila uvid u najznačajnije faktore koji su kasnije uticali na biofarmaceutske performanse lokalno primenjenih mikroemulzija. U tom smislu posebno treba da se istakne da je ukazano na značaj sagledavanja kompleksnih interakcija leka sa nosačem na molekulskom nivou što se posebično odrazilo i na interakcije leka/formulacije sa sintetskim membranama, odnosno kožom na mestu primene. Takođe, iako adapalen kao model lekovita susptanca privlači pažnju brojnih istraživača [11,23,24], u literaturi ne postoji podatak o prisustvu/odsustvu njegove amfifilnosti, što je jedan od značajnih rezultata ove doktorske disertacije.

Uzimajući u obzir da je preduslov za penetraciju i transport lekovite supstance kroz stratum corneum i ostale slojeve kože, a time i za postizanje terapijskog odgovora, najpre njeno oslobađanje iz nosača u kojem je primenjena [25], u ovoj doktorskoj disertaciji je sprovedena *in vitro* procena oslobađanja model lekovitih supstanci, odnosno *in vitro* ispitivanje njihove penetracije/permeacije iz razvijenih optimalnih mikroemulzija. *In vitro* procena oslobađanja jedne model lekovite supstance je sprovedena paralelno korišćenjem vertikalnih difuzionih ćelija i imerzionih ćelija, u nedostatku postojanja standardizovane metode za ovu vrstu ispitivanja kod mikroemulzija. Rezultati ovih eksperimenata su ukazali na pogodnost primene obe vrste aparature za detekciju varijacija u sastavu mikroemulzionih nosača. Nadalje, iako je na primeru adapalena pokazano odsustvo sposobnosti sintetskih membrana za donošenje zaključaka o efektima mikroemulzionih uzoraka na koži (unatoč tome što je kumulativna količina leka oslobođenog u receptorski medijum kroz dijalizne membrane bila niža iz mikroemulzija nego iz kontrolnog uzorka sa tržišta, zadržavanje leka u koži svinje pune debljine je bilo veće), njihovom primenom mogu da se detektuju varijacije u

sastavu mikroemulzionih nosača, što je potvrđeno i u slučaju *in vitro* ispitivanja sistema sa drugom model lekovitom supstancom – sertakonazol-nitratom. *In vitro* procena penetracije/permeacije ispitivanih model lekovitih supstanci je potvrdila ranije dobijene rezultate [8,11,26,27] – moguće je postići značajno poboljšanje isporuke lekova u kožu. Međutim, kod sertakonazol-nitrata je ostvarena ciljna dermalna isporuka leka u kožu uha svinje, što je značajno imajući u vidu se svinjska koža smatra najprihvatljivijom zamenom za humanu kožu [28], a da su ranija ispitivanja permeacije/penetracije mikroemulzija i mikroemulzionih gelova sa sertakonazol-nitratom sprovedena uglavnom kroz izolovani epidermis kože pacova/kožu pacova ili miša pune debljine [8,26,27]. Važno da se napomene jeste da je količina leka zadržanog u koži bila veća u odnosu na akumulaciju leka koju su prethodno postigli drugi istraživači u sličnim studijama sa mikroemulzijama, a slični nalazi su dobijeni i prilikom procene antifungalne aktivnosti uzoraka merenjem prečnika zone inhibicije rasta gljivica [26,27]. Takođe, iako je u jednom istraživanju dostignuto višestruko veće zadržavanje leka u koži miša nakon 6-h eksperimenta, mora da se naglasi da je pri tome došlo i do značajne permeacije leka, kao i to da su korišćeni značajno različiti eksperimentalni uslovi u odnosu na protokol korišćen u okviru ove doktorske disertacije [8]. Sa druge strane, u slučaju adapalena je došlo do intenzivnijeg transporta leka kroz kožu, odnosno do njegove permeacije, što je u susrotnosti sa ranijim istraživanjima mikroemulzija kao nosača za ovaj lek [11]. Međutim, treba da se naglasi da je u pomenutoj studiji prilikom ispitivanja permeacije *in vitro* korišćen medijum koji nije obezbedio *sink* uslove. Sa druge strane, dobijeni rezultati dobro koreliraju sa ranijim zapažanjima Jain i sar. [29,30] i Najafi-Taker i sar. [24] koji su takođe uočili prisustvo adapalena u receptorskom delu *Franz*-ovih ćelija nakon tretmana kože sa drugim nanonosačima adapalena. Međutim, uprkos zabeleženoj permeaciji leka pod *in vitro* uslovima, u sprovedenoj *in vivo* studiji nije došlo do apsorpcije leka u sistemsku cirkulaciju [24]. Dodatnu vrednost ove doktorske disertacije predstavljaju rezultati *diferencijalnog tape stripping-a*, sprovednog *in vitro* na koži uha svinje, koji nisu potvrdili prvobitnu pretpostavku o značajnoj isporuci leka iz mikroemulzija u folikule dlaka, kao ni ranije rezultate ispitivanja folikularnog deponovanja lekova primenjenih putem mikroemulzija [11,31,32], koja su sprovedena pod različitim eksperimentalnim uslovima (*in vitro* pod infinite doze uslovima, *in vitro* na modelu kravljeg vimena i *in vivo* na humanim dobrovoljcima), ali su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u slučaju ispitivanja drugih submikronskih emulzija – nanoemulzija kao nosača za transdermalnu isporuku NSAIL [33], ukazujući na potrebu za kritičkim sagledavanjem hipoteze da se submikronskim emulzijama može postići značajan transfolikularni transport lekovitih supstanci.

Na kraju, posebno treba da se istakne značajan naučni doprinos rezultata četvrte faze eksperimentalnog rada. Naime, iako je rastvorljive mikroigle moguće izraditi iz nekoliko različitih naprednih nosača lekova, kao što su polimerne nanočestice, nanosuspenzije ili mikročestice, do sada u literature nisu zabeleženi pokušaji njihove fabrikacije iz mikroemulzija kao polaznog materijala. U okviru ove doktorske disertacije su izvršeni određeni iskoraci unatoč tome što se pokazalo da se mikroemulzije ne čine kao pogodan vehikulum za prevođenje u rastvorljive mikroigle jer su kritički sagledani mogući razlozi za neuspeh i ukazano na potrebu za ulaganjem dodatnih napora. Sa druge strane, uspešno su formulisane rastvorljive mikroigle iz rastvora slabo rastvorljive model lekovite supstance (sertakonazol-nitrata), što je postignuto korišćenjem organskog rastvarača kao načina kojim se može prevazići slaba rastvorljivost lipofilnih lekova u vodi [34]. Dodatnu vrednost ove doktorske disertacije predstavljaju rezultati uporedne analize efikasnosti primene rastvorljivih mikroigala, kao fizičkog inhensera penetracije, i mikroemulzija, kao opcije hemijskog pojačivača penetracije, koja je pokazala komparabilnu akumulaciju leka bez obzira na način primene. Značaj ovih rezultata dodatno potkrepljuje činjenica da prema dostupnim literaturinim podacima, slična komparativna procena ove dve vrste naprednih nosača za

isporuku lekova nije do sada vršena. Konačno, iako je u značajnom broju istraživanja pokazano da perforacija kože čvrstim mikroiglama rezultuje u pospešivanju penetracije/permeacije lekovitih supstanci iz konvencionalnih i naprednih nosača, kombinovana primena mikroigala i mikroemulzija je još uvek slabo dokumentovana u literaturi [35-37]. U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano (*in vitro* pod *infinite i finite dose* uslovima primene) da poboljšanje dermalnog deponovanja leka može da bude postignuto kombinovanom aplikacijom mikroemulzije i čvrstih silikonskih mikroigala, potvrđujući postavljenu hipotezu da je predtretman kože čvrstim silikonskim mikroiglama pogodan pristup za povećanje perkutane penetracije/permeacije leka primenjenog u formi mikroemulzija. Dobijeni nalazi su bili u dobroj korelaciji sa ranijim zapažanjima Mojeiko i sar. [36] koji su takođe iz tretirane kože ekstrahovali ~ 2 puta više ispitivane lekovite supstance, za razliku od Kelchena i Brogdna [35] koji su dostigli 20 puta bolju penetraciju propranolola u kožu nakon aplikacije mikroigala. Međutim, kod poređenja rezultata dobijenih u različitim istraživanjima ne treba da budu zanemarene razlike u fizičkim i mehaničkim osobinama mikroigala, načinu njihove aplikacije, vrsti i načinu pripreme kože korišćene za ispitivanje, trajanju eksperimenta, količini primenjene formulacije itd. Takođe, u slučaju korišćenja fizičkih premošćivača kožne barijere uočen je povećan prolazak leka kroz svinjsku kožu u akceptorsku fazu kod obe vrste mikroigala, što je takođe u dobroj korelaciji sa ranije publikovanim podacima [35-37].

Sagledavajući sveobuhvatno rezultate predstavljene u ovoj doktorskoj disertaciji, može se zaključiti da su delimično u saglasnosti sa podacima iz literature, a deo rezultata koji se odnosi na određena ispitivanja sprovedena u okviru disertacije nije mogao da bude kompariran sa publikovanim podacima, te se smatra kao doprinos istraživačkog rada kandidata.

CITIRANA LITERATURA:

- [1] S. Heuschkel, A. Goebel, R.H. Neubert, Microemulsions--modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery, J. Pharm. Sci. 97 (2008) 603-631. <https://doi.org/10.1002/jps.20995>.
- [2] L.B. Lopes, Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions, Pharmaceutics. 6 (2014) 52-77. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics6010052>.
- [3] C. Nastiti, T. Ponto, E. Abd, J.E. Grice, H.A.E. Benson, M.S. Roberts, Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery, Pharmaceutics. 9 (2017). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9040037>.
- [4] J. Zhang, B.B. Michniak-Kohn, Investigation of microemulsion and microemulsion gel formulations for dermal delivery of clotrimazole, Int. J. Pharm. 536 (2017) 345-352. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.041>.
- [5] H. Harde, A.K. Agrawal, M. Katariya, D. Kale, S. Jain, Development of a topical adapalene-solid lipid nanoparticle loaded gel with enhanced efficacy and improved skin tolerability, RSC Advances. 5 (2015) 43917-43929. <https://doi.org/10.1039/c5ra06047h>.
- [6] M. Manian, K. Madrasi, A. Chaturvedula, A.K. Banga, Investigation of the Dermal Absorption and Irritation Potential of Sertaconazole Nitrate Anhydrous Gel, Pharmaceutics. 8 (2016). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8030021>.
- [7] S. Piskin, E. Uzunali, A review of the use of adapalene for the treatment of acne vulgaris. 3 (2007) 621-624.
- [8] S.A.A. Radwan, A.N. ElMeshad, R.A. Shoukri, Microemulsion loaded hydrogel as a promising vehicle for dermal delivery of the antifungal sertaconazole: design, optimization

- and ex vivo evaluation, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 43 (2017) 1351-1365. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1318899>.
- [9] G.M. El Maghraby, Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: effects of cosurfactants, *Int. J. Pharm.* 355 (2008) 285-292. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.12.022>.
- [10] W. Zhu, A. Yu, W. Wang, R. Dong, J. Wu, G. Zhai, Formulation design of microemulsion for dermal delivery of penciclovir, *Int. J. Pharm.* 360 (2008) 184-190. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.04.008>.
- [11] G. Bhatia, Y. Zhou, A.K. Banga, Adapalene microemulsion for transfollicular drug delivery, *J. Pharm. Sci.* 102 (2013) 2622-2631. <https://doi.org/10.1002/jps.23627>.
- [12] M. Cohen-Avrahami, A.I. Shames, M.F. Ottaviani, A. Aserin, N. Garti, On the correlation between the structure of lyotropic carriers and the delivery profiles of two common NSAIDs, *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 122 (2014) 231-240. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.04.026>.
- [13] V. Savic, M. Todosijevic, T. Ilic, M. Lukic, E. Mitsou, V. Papadimitriou, S. Avramiotis, B. Markovic, N. Cekic, S. Savic, Tacrolimus loaded biocompatible lecithin-based microemulsions with improved skin penetration: Structure characterization and in vitro/in vivo performances, *Int. J. Pharm.* 529 (2017) 491-505. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.07.036>.
- [14] M.N. Todosijević, N.D. Cekić, M.M. Savić, M. Gašperlin, D.V. Ranđelović, S.D. Savić, Sucrose ester-based biocompatible microemulsions as vehicles for aceclofenac as a model drug: formulation approach using D-optimal mixture design, *Colloid. Polym. Sci.* 292 (2014) 3061-3076. <https://doi.org/10.1007/s00396-014-3351-4>.
- [15] G. Kaur, S.K. Mehta, Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications, *Int. J. Pharm.* 529 (2017) 134-160. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.059>.
- [16] S.L. Alade, R.E. Brown, A. Paquet, Polysorbate 80 and E-Ferol Toxicity, *Pediatrics.* 77 (1986) 593-597.
- [17] M. Bergh, K. Magnusson, J.L.G. Nilsson, A.-T. Karlberg, Contact allergenic activity of Tween® 80 before and after air exposure, *Contact Dermatitis.* 37 (1997) 9-18. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1997.tb00368.x>.
- [18] A.N. ElMeshad, M.I. Tadros, Transdermal delivery of an anti-cancer drug via w/o emulsions based on alkyl polyglycosides and lecithin: design, characterization, and in vivo evaluation of the possible irritation potential in rats, *AAPS PharmSciTech.* 12 (2011) 1-9. <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9557-y>.
- [19] A.S. Goebel, U. Knie, C. Abels, J. Wohlrab, R.H. Neubert, Dermal targeting using colloidal carrier systems with linoleic acid, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 75 (2010) 162-172. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.02.001>.
- [20] A.S. Goebel, R.H. Neubert, J. Wohlrab, Dermal targeting of tacrolimus using colloidal carrier systems, *Int. J. Pharm.* 404 (2011) 159-168. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.11.029>.
- [21] T.F. Tadros, *Applied Surfactants: Principles and Applications*, Wiley 2005.
- [22] D. Pepe, J. Phelps, K. Lewis, J. Dujack, K. Scarlett, S. Jahan, E. Bonnier, T. Milic-Pasetto, M.A. Hass, L.B. Lopes, Decylglucoside-based microemulsions for cutaneous localization of lycopene and ascorbic acid, *Int. J. Pharm.* 434 (2012) 420-428. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.016>.
- [23] J.M. Nadal, G. Dos Anjos Camargo, A. Novatski, W.R. Macenhan, D.T. Dias, F.M. Barboza, A. Lyra, J.R. Roik, J. Padilha de Paula, A. Somer, P.V. Farago, Adapalene-loaded poly(epsilon-caprolactone) microparticles: Physicochemical characterization and in vitro

- penetration by photoacoustic spectroscopy, *PLoS One*. 14 (2019) e0213625. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213625>.
- [24] R. Najafi-Taher, B. Ghaemi, A. Amani, Delivery of adapalene using a novel topical gel based on tea tree oil nano-emulsion: Permeation, antibacterial and safety assessments, *Eur. J. Pharm. Sci.* 120 (2018) 142-151. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.04.029>.
- [25] D.S. Miron, F.S. Radulescu, E. Benfeldt, V.P. Shah, V.A. Voicu, In vitro and in vivo evaluation of three metronidazole topical products, *Pharm. Dev. Technol.* 19 (2014) 194-199. <https://doi.org/10.3109/10837450.2013.763265>.
- [26] S. Sahoo, N.R. Pani, S.K. Sahoo, Microemulsion based topical hydrogel of sertaconazole: formulation, characterization and evaluation, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 120 (2014) 193-199. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.022>.
- [27] S. Sahoo, N.R. Pani, S.K. Sahoo, Effect of microemulsion in topical sertaconazole hydrogel: in vitro and in vivo study, *Drug Deliv.* 23 (2016) 338-345. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.914601>.
- [28] M. Gibson, *Pharmaceutical Preformulation and Formulation*, 2nd ed., IHS Health Group 2009.
- [29] A. Jain, N.K. Garg, A. Jain, P. Kesharwani, A.K. Jain, P. Nirbhavane, R.K. Tyagi, A synergistic approach of adapalene-loaded nanostructured lipid carriers, and vitamin C co-administration for treating acne, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 42 (2016) 897-905. <https://doi.org/10.3109/03639045.2015.1104343>.
- [30] A.K. Jain, A. Jain, N.K. Garg, A. Agarwal, A. Jain, S.A. Jain, R.K. Tyagi, R.K. Jain, H. Agrawal, G.P. Agrawal, Adapalene loaded solid lipid nanoparticles gel: an effective approach for acne treatment, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 121 (2014) 222-229. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.041>.
- [31] S.S. Biju, A. Ahuja, R.K. Khar, Tea tree oil concentration in follicular casts after topical delivery: determination by high-performance thin layer chromatography using a perfused bovine udder model, *J. Pharm. Sci.* 94 (2005) 240-245. <https://doi.org/10.1002/jps.20250>.
- [32] A. Teichmann, S. Heuschkel, U. Jacobi, G. Presse, R.H. Neubert, W. Sterry, J. Lademann, Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67 (2007) 699-706. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.04.006>.
- [33] T. Ilic, S. Savic, B. Batinic, B. Markovic, M. Schmidberger, D. Lunter, M. Savic, S. Savic, Combined use of biocompatible nanoemulsions and solid microneedles to improve transport of a model NSAID across the skin: In vitro and in vivo studies, *Eur. J. Pharm. Sci.* 125 (2018) 110-119. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.09.023>.
- [34] J.Y. Kim, M.R. Han, Y.H. Kim, S.W. Shin, S.Y. Nam, J.H. Park, Tip-loaded dissolving microneedles for transdermal delivery of donepezil hydrochloride for treatment of Alzheimer's disease, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 105 (2016) 148-155. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.06.006>.
- [35] M.N. Kelchen, N.K. Brogden, In Vitro Skin Retention and Drug Permeation through Intact and Microneedle Pretreated Skin after Application of Propranolol Loaded Microemulsions, *Pharm. Res.* 35 (2018) 228. <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2495-1>.
- [36] G. Mojeiko, M. de Brito, G.C. Salata, L.B. Lopes, Combination of microneedles and microemulsions to increase celecoxib topical delivery for potential application in chemoprevention of breast cancer, *Int. J. Pharm.* 560 (2019) 365-376. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.02.011>.
- [37] Q. Zu, Y. Yu, X. Bi, R. Zhang, L. Di, Microneedle-Assisted Percutaneous Delivery of a Tetramethylpyrazine-Loaded Microemulsion, *Molecules*. 22 (2017). <https://doi.org/10.3390/molecules22112022>.

4 OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21):

1. **Bubic Pajic N**, Nikolic I, Mitsou E, Papadimitriou V, Xenakis A, Randjelovic D, Dobricic V, Smitran A, Cekic N, Calija B, Savic S. Biocompatible microemulsions for improved dermal delivery of sertaconazole nitrate: Phase behavior study and microstructure influence on drug biopharmaceutical properties, *J. Mol. Liq.* (2018); 272: 746-758. (IF 4,561/2018)

Radovi objavljeni u istaknutim međunarodnim časopisima (M22):

Bubić Pajić N, Ilić T, Nikolić I, Dobričić V, Pantelić I, Savić, S. Alkyl polyglucoside-based adapalene-loaded microemulsions for targeted dermal delivery: Structure, stability and comparative biopharmaceutical characterization with a conventional dosage form. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2019;54: 101245. (IF 2,606/2018)

Radovi objavljeni u međunarodnim časopisima (M23):

Dobričić V, **Bubić Pajić N**, Marković B, Vladimirov S, Savić S, Vuleta G. Development and validation of an LC-MS/MS method for the determination of adapalene in pharmaceutical forms for skin application, *J. Serb. Chem. Soc.* (2016); 81(10): 1171-1181. (IF 0,822/2016)

Bubic Pajic N, Todosijevec M, Vuleta G, Cekic N, Dobricic V, Vucen S, Calija B, Lukic M, Ilic T, Savic S. Alkyl polyglucoside vs. ethoxylated surfactant-based microemulsions as vehicles for two poorly water-soluble drugs: physicochemical characterization and in vivo skin performance. *Acta Pharm.* (2017); 67(4): 415-439. (IF 1,071 /2017)

Radovi objavljeni u nacionalnim časopisima (M52):

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

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

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

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

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

Bubić Pajić N, Ilić T, Vučen S, O'Mahony C, Dobričić V, Savić S. Testing the efficacy of different penetration enhancers for dermal delivery of poorly soluble drugs – a case with sertaconazole nitrate. 12th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Vienna, Austria, March 23-26, 2020 (prihvaćeno).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 ZAKLJUČAK - OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Predmet naučnog istraživanja bio je razvoj biokompatibilnih, nejonskih mikroemulzija, kao sistema sa nanostrukturom, na bazi alkil poliglukozida i polietoksilovanih glicerida masnih kiselina kao potencijalnih nosača nove generacije za dermalnu isporuku dve model lekovite supstance – sertakonazol-nitrata i adapalena, te njihova fizičko-hemijska i

biofarmaceutska karakterizacija. Takođe je ispitivano i da li se primenom rastvorljivih mikroigala može značajno poboljšati isporuka sertakonazol-nitrata u/kroz kožu, kao i da li se kombinovanom primenom mikroemulzija i čvrstih silikonskih mikroigala može obezbediti sinergistički efekat fizičkog inhensera i same formulacije i efikasnija dermalna isporuka ovog antifungalnog leka (mikroemulzije vs. rastvorljive mikroigle vs. čvrste mikroigle + mikroemulzije).

Razmtrajući prikazane rezultate paralelno s podacima navedenim u teorijskom, uvodnom delu ove doktorske disertacije, može se izvesti zaključak da su uspešno razvijene biokompatibilne nejonske mikroemulzije stabilizovane surfaktantima prirodnog porekla – alkil poliglukozidima i gliceret-7-kaprilat kaprilatu. Nakon procene faznog ponašanja svakog od korišćenih surfaktanata pod različitim ulovima, sveobuhvatnog ispitivanja njihovih mogućnosti da obrazuju sisteme različite unutrašnje strukture, kao i procene sposobnosti mikroemulzija da solubilizuju model lekovite supstance, formulisano je po 5 nosača za svaki od lekova, pri čemu je samo jedna od mikroemulzija bila odgovarajuća za oba model leka.

Kroz rezultate dobijene sveobuhvatnom fizičko-hemijskom karakterizacijom, analizom interakcija između lekova i nosača, ispitivanjem stabilnosti razvijenih mikroemulzija, te procenom njihovog iritacionog potencijala, dodatno je potvrđena pogodnost primene alkil poliglukozida i gliceret-7-kaprilat/kaprilata u formulaciji farmaceutskih mikroemulzija.

Štaviše, na iste zaključke upućuju i rezultati ispitivanja *in vitro/in vitro* dermalne raspoloživosti i efikasnosti isporuke model lekovitih supstanci u kožu, kao i procene antifungalne aktivnosti, što je procenjeno uporedo sa referentnim preparatima sa tržišta. Utvrđeno je da su sve ispitivane mikroemulzije obezbedile poboljšanje akumulacije lekovitih supstanci u koži, koje je dostiglo vrednost od 4,25 i 5,9 puta za sertakonazol-nitrat i adapalen, respektivno. Takođe, antifungalna efikasnost sertakonazol-nitrata primenjenog putem mikroemulzija je bila značajno veća u odnosu na primenu komercijalnog preparata (polučvrstog farmaceutskog oblika). Demonstrirano je i da prisustvo monoglicerida masnih kiselina u kombinaciji sa kaprilil/kapril-glukozidom dobrinosi poboljšanje isporuke adapalena u kožu, ali i kroz kožu. Takođe, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na komparabilne mogućnosti gliceret-7-kaprilat/kaprilata i polisorbata 80 kao stabilizatora mikroemulzija da pojačaju isporuku sertakonazol-nitrata u kožu. Dakle, komparativnom analizom penetracionih profila dobijenih različitim *in vitro* metodama (*in vitro* procena brzine oslobađanja lekovitih supstanci iz nosača kroz veštačku membranu, studija permeacije/penetracije na *Franz*-ovim ćelijama, *diferencijalni tape stripping*), dobio se uvid u: i) uticaj varijacija u sastavu formulacije na obim i brzinu isporuke lekova u/kroz kožu; ii) mehanizme koji su uključeni u penetraciju lekovite supstance u kožu iz ispitivanih mikroemulzija; iii) udeo transfolikularnog puta transporta lekovite supstance iz mikroemulzija u/kroz kožu. Ipak, s obzirom da su tokom biofarmaceutske karakterizacije uzoraka sa adaplenom zapažene teškoće u uspostavljanju veza između rezultata dobijenih u odvojenim eksperimentima, uslovljene različitim eksperimentalnim uslovima (sintetske membrane ili svinjska koža, *infinite* i *finite* doziranje leka, primena ili odsustvo okluzije, dužina trajanja eksperimenta), nameće se potreba za dodatnim prilagođavanjima uobičajeno korišćenih eksperimentalnih protokola, kako bi se omogućilo objektivnije tumačenje i poređenje rezultata dobijenih različitim metodama.

Na kraju, veliki doprinos doktorske disertacije predstavljaju rezultati dobijeni u poslednjoj fazi istraživačkog rada, koji su podrazumevali formulaciju rastvorljivih mikroigala kao fizičkog inhensera penetracije sertakonazol-nitrata u kožu. Iako se pokazalo da mikroemulzije nisu pogodan materijal za prevođenje u rastvorljive mikroigle, ova vrsta mikroigala je uspešno fabrikovana iz rastvora lekovite supstance. Konačno upoređena je *in vitro* efikasnost formulisanih rastvorljivih mikroigala naspram delovanja mikroemulzija, primenjenih sa ili

bez prethodnog tretmana kože čvrstim silikonskim mikroiglama, u cilju procene doprinosa svakog od navedenih pristupa pojačavanja isporuke leka u/kroz kožu. U tom kontekstu je demonstrirano da je fizičko narušavanje barijerne funkcije kože ostvareno aplikacijom čvrstih silikonskih mikroigala neposredno pred primenu mikroemulzionih vehikuluma dovelo do povećanja transporta leka u kožu, koje je bilo 1,90-2,02 puta više nego nakon lokalne primene istih mikroemulzija na intaktnu kožu. Nadalje, doprinos rastvorljivih mikroigala u poboljšanju isporuke sertakonazol-nitrata u/kroz kožu u odnosu na ostale ispitivane pristupe, procenjen pod *finite dose* uslovima, je bio sličan efektu lokalno primenjene najperspektivnije mikroemulzione formulacije. Zadržavanje SN u koži korišćenjem mikroemulzije, odnosno rastvorljivih mikroigala, je bilo značajno niže nego kada su udruženi mehanizmi delovanja fizičkog i hemijskog inhensera penetracije (sinergistički efekat čvrstih silikonskih mikroigala i mikroemulzije). U slučaju korišćenja fizičkih premošćivača kožne barijere uočen je prolazak leka kroz svinjsku kožu u akceptorsku fazu kod obe vrste mikroigala, što bi potencijalno moglo da se iskoristi kao pogodan pristup za transdermalnu isporuku pojedinih antifungalnih lekova.

Sveukupno gledajući, rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju nova ili dopunjena saznanja o: (i) faznom ponašanju i upotrebi novijih surfaktanata prirodnog porekla (alkil poliglukozidi, gliceret-7-kaprilat/kaprat) kao stabilizatora u formulaciji submikronskih emulzija – mikroemulzija (ii) prednostima primene mikroemulzija kao naprednih nosača za dermalnu isporuku slabo rastvorljivih lekovitih supstanci u odnosu na konvencionalne toopikalne preparate sa tržišta; (iii) mogućnostima izrade rastvorljivih mikroigala kao nosača slabo rastvorljivih lekovitih supstanci inkorporiranih u savremene nosače (mikroemulzije) i konvencionalne nosače (rastvore) i njihovim efektima na isporuku sertakonazol-nitrata kao model lekovite supstance u/kroz; (iv) efektima kombinovane primene predtretmana kože čvrstim mikroiglama i mikroemulzija na isporuku istog model leka u/ kroz kožu; i (v) doprinosu i komparaciji različitih strategija za isporuku model lekovite supstance (sertakonazol-nitrata) u pobošanju njene isporuke u/kroz kožu (mikroemulzija kao opcije hemijskog poboljšivača penetracije, rastvorljivih mikroigala kao fizičkih inhensera penetracije i kombinacije hemijskog i fizičkog inhensera penetracije (mikroemulzije i čvrste silikonske mikroigle).

6 PROVERA ORIGINALNOSTI DOKTORSKE DISERTACIJE

Korišćenjem programa iThenticate u Univerzitetnoj biblioteci Svetozar Marković, Beograd završena je provera originalnosti doktorske disertacije. Dobijena vrednost za *Similarity index* iznosi 6%, kao posledica podudarnosti ličnih imena, citata, izraza korišćenih u opisu metodologije, uobičajenih fraza korišćenih u opisu rezultata istraživanja. Prema tome, može se izvesti zaključak da je priložena doktorska disertacija kandidata dipl. farm. Nataše Bubić Pajić originalno naučno delo.

7 Predlog Komisije

Na osnovu izloženog, Komisija zaključuje da je kandidat dipl. farm. Nataša Bubić Pajić uspešno realizovala postavljene ciljeve istraživanja i da rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji predstavljaju značajan naučni doprinos u oblasti Farmaceutске tehnologije.

Rezultati doktorske disertacije publikovani su u jednom radu u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), jednom radu u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), dva rada u međunarodnom časopisu (M23), jednom časopisu nacionalnog značaja (M53) i većem broju saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampanim u celini (M33) ili izvodu (M34).

Komisija u navedenom sastavu, stoga, pozitivno ocenjuje doktorsku disertaciju dipl. farm. Nataše Bubić Pajić i sa zadovoljstvom predlaže Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta da prihvati ovaj Izveštaj o završenoj doktorskoj disertaciji i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom:

„Hemijski i fizički pojačivači dermalne isporuke slabo rastvorljivih lekovitih supstanci: uporedna ispitivanja mikroemulzija, čvrstih i rastvorljivih mikroigala”

Članovi Komisije:

1. _____
Dr sc. Snežana Savić, redovni profesor, mentor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
2. _____
Dr sc. Sonja Vučen, docent, mentor,
Univerzitet u Korku, Farmaceutski fakultet
3. _____
Dr sc. Ivana Pantelić, docent,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
4. _____
Dr sc. Ranko Škrbić, redovni profesor,
Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci

U Beogradu, 26.03.2020.