

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU UNIVERZITETA U BEOGRADU – FARMACEUTSKOG FAKULTETA

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU – DOKTORSKE STUDIJE

Na sednici Nastavno-naučnog veća Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, održanoj 25.11.2021. godine, imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata magistra farmacije Ines Nikolić, pod naslovom

Spontanoemulgujuće nanoemulzije za primenu kurkumina na koži: istraživanje uticaja međufaznih fenomena u koloidnom sistemu na efikasnost isporuke i biološku aktivnost

Komisija u sastavu:

1. Dr Danina Krajišnik, vanredni profesor – predsednik Komisije, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet;
2. Dr Lada Živković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet;
3. Dr Ana Žugić, naučni saradnik, Institut za proučavanje lekovitog bilja *Dr Josif Pančić*;
4. Dr Dominique Jasmin Lunter, redovni profesor, Univerzitet Eberhard-Karls, Tübingen (Nemačka);
5. Dr Vassiliki Papadimitriou, stariji istraživač, Institut za medicinsku biologiju, Nacionalna helenska istraživačka fondacija (Atina, Grčka) i gostujući profesor, Univerzitet Tesali (Larisa, Grčka)

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

IZVEŠTAJ

1. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija pod nazivom ***Spontanoemulgujuće nanoemulzije za primenu kurkumina na koži: istraživanje uticaja međufaznih fenomena u koloidnom sistemu na efikasnost isporuke i biološku aktivnost*** sadrži šest poglavlja: 1. Uvod, 2. Ciljevi istraživanja, 3. Eksperimentalni deo, 4. Rezultati i diskusija, 5. Zaključak i 6. Literatura. U okviru doktorske disertacije, na njenom početku, priložen je sažetak na srpskom i engleskom jeziku, a na kraju su odgovarajući prilozi doktorskoj disertaciji: 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 doktorske disertacije.

Disertacija je napisana na 139 strana (počevši od uvoda, zaključno sa popisom literaturnih referenci) i sadrži 62 slike (13 u uvodu, 5 u eksperimentalnom delu, 44 u rezultatima i diskusiji) i 21 tabelu (7 u uvodu, 14 u rezultatima i diskusiji). Pregled literature sadrži 232 navoda.

Uvod sadrži 8 poglavlja (sa određenim podpoglavljima), u kojima su jasno navedene informacije relevantne za predmet proučavanja doktorske disertacije. Na samom početku, u prvom delu

uvoda, dat je osvrt na različite koloidne sisteme, dok je u drugom delu uvoda više reči bilo o njihovim mogućnostima primene u nanomedicini, klasifikacijama nanosistema, te trenutno važećim definicijama relevantnih naučnih i regulatornih tela (Evropska komisija, Evropska fondacija za nauku, Evropski savet za istraživanje u medicini, Evropska tehnološka platforma za nanomedicinu, Evropska laboratorija za karakterizaciju nanolekova, Administracija za hranu i lekove Sjedinjenih Američkih Država) koje se odnose na nanomedicinu i nanomaterijale/nanolekove. U nastavku, u trećem delu uvoda, navedene su prednosti koje nanosistemi imaju nad konvencionalnim nosačima aktivnih supstanci. Četvrti deo uvoda konkretnije se bavi nanoemulzijama, njihovim svojstvima, metodama izrade, teorijom nanoemulzifikacije i mehanizmima stabilizacije ovih koloidnih sistema. Poseban segment u ovom delu uvoda posvećen je savremenim nalazima međupovršinskih svojstava nanoemulzija, u kontekstu doprinosa njihovoj stabilnosti. Ovaj element u uvodu je od posebnog značaja jer do sada nije detaljnije razmatran i tumačen. Peti deo uvoda detaljno se bavi metodama karakterizacije nanoemulzija – *in chemico* i *in vitro*: procena veličine, oblika, morfoloških karakteristika i površinskog naelektrisanja kapi, karakteristika međupovršinskog sloja, ispitivanje kinetike oslobađanja aktivne supstance iz nanoemulzije kao i određivanje interakcija nanoemulzije sa biološkim sistemima. Imajući u vidu kompleksnost nanosistema i izazove koji se sreću u njihovoj karakterizaciji, uz značajnu heterogenost u načinima sprovođenja merenja i interpretacije rezultata, dat je osvrt na aktuelne preporuke i protokole za sprovođenje ispitivanja, uz analizu prednosti i nedostataka najčešće korišćenih metoda karakterizacije. Šesti deo uvoda posvećen je pregledu stanja na tržištu farmaceutskih preparata koji su po tipu nanoemulzije, a namenjeni su lokalnoj primeni. Sedmi deo uvoda posvećen je teorijskim aspektima primene lekova putem kože, te metodama za poboljšanje dermalne raspoloživosti lekovitih supstanci – primenom hemijskih pojačivača penetracije ili fizičkih metoda za poboljšanje dermalne raspoloživosti, sa posebnim osvrtom na jontoforezu (primenu električne energije). Poslednji, osmi deo uvoda, posvećen je kurkuminu – model aktivnoj supstanci i njegovim fizičko-hemijskim i biološkim svojstvima. Literaturni navodi u uvodu su savremeni i potvrđuju aktuelnost teme ove doktorske disertacije.

Ciljevi istraživanja su jasno i precizno definisani. Sveukupni cilj istraživanja ove doktorske disertacije je razvoj niskoenergetskih nanoemulzija za unapređenu dermalnu isporuku kurkumina, uz razumevanje kompleksnih interakcija koji su u osnovi nastanka ovih koloidnih sistema, a koje do sada nisu u potpunosti istražene. Takođe, cilj je i da se performanse kurkumina, kao bioaktivne molekule sa nizom potencijalno povoljnih efekata, maksimizuju kroz njegovo inkorporiranje u pažljivo dizajniran nosač (nanoemulziju). Uporedo sa tim, cilj je i razmatranje određenih aspekata fizičkih i hemijskih modaliteta za poboljšanje isporuke aktivnih supstanci u/kroz kožu, sa idejom da se dizajnira prototip inovativnog adhezivnog flastera za dermalnu primenu koji će biti baziran na kombinaciji primene električne energije, kao fizičke metode za poboljšanje dermalne isporuke, i nanoemulzija, kao unapređenih nosača sa nanostrukturom. Aktivnosti usmerene ka ostvarivanju navedenih ciljeva organizovane su u 4 faze eksperimentalnog rada.

Eksperimentalni deo doktorske disertacije sadrži detaljno opisane materijale i metode korišćene u istraživačkom radu (preformulaciona istraživanja, izrada nanoemulzija, opsežna fizičko-hemijska, biofarmaceutska i biološka karakterizacija). Eksperimentalni rad sproveden je kroz četiri faze.

U prvoj fazi eksperimentalnog rada detaljno su opisani svi segmenti preformulacionih istraživanja – ispitivanje rastvorljivosti kurkumina, ispitivanje faznog ponašanja (uz konstrukciju faznog dijagrama) u pseudoternarnom sistemu koji se sastoji iz triglicerida srednje dužina lanca – MCT (kao masne faze), polisorbata 80 - P80, i lecitina soje - Le (u odnosu 9:1, kao stabilizatora), i visokoprečišćene vode (kao vodene faze). Pored detaljnog opisa postupka izrade nanoemulzija spontanoemulgujućim postupkom, dat je vrlo detaljan opis uređaja i postupaka fizičko-hemijske karakterizacija odabranih formulacija: ispitivanje veličine i distribucije veličina kapi (foton korelaciona spektroskopija, laserska difrakcija), površinskog naelektrisanja (kroz određivanje zeta potencijala), morfologije kapi (mikroskopija atomskih sila - AFM), pH vrednosti, električne provodljivosti, viskoziteta i termalnog ponašanja (diferencijalna skenirajuća kalorimetrija - DSC), ispitivanje dinamike međupovršinskog sloja (elektron paramagnetna rezonantna (EPR) spektroskopija). Poseban segment prve faze istraživanja posvećen je i razumevanju tranzitornih struktura koje nastaju tokom izrade nanoemulzija spontanoemulgujućim postupkom, čija ispitivanja su takođe opisana (primenom polarizacione i mikroskopije atomskih sila) i tumačena u kontekstu savremenih teorija stabilizacije nanoemulzija. Nakon kratkoročne studije stabilnosti, eksperimentalni segmenti prve faze istraživanja obuhvatili su i određivanje kapaciteta za solubilizaciju kurkumina u odabranoj formulaciji, te sprovođenje istog seta fizičko-hemijskih ispitivanja koje su sprovedene i na placebo nanoemulzijama, uz određivanje lokalizacije aktivne supstance u formulaciji (primenom EPR spektroskopije).

U drugoju fazi eksperimentalnog rada opisan je postupak modifikacije formulacija dodatkom hemijskih pojačivača penetracije u masnu fazu nanoemulzija (monoterpena 1,8-cineola/eukaliptola ili pinena), uz procenu efekta promene u sastavu formulacije na fizičko-hemijske karakteristike nanoemulzija (veličina i distribucija veličina kapi, površinsko naelektrisanje, morfologija kapi, pH vrednost, električne provodljivost, viskozitet, termalno ponašanje, dinamika/fluidnost međupovršinskog sloja). Sa ciljem uspostavljanja relevantne korelacije između formulacionih parametara i fizičko-hemijskih svojstava od značaja, uz određivanje viskoziteta, u ovom segmentu je opisana i metoda određivanja gustine masne faze - triglicerida, srednje dužine lanca (samostalno), odnosno njihova kombinacija sa 1,8 cineolom (1:1) ili pinenom (1:1). Dodatno, procenjen je i uticaj solubilizacije kurkumina u formulacijama sa hemijskim pojačivačima penetracije na njihove fizičko-hemijske karakteristike (primenom već navedenih metoda). U poslednjem segmentu druge faze eksperimentalnog rada opisan je i postupak određivanja dugoročne stabilnosti odabranih nanoemulzija (tokom godinu dana, na sobnoj temperaturi i zaštićeno od direktnog izvora svetlosti), praćenjem veličine i distribucije veličina kapi, zeta potencijala i pH vrednosti, kao i sadržaja kurkumina u nekoliko vremenskih tačaka (inicijalno – nakon 24 h od izrade, zatim nakon 1 meseca, 6 meseci i godinu dana).

Fokus treće faze eksperimentalnog rada usmeren je ka određenim aspektima biofarmaceutске procene (ispitivanje *in vitro* oslobađanja kurkumina iz nanoemulzija), te *in vitro* proceni bezbednosti i bioloških efekata odabranih nanoemulzija. Kako je oslobađanje aktivne supstance iz formulacije važan preduslov za ostvarivanje efekata, detaljno je opisan postupak *in vitro* ispitivanja oslobađanja kurkumina iz nanoemulzija primenom vertikalnih difuzionih (Franz-ovih) ćelija. U nastavku, sa ciljem procene određenih bioloških efekata kurkumina *per se* i iz formulacija, opisani su postupci određivanja antioksidativnog potencijala primenom DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) i FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) testova, kao i procena antioksidativnog potencijala primenom EPR spektroskopije. Primena *in vitro* metodologija u preliminarnoj proceni bezbednosti, a zatim i efikasnosti nanosistema predstavlja

vrlo važan segment karakterizacije, čineći prekretnicu u daljem toku istraživanja. Kako bi se procenio bezbednosni profil izrađenih nanoemulzija, najpre je sproveden COMET test na ćelijama cele humane periferne krvi (u cilju procene genotoksičnog efekta), a nakon toga i procena citotoksičnosti kroz MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromid) test na nekoliko ćelijskih linija (ćelije humanog cervikalnog karcinoma – HeLa; ćelije humanog melanoma – Fem-X; normalni humani fibroblasti pluća – MRC-5; normalni humani keratinociti – HaCaT). U nastavku, primenom istih metodologija, odabrane formulacije sa kurkuminom podvrgnute su proceni efikasnosti ostvarivanja određenih bioloških efekata, za koje postoje literaturni navodi. Sprovedena je i analiza ćelijskog ciklusa HeLa i Fem-X ćelija nakon tretmana kurkuminom iz rastvora, nanoemulzijom sa kurkuminom, odnosno placebo nanoemulzijom. Na samom kraju ove faze, procenjena je bezbednost placebo formulacija u *in vivo* studiji procene iritacionog potencijala, praćenjem efekta formulacija na odabrane biofizičke parametre kože: transepidermalni gubitak vode (engl. *transepidermal water loss* – *TEWL*), eritema indeks (engl. *erythema index* - *EI*) i stepen hidratisanosti *stratum corneum*-a (vlažnost *stratum corneum*-a, engl. *stratum corneum hydration* - *SCH*).

Četvrta faze eksperimentalnog rada, jednim delom, posvećena je razvoju dermalnog adhezivnog sistema za isporuku aktivne supstance u kožu primenom jontoforeze. Za tu namenu, korišćene su adhezivne elektrode i izvori napajanja od 9 V i 32 V, dok je protok struje kontrolisan programom koji je napisan u *Arduino 1.18.11* razvojnom okruženju. Kako bi se uspostavio adekvatan protokol za sprovođenje samog postupka jontoforeze, na početku su varirani uslovi u pogledu napona izvora struje, i dužine trajanja jontoforeze, odnosno primene kontinuiranog ili intermitentnog protoka električne energije kroz kožu. Nakon sprovedene *in vivo* studije procene iritacionog potencijala, protokoli koji nisu ispoljili neželjene efekte na koži ispitanika, odabrani su za dalji rad.

U nastavku poslednje faze eksperimentalnog rada, sprovedena je *in vivo* procena penetracije kurkumina primenom *tape stripping* metode, i analiziran je i upoređen efekat hemijskih pojačivača penetracije (1,8-cineola ili pinena), odnosno jontoforeze kao fizičke metode za poboljšanje dermalne raspoloživosti kurkumina.

Sve metode i protokoli koji su korišćeni u eksperimentalnom radu ove doktorske disertacije su u skladu sa savremenim zahtevima naučnoistraživačkog rada u ovoj oblasti, i sprovedeni su prema aktuelno važećim preporukama, odnosno standardnim operativnim procedurama (za one metode za koje ove procedure postoje). Primenjene metode i protokoli su omogućili dobijanje objektivnih i pouzdanih rezultata na osnovu kojih je bilo moguće doneti adekvatne naučne zaključke.

Sva ispitivanja na humanim dobrovoljcima sprovedena su u skladu sa Helsinškom deklaracijom, primenom protokola odobrenog od strane Etičkog komiteta za biomedicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta.

Rezultati i diskusija su prikazani na 39 stranica teksta, i sadrže 44 slike i 14 tabela, prateći prethodno opisane faze eksperimentalnog rada. Rezultati su tumačeni na razumljiv i adekvatan način, i diskutovani u svetlu savremenih nalaza drugih autora koji se bave ovom oblašću. Takođe, kandidat je izneo i svoja tumačenja dobijenih rezultata, proširujući nalaze istraživanja u oblasti formulacije nanoemulzija i dermalne primene lekova.

U poglavlju **Zaključak**, u skladu sa rezultatima dobijenim u svim fazama istraživanja, navedeni su najznačajniji zaključci svake od četiri eksperimentalne celine. Takođe, naveden je i opšti zaključak, uz osvrt na moguća buduća istraživanja.

U poglavlju **Literatura** navedene su 232 reference, citirane Harvardskim stilom.

2. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

U skladu sa eksperimentalnim planom, rezultati ove doktorske disertacije podeljeni su u četiri celine, i tako su izneti i tumačeni.

Kao **rezultat prve faze eksperimentalnog rada**, nakon selekcije ekscipijenasa, primenom spontanoemulgujućeg postupka kao niskoenergetske metode izrade, pripremljene su nanoemulzije sa trigliceridima srednje dužine lanca kao masnom fazom, smešom polisorbata 80 i lecitina soje u odnosu 9:1 kao stabilizatorima, i visokoprečišćenom vodom kao vodenom fazom. Kroz set eksperimenata, rasvetljeni su neki od fundamentalnih aspekata odgovornih za nastanak nanoemulzija kroz niskoenergetski postupak izrade. Pokazano je da, sa odabranim ekscipijensima i njihovim konkretnim udelima, na samom kontaktu masne i vodene faze, usled infiltracije smeše masne faze i stabilizatora u vodenu fazu, dolazi do stvaranja visokoviskozne lamelarne tečnokristalne strukture, koja se daljim mešanjem transformiše i „otkida“, dajući dispergovane kapljice ulja stabilisane slojem emulgatora.

Praćenjem faznog ponašanja u sistemu sa 10% *m/m* masne faze, pokazano je da nanoemulzije izrađene spontanoemulgujućim postupkom mogu nastati u uskom opsegu masenih odnosa smeše surfaktanata i masne faze (engl. *surfactant-to-oil-ratio* – SOR) - od 0,7 do 1,5. Tako izrađene nanoemulzije imale su prosečan hidrodinamički dijametar kapi u opsegu od 105 nm do 167 nm, uz relativno usku distribuciju veličina kapi (indeks polidisperznosti <0,2). Apsolutna vrednost zeta potencijala bila je iznad 30 mV (ukazujući na dobru dugoročnu stabilnost), a pH vrednost u opsegu od 4,35 do 4,86. Pokazano je da veličina kapi opada sa porastom SOR, pri čemu, kada je $SOR \geq 1$, uz smanjenje veličina kapi, dolazi i do značajnog povećanja distribucije veličina, usled stvaranja većeg broja frakcija kapi malih dimenzija.

Smanjenje veličina kapi sa porastom SOR značajnije je do momenta dostizanja $SOR=1$. Nakon toga, usled zasićenja međupovršinskog sloja i specifičnog molekularnog uređenja stabilizatora na zakrivljenim nanopovršinama, daljim povećanjem SOR ne dobija se podjednako značajan efekat na smanjenje veličine kapi. Dobijeni rezultati idu u prilog savremenim analizama međupovršinskih slojeva nanoemulzija sa jonskim stabilizatorima, koji ukazuju na razlike u molekularnom uređenju amfifila na zakrivljenim nanopovršinama u odnosu na planarne sisteme. Dodatno, ovim rezultatima, zaključci o uređenju međupovršinskog sloja nanoemulzija prošireni su i na sisteme koji sadrže kombinaciju jonskih i nejonskih surfaktanata.

Uzimajući u obzir rezultate fizičko-hemijskih ispitivanja i procenjenu kratkoročnu fizičku stabilnost nanoemulzija, za solubilizaciju kurkumina odabrana je formulacija pri $SOR=1$ i 10% *m/m* masne faze (F1). Veličina, oblik i morfologija dispergovanih kapi analizirani su primenom AFM-a, i vizuelizovane su sferoidne kapljice neravnih površina, čije dimenzije su bile u skladu sa nalazima dobijenim primenom drugih metoda. Ovakav izgled dispergovane faze upravo ide u prilog teoriji da se tokom nanoemulzifikacije kroz spontanoemulgujući postupak dešava „otkidanje“ porcija masne faze vođenih molekulima amfifila. S obzirom na tip odabranih stabilizatora i formiranje tečnih kristala na kontaktnoj površini, može se pretpostaviti da je

međupovršinski sloj rigidan, što je u saglasju sa nalazima da dispergovane kapljice nemaju oblik idealne sfere.

Maksimalan kapacitet solubilizacije kurkumina u formulaciji F1 je 3 mg/ml. Solubilizacija kurkumina dovela je do povećanja veličine kapi (porast prosečnog hidrodinamičkog dijametra kapi sa 101 nm na 127 nm) i pH vrednosti (sa 4,86 na 5,80), i dalje ostajući u domenu pH vrednosti koje pogoduju hemijskoj stabilnosti kurkumina. Nisu utvrđene značajnije promene vrednosti viskoziteta ispitivanih formulacija. Primenom AFM-a i ovde je utvrđeno postojanje sferoidnih kapljica, ali, slično kao i kod placebo nanoemulzija, uočen je znatan udeo malih kapi, dimenzija ispod 100 nm, što se nije bilo moguće otkriti primenom uobičajeno korišćenih metoda za analizu veličine dispergovanih kapi (foton korelaciona spektroskopija), čime je istaknuta važnost primene komplementarnih tehnika u analizi fizičko-hemijskih svojstava formulacije u cilju dobijanja pouzdanih rezultata.

Praćenjem fluidnosti međupovršinskog sloja primenom EPR spektroskopije, i određivanje rotacionog korelacionog vremena (τ_R), potvrđeno je da je međupovršina izrađenih nanoemulzija vrlo rigidna, ali da se razlikuju dva regiona – tzv. region „bržeg kretanja“ ($\tau_{R1}=4,9$ ns, dominantno prisutni molekuli polisorbata 80) i tzv. region „sporijeg kretanja“ ($\tau_{R2}=12,8$ ns, prisutni i molekuli lecitina i polisorbata), čija zastupljenost približno odgovara udelima surfaktanata u formulaciji. Nakon solubilizacije, kurkumin utiče na molekularno uređenje međupovršinskog sloja, što se posebno moglo uočiti regionu „sporijeg kretanja“, raspoređujući se na međupovršini, bliže regionu lipofilnih repova surfaktanata. Ovakva lokalizacija aktivne molekule čini je dostupnijom za isporuku i ispoljavanje efekata.

U **drugom delu eksperimentalnog rada** uspešno su izrađene formulacije sa hemijskim pojačivačima penetracije (polovina masne faze zamenjena je 1,8-cineolom, odnosno pinenom). Dodatak monoterpena doveo je do značajnog smanjenja hidrodinamičkog prečnika dispergovanih kapi (promena sa 101 nm na 41 nm za formulaciju sa 1,8-cineolom - F1_EUC, odnosno na 62 nm za formulaciju sa pinenom - F1_PIN). Dobijeni rezultati ukazali su na kostabilišući efekat monoterpena, koji je pokazan i primenom EPR spektroskopije – detektovano je njihovo prisustvo na međupovršinskom sloju nanoemulzija. I u ovom slučaju su uočene 2 mikrosredine, sa vrednostima $\tau_{R1}=5,7\pm 0,3$ ns i $\tau_{R2}=14,4\pm 0,3$ ns za F1_EUC, odnosno $\tau_{R1}=4,3\pm 0,5$ ns i $\tau_{R2}=13,8\pm 0,3$ ns za F1_PIN. Dodatno, na mikrografijama AFM-a uočeno je postojanje dispergovanih kapljica pravilnog sfernog oblika i glatkih površina, što je takođe uticalo na zaključak da monoterpeni imaju određeni efekat na međupovršinskom sloju. Kao finalni dokaz njihovih kostabilišućih svojstava, može se navesti i nalaz da je za stabilizaciju nanoemulzija u prisustvu monoterpena bila dovoljna znatno niža koncentracija surfaktanata (minimalna vrednost SOR pri 10% *m/m* masne faze bila je 0,3; za razliku od situacije kada su samo MCT bili deo masne faze, kada je minimalna vrednost potrebnog SOR-a bila 0,7).

Interesantno je da solubilizacija kurkumina u koncentraciji 3 mg/ml nije dovela do promena u veličini dispergovanih kapi, što je verovatno posledica kompleksnih interakcija na međupovršini. I u nanoemulzijama sa monoterpenima kurkumin se rasporedio na međupovršinskom sloju, verovatno bliže nepolarnim regionima surfaktanata, što je zaključeno na osnovu EPR spektroskopije ($\tau_{R1}=8,5\pm 0,2$ ns i $\tau_{R2}=13,4\pm 0,5$ ns za F1_EUC_CU_3, odnosno $\tau_{R1}=5,9\pm 0,4$ ns i $\tau_{R2}=13,2\pm 0,2$ ns za F1_PIN_CU_3).

Tokom praćenja dugoročne fizičke stabilnosti placebo i formulacija sa kurkuminom, tokom godinu dana, sve nanoemulzije su bile nepromenjenih reoloških svojstava (niskoviskozne

njutnovske tečnosti), bez znakova razdvajanja faza ili taloženja kurkumina. Praćenjem hidrodinamičkog dijametara kapi, u većini slučajeva dolazi samo do značajnijeg porasta u veličini kapi u drugoj vremenskoj tački (nakon meseca dana od izrade), što se može dovesti u vezu sa konsolidacijom sistema u toku prvih nedelja od izrade. Jedino formulacija F1_PIN pokazuje značajniju promenu u veličini dispergovanih kapi tokom vremena. Sa druge strane, značajne promene u veličini kapi tokom vremena se ne dešavaju kod formulacije F1_PIN_CU_3, što može biti posledica prisustva kurkumina na međupovršini, koji, uprkos svojoj hidrofobnosti, ima mogućnost stvaranja vodoničnih veza sa vodom na međupovršinskom sloju. Stvaranjem sloja blago orijentisanih molekula vode na međupovršini, sprečena je koalescencija kapi.

Polidisperzni indeks, kao mera distribucije veličina, zeta potencijal, kao mera površinskog naelektrisanja, i pH vrednost imali su stabilne i ujednačene vrednosti tokom čitavog perioda praćenja.

Tokom godinu dana nije došlo ni do značajnog pada u sadržaju kurkumina u formulacijama (sadržaj je uvek bio u opsegu 2,9-3,5 mg/ml).

Rezultati **treće faze eksperimentalnog rada** nedvosmisleno su ukazali na podobnost izrađenih formulacija za isporuku kurkumina i ostvarivanje određenih biološki važnih efekata, ali uz određene međusobne razlike. *In vitro* ispitivanje brzine oslobađanja kurkumina iz formulacija primenom Franz-ovih difuzionih ćelija pokazalo je da se oslobađanje kurkumina iz sve tri odabrane nanoemulzije može najbolje opisati Higuchi modelom. Uočene su znatne razlike u brzini oslobađanja kurkumina iz formulacija sa monoterpenima (F1_EUC_CU_3: $115,06 \pm 3,20$ mg/cm²·h; F1_PIN_CU_3: $108,08 \pm 1,94$ mg/cm²·h) u odnosu na F1_CU_3 ($80,20 \pm 6,96$ mg/cm²·h). Kumulativne količine oslobođenog kurkumina nakon 6 h ispitivanje pratile su isti redosled: $212,33 \pm 2,51$ mg/cm² za F1_EUC_CU_3, $208,33 \pm 4,73$ mg/cm² za F1_PIN_CU_3, i $163,21 \pm 11,18$ mg/cm² za F1_CU_3.

Antioksidativna aktivnost kurkumina i nanoemulzija sa kurkuminom ispitana je kroz 3 različita testa. Primenom DPPH testa, efekti i kurkumina iz rastvora, ali i nanoemulzija sa kurkuminom bili su gotovo trenutni. Dobijene IC₅₀ vrednosti ukazale su na to da nema razlike u efektu između kurkumina (IC₅₀ = $0,1028 \pm 0,0056$ mg/ml) i njegovih formulacija (IC₅₀ = $0,0994 \pm 0,0051$ mg/ml za F1_CU_3, IC₅₀ = $0,0929 \pm 0,0044$ mg/ml za F1_EUC_CU_3 i IC₅₀ = $0,0979 \pm 0,0040$ mg/ml za F1_PIN_CU_3), te i da je aktivnost kurkumina u ovom testu vrlo bliska tokoferolu, njemu strukturno sličnom antioksidansu (IC₅₀ = $0,1106 \pm 0,0079$ mg/ml). U nastavku, FRAP test je pokazao i na značajnu aktivnost kurkumina u vodenoj sredini, što je od većeg značaja, imajući u vidu da tokom ovog testa ne dolazi do narušavanja strukture samog nosača. Takođe, ovaj test zasniva se na drugom antioksidativnom mehanizmu, čime je pokazao da kurkumin ostvaruje antioksidativni efekat i putem doniranja H⁺ jona, kao i putem transfera elektrona.

Na kraju, primenom EPR spektroskopije potvrđena je izrazita reaktivnost kurkumina u neutralizaciji slobodnog radikala, koja se dešava već u prvom minutu nakon kontakta. Praćenjem reakcije tokom 30 minuta, ukupan izračunati antioksidativni efekat kurkumina (u rastvoru) bio je oko 56 % (pri koncentraciji kurkumina 3 mg/ml). Antioksidativna aktivnost formulacija F1_CU_3, F1_EUC_CU_3 i F1_PIN_CU_3 bile su nešto niže (oko 47%, 55% i 49 %, respektivno), uz identičnu kinetiku reakcije sa rastvorom kurkumina – plato se dostigao već u prvim minutima reakcije. Uočen je i određeni efekat placebo formulacija na neutralizaciju slobodnog radikala – oko 5,7% za F1, čak 8% za F1_EUC, i 5,9% za F1_PIN. Ovakve performanse placebo formulacija su verovatno posledica antioksidativne aktivnosti stabilizatora

(lecitina pre svega), ali i poznatog antioksidativnog efekta monoterpena i etarskih ulja čiji su oni glavni konstituenti. Merenje antioksidativnog potencijala istom tehnikom nakon mesec dana, aktivnost kurkumina u etanolnom rastvoru opala je za više od 70%, dok je aktivnost formulacija ostala skoro nepromenjena. Dakle, inkapsulacija kurkumina u dizajnirane nanoemulzije nedvosmisleno je doprinela njegovoj dugoročnoj hemijskoj stabilnosti.

Na osnovu rezultata COMET testa, pokazano je odsustvo genotoksičnog potencijala nanoemulzija F1 i F1_CU_3. Takođe, formulacija sa kurkuminom imala je i izražen antigenotoksični potencijal – i preventivni i reparativni, čime je dokazana efikasnost nanoemulzija sa kurkuminom u zaštiti ćelija od oksidativnog stresa. U opsegu koncentracija kurkumina u nanoemulziji od 1 do 3 mg/ml, nije zabeležena koncentraciona zavisnost u efektima. Sa druge strane, donekle i očekivano, formulacije sa monoterpenima su pokazale genotoksični efekat.

Ispitivanje citotoksičnih efekata na ćelijskim kulturama primenom MTT testa pokazano je da formulacije F1 i F1_CU_3 ne utiču na vijabilnost humanih keratinocita, i to u vrlo širokom koncentracionom opsegu kurkumin (od 800 do 12,5 µg/ml) i odgovarajućim razblaženjima placebo formulacije, što je ukazalo na njihov odličan bezbednosni profil. To je posebno važno imajući u vidu da su keratinociti najbrojnije ćelije epidermisa, i stoga važne u kontekstu dermalne primene farmaceutskih preparata. U nastavku je pokazan i citotoksični efekat kurkumina i nanoemulzija sa kurkuminom prema maligno transformisanim ćelijama: Fem-X ($IC_{50}=71,17\pm 22,60$ za kurkumin iz rastvora, $IC_{50}=67,72\pm 0,48$ za F1_CU_3) i HeLa ($IC_{50}=15,03\pm 0,61$ za kurkumin iz rastvora, $IC_{50}=22,89\pm 2,09$ za F1_CU_3).

Na osnovu ispitivanja efekata kurkumina iz rastvora, nanoemulzija sa kurkuminom i odgovarajuće placebo nanoemulzije na ćelijski ciklus, pokazano je da se zastoj u ćelijskom ciklusu najčešće javljao u G2/M i subG1 fazama, dok je koncentraciona zavisnost pokazana je kod Fem-X ćelija. Zastoj u G2/M fazi ukazuje na uticaj uzorka na ćelijsku deobu, dok akumulacija u subG1 fazi može ukazivati na apoptozu ćelija.

Rezultati *in vivo* studije bezbednost ukazali su na dobar bezbednosni profil placebo nanoemulzija, bez ispoljavanja neželjenih reakcija na koži ispitanika. U odnosu na netretiranu kontrolu, nisu zabeležene značajne promene u vrednostima parametara EI, TEWL i SCH ni za jedan ispitivani uzorak.

Četvrta faza eksperimentalnog rada dala je značajne rezultate u pogledu primene jontoforeze kao fizičke metode za poboljšanje dermalne raspoloživosti aktivnih supstanci, uz poređenje sa efektima hemijskih pojačivača penetracije. Na osnovu je *in vivo* studije iritacionog potencijala pokazano je da primena izvora napajanja od 9 V u tri predložena protokola (kontinuirani protok struje tokom 15 minuta (15-0); diskontinuirani protok – 3 minuta sa pauzom 2 minuta (3-2, 5 ciklusa); diskontinuirani protok – 5 minuta sa pauzom 1 minut (5-1, 3 ciklusa)) ne dovodi do neželjenih promena na koži. Praćenjem parametara EI, TEWL i SCH, u odnosu na netretiranu kontrolu, kod protokola 3-2 uočeno je značajnije povećanje EI (pojava blagog i kratkotrajnog crvenila) i TEWL u prvoj vremenskoj tački 15 minuta po prekidu protoka struje kroz kožu), na test-mestima i za katodu i za anodu, dok je kod protokola 5-1 uočeno samo značajno povećanje EI u prvoj vremenskoj tački, i to samo na mestu za anodu. Međutim, sve vrednosti su se vraćale na bazalne veoma brzo, pa povećane vrednosti nisu zabeležene u drugim vremenskim tačkama (nakon 60 i 120 minuta). Kod protokola 15-0 nije bilo značajnih promena u ispitivanim

parametrima. Iz navedenih razloga, eksperimenti su sprovedeni prema sva tri protokola, u cilju provere njihove efikasnosti u dermalnoj isporuci kurkumina.

Tokom *in vivo* ispitivanja penetracije kurkumina kroz kožu iz formulacije F1_CU_3 uz primenu jontoforeze, nisu uočene značajne razlike među 3 predložena protokola u ukupnoj količini aktivne supstance koja je penetrirala kroz površinske slojeve kože po jedinici površine ($Q_{3-2}=7,04\pm 3,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; $Q_{5-1}=6,66\pm 2,11 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; $Q_{15-0}=6,96\pm 3,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Međutim, primena jontoforeze pokazala se značajno efikasnijom u isporuci kurkumina u odnosu na primenu formulacija sa hemijskim pojačivačima penetracije ($Q_{\text{euc}}=5,16\pm 0,60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; $Q_{\text{pin}}=4,55\pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Tokom procene uticaja dodatka hemijskih pojačivača penetracije, došlo se do donekle neočekivanih nalaza. Iako bi se na osnovu poznavanja efekata monoterpena moglo očekivati da su nanoemulzije sa hemijskim pojačivačima penetracije iz ove grupe apsolutno superiornije u dermalnoj isporuci kurkumina u odnosu na nanoemulziju bez monoterpena, pokazalo se da to nije slučaj. Sama rastvorljivost aktivne supstance u odabranim ekscipijensima i interakcija sa komponentama nanoemulzija pokazale su se kao presudne. U konkretnom slučaju, redosled formulacija prema efikasnosti dermalne isporuke bio je sledeći: F1_EUC_CU_3>F1_CU_3>F1_PIN_CU_3. Ovakav redosled korespondira sa rastvorljivijšu kurkumina u komponentama masne faze nanoemulzija.

Kroz prikazane eksperimente dokazano je da jontoforeza, pri predloženim uslovima, u kombinaciji sa naprednim nosačem sa nanostrukturom obezbeđuje efikasniju dermalnu isporuku kurkumina u poređenju sa formulacijama koje sadrže hemijske pojačivače penetracije. Dodatno, jontoforeza nudi brojne mogućnosti za dalja istraživanja, uz variranje napona i vremena ekspozicije kože protoku električne energije.

3. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA DISERTACIJE SA PODACIMA IZ LITERATURE

Veliki broj aktivnih supstanci poseduje takva fizičko-hemijska i biološka svojstva koja umnogome otežavaju njihovu primenu, uprkos potencijalu za ispoljavanje farmakoloških efekata. Jednim delom to se ogleda u veoma niskoj rastvorljivosti tih molekula kako u vodi, tako i u uljima i organskim rastvaračima, što posledično dovodi i do slabe penetracije kroz biološke membrane. Veoma često podležu brzom i intenzivnom metabolizmu u organizmu, poseduju nedovoljnu specifičnost, a neretko su podložne i hemijskoj degradaciji pod uticajem faktora sredine. Kako je generalni cilj razvoja farmaceutskih oblika lekova da se pacijentima obezbedi odgovarajuća doza/koncentracija lekovite supstance, uz targetiranje željenih organa i tkiva, sa optimalnim odnosom očekivane koristi i bezbednosnog profila, neophodno je iskoristiti i značajno proširiti postojeća znanja u oblasti razvoja nosača/sistema za isporuku lekovitih supstanci, što je praćeno izraženim interesovanjem za nanotehnološki pristup u dizajniranju nosača za aktivne supstance, te značajnim ulaganjima u ovoj oblasti (Bissou i Leroux, 2020; Bosetti i Jones, 2019). U tom smislu, ova doktorska disertacija daje značajan doprinos u kontekstu dermalne isporuke aktivnih supstanci zahtevnih fizičko-hemijskih karakteristika (koristeći kurkumin kao model aktivnu supstancu), i to kroz istraživanje nanoemulzija kao predstavnika naprednih nanonosača.

Iako su u naučnoj javnosti pred nanosisteme postavljena visoka očekivanja, neke inicijalno postavljene hipoteze, nisu se u potpunosti potvrdile u realnoj kliničkoj primeni, uprkos

intenzivnim istraživanjima (Mitragotri i sar, 2017; Dahnier, 2016; Wilhelm i sar, 2016). Međutim, neosporno je da nanosistemi doprinose stabilnosti, utiču na rastvorljivost i preuzimanje aktivnih supstanci od strane ćelija, efikasniji su u prevazilaženju bioloških barijera, povećavajući time bioraspoloživost uz smanjenje sistemskih neželjenih efekata. Dodatno, nanosistemi nude značajne mogućnosti u dijagnostici i regenerativnoj medicini (Weltring i sar, 2016; Onoue i sar, 2014; Bamrungsap i sar, 2012). Takođe, smatra se da nanotehnologija pripada „ključnim tehnologijama“ (engl. *key enabling technologies* – KET) koje se se mogu prevesti u inovativne medicinske proizvode tako da odgovore brojnim zdravstvenim izazovima (Gouze i Bosseau, 2013).

U pogledu razvoja nanosistema koji se primenjuju u farmaciji, svedočimo postojanju i neprekidnom razvoju različitih struktura: liposomi, micle, nanočestice, nanoemulzije, mikroemulzije, i dr. (Wagner i sar, 2008). Upravo nanoemulzije predstavljaju sisteme koji su interesantni kako sa fundamentalnog, tako i sa aspekta njihove moguće iskoristljivosti kao multifunkcionalnih koloida (Solans i sar, 2005). Istorijski gledano, o nanoemulzijama postoji mnogo akumuliranog znanja. Ipak, nauka o koloidima u ovom konkretnom segmentu ima još neistraženih polja, a kroz literaturu se retko može naići na sveobuhvatni pristup koji povezuje njihove fundamentalne aspekte sa osobinama koje iz toga proističu (Gupta, 2020). Značajan istraživački interes usmeren je na razumevanje i rasvetljavanje fundamentalnih aspekata niskoenergetske nanoemulzifikacije (Anton i Vandamme, 2009). Određeni segmenti ove doktorske disertacije upravo su posvećeni razjašnjenju mehanizma niskoenergetske nanoemulzifikacije i istraživanju tranzitornih struktura koje nastaju u tom postupku, dajući nedvosmisleni naučni doprinos u domenu istraživanja mehanizama uključenih u nastanak i obezbeđivanje stabilnosti nanoemulzija.

Tokom izrade formulacija primenom spontanoemulgujućeg postupka, razmatrajući kontakt smeše surfaktanata i masne faze sa vodom, uočeno je da trenutno dolazi do stvaranja vrlo viskozne „granične“ strukture, koja egzistira određeno (kraće) vreme, ali se tokom mešanja disperguje i finalno „rastvori“ u vodenoj fazi. Određeni literaturni izvori predlažu da pri ovom kontaktu mogu nastati bikontinualne mikroemulzije, ili, alternativno, tečnokristalne strukture (Komaiko i McClements, 2016; Komaiko i McClements, 2014). Ove tranzicione strukture oskudno su opisane u literaturi, a njihova analiza je od velikog značaja u proceni i tumačenju dinamike međupovršinskog sloja nanoemulzija, što se u velikoj meri odražava i na koloidnu stabilnost, ali i na kasniju isporuku solubilizovane aktivne molekule. Moguće interakcije na dodirnoj površini (koje su odgovorne za sam proces emulzifikacije) i dalje su, barem u nekim segmentima, predmet diskusije. Kroz rezultate ovog istraživanja, nakon simulacije kontakta ulje-surfaktanti-vodena faza na mikroskopskoj pločici, ukazano je na stvaranje tečnokristalne strukture kao tranzitorne faze koja se brzo širi, a zatim gubi nakon nekog vremena. Detaljniji uvid u ove prelazne faze dat je primenom AFM i polarizacione mikroskopije, koje su pokazale da tokom nanoemulzifikacije nastaju „cevaste“ strukture koje su posledica infiltracije smeše masne faze i surfaktanata u vodenu fazu. Ovi nalazi u skladu su sa predloženim mehanizmom spontanoemulgujućeg postupka, koji navodi da se na kontaktnoj površini surfaktanti-ulje-voda formiraju prolazne mijeloidne strukture, koje, u stvari, predstavljaju dugačke „cevi“ lamelarnih tečnih kristala. Nakon bubrenja u vodi, oni na kraju „eksplodiraju“ u uljane kapljice oivičene slojem surfaktanata (Lopez-Montilla i sar, 2002; Buchanan i sar, 2000). Prisustvo anizotropije nije detektovano kada su izrađene nanoemulzije bile podvrgnute polarizacionoj mikroskopiji, što potvrđuje da je tečnokristalna struktura zaista samo prolazna faza u postupku nanoemulzifikacije

kroz spontanoemulgujući postupak. Rigidnost međupovršinskog sloja koji se formira nakon nanoemulzifikacije primenom spontanoemulgujućeg postupka i pri odabranim ekscipijensima utvrđen je primenom EPR spektroskopije. Jasno je navedeno da je spontanoemulgujući postupak prilično kompleksan i vođen različitim mehanizmima koji ovise o tipu i fizičko-hemijskim svojstvima odabranih komponenata.

Prva empirijska razmatranja stabilnosti tečnih disperzija, značaja međupovršinskog sloja i ravnoteže interakcija koje se dešavaju na granici faza desila su se još na samom početku 20. veka, međutim, do danas nije uspostavljena suštinska korelacija između informacija o strukturnim karakteristikama međupovršine kapi nanoemulzija i stabilnosti sistema, a još manje se zna o vezi strukture i funkcije pri odabiru surfaktanata za formulaciju određene nanoemulzije (Hensel i sar, 2017). Zapravo, tek su istraživanja u poslednjih desetak godina pokazala da se međupovršinski sloj nanokapi može sagledati sa molekularnom preciznošću, što je promenilo tradicionalna razmatranja molekularnog uređenja na međupovršini (De Aguiar i sar, 2011). Upravo ovi segmenti su detaljno elaborirani u ovoj doktorskoj disertaciji. Praćenjem efekta koncentracije surfaktanata na veličinu kapi izrađenih nanoemulzija, ukazano je na razlike u molekularnom uređenju amfifila na zakrivljenim nanopovršinama u odnosu na ono što je tradicionalno očekivano. Dobijeni rezultati idu u prilog savremenim teorijama o uređenju međupovršinskog sloja nanoemulzija (stabilisanih jonskim surfaktantima), i prošireni su i na sisteme koji sadrže kombinaciju jonskih i nejonskih surfaktanata. Važno je istaći da se primenom savremenih metoda istraživanja međupovršinskog sloja nanoemulzija, koja su omogućila analizu na molekularnom nivou (npr. primenom spektroskopije rasejanja sume vibracionih frekvencija) bavi vrlo mali broj istraživačkih grupa u svetu, što potvrđuje značaj i aktuelnost rezultata ove doktorske disertacije.

Dodatno, tokom fizičko-hemijske karakterizacije nanoemulzija, praćene su savremen preporuke, posebno u domenu procene veličina kapi nanoemulzija, kroz. tzv „stepeničasti pristup“ (engl. *a three-step-approach*) (Caputo i sar, 2019). Takođe, ukazano je na prednosti i nedostatke primenjenih metoda. Ovako sveobuhvatna karakterizacija omogućila je adekvatna tumačenja rezultata uz donošenje relevantnih zaključaka.

Kako bi se izradile formulacije za unapređenu dermalnu isporuku kurkumina kroz kožu, u okviru prikazanog istraživanja, pripremljene su nanoemulzije sa monoterpenima kao hemijskim pojačivačima penetracije, a kasnije je ispitana i mogućnost primene jontoforeze, kao fizičke metode za poboljšanje dermalne raspoloživosti. U skladu sa literaturnim podacima postoje različiti pristupi za poboljšanje dermalne raspoloživosti, i sve metode mogu se podeliti na pasivne (među kojima se navodi i dizajniranje nanonosaa ili primena hemijskih pojačivača penetracije) (Lane, 2013; Gupta i sar, 2019) i aktivne (npr. primena električne energije) (Gratieri i Kalia, 2017).

Interesantan nalaz ove doktorske disertacije jeste da je pokazan efekat monoterpena kao kostabilizatora – njihov dodatak doveo je do smanjenja veličine kapi nanoemulzija i potrebom za nižim koncentracijama primenjenih surfaktanta, a primenom EPR spektroskopije dokazano je i njihovo participiranje na međupovršinskom sloju. Jednim delom, slična zapažanja imali su i Zänker i sar. (1980), i to nakon tenziometrijskih merenja. Ovaj segment istraživanja nudi određeni doprinos u domenu procene uticaja različitih ekscipijenasa koloidnoj stabilnosti formulacija.

Uporedo sa fizičko-hemijskom karakterizacijom, biološka karakterizacija nanosistema je *conditio sine qua non* savremenih istraživanja, i podrazumeva *in vitro* ispitivanja prvenstveno bezbednosti, ali i efikasnosti (primenom odabranih ćelijskih linija), dovodeći u vezu fizičko-hemijske osobine sa bio-nano interakcijama. I u ovom domenu, ova doktorska disertacija je ispunila očekivanja. Primenom standardnog testa citotoksičnosti (MTT), kao i procenom genotoksičnog efekta formulacija (kroz COMET test), pokazana je visoka bezbednost formulacija bez hemijskih pojačivača penetracije, kao i efikasnost u zaštiti ćelija od oksidativnog stresa, odnosno citotoksični efekat prema maligno transformisanim ćelijama (HeLa, Fem-X).

Na osnovu rezultata COMET testa, poredeći efekat placebo formulacije bez hemijskih pojačivača penetracije (F1) sa PBS-om kao negativnom kontrolom, evidentno je da nanoemulzija nije izazvala oštećenja na DNK humanih ćelija periferne krvi. Slično, i formulacije sa kurkuminom pokazale su odsustvo genotoksičnog efekta, iako je stepen oštećenja DNK bio nešto izraženiji (ali ne statistički značajno) u poređenju sa placebo formulacijom i PBS-om. Čak i su i formulacije sa kurkuminom pokazale uporedive rezultate, bez uočenog koncentraciono-zavisnog trenda. Iako određene studije navode da kurkumin može ispoljiti genotoksične efekte na ćelije (Sebastia i sar, 2012), ovde to nije pokazano. Sa druge strane, formulacije sa monoterpenima izazvale su značajna oštećenja genetskog materijala. Ovakav rezultat ne treba da bude iznenađujući, s obzirom na to da su geno- i citotoksični efekti monoterpena poznati, posebno kada se primenjuju u višim koncentracijama (Nikolić i sar, 2015). U nastavku, primenom istog testa, je ispitan i pokazan značajan antigenotoksični efekat formulacija sa kurkuminom, što je verovatno posledica direktnog antioksidativnog efekta, ali i stimulacije enzima antioksidativne zaštite ćelija (Banajeree i sar, 2008). Slični rezultati već su pokazani i za neka druga polifenolna jedinjenja (Ghanema i sar, 2012). Interesantno je prokomentarisati i da je i placebo formulacija pokazala određenu efikasnost, što se može dovesti u vezu sa antioksidativnim svojstvima lecitina (Pan i sar, 2013), ali i mogućnošću i da same nanostrukture (micele, nanoemulzione kapi) *per se* imaju sposobnost „hvatanja“ prooksidativnih vrsta, sprečavajući ih da vrše dalja oštećenja (McClements i Dacker, 2000).

Ispitivanje citotoksičnih efekata na ćelijskim kulturama primenom MTT testa pokazano je da formulacije F1 i F1_CU_3 ne utiču na vijabilnost humanih keratinocita, i to u vrlo širokom koncentracionom opsegu kurkumin (od 800 do 12,5 µg/ml) i odgovarajućim razblaženjima placebo formulacije, što je ukazalo na njihov odličan bezbednosni profil. Ispitivanjem citotoksičnosti pokazana je efikasnost u ispoljavanju efekta nanoemulzija sa kurkuminom prema maligno transformisanim ćelijama, što je u skladu sa literarnim navodima (Sharam i sar, 2005).

Treba napomenuti i da literatura ne obiluje rezultatima koji se odnose na *in vitro* biološka ispitivanja nanoformulacija, te da je značajan istraživački interes usmeren upravo na unapređenje trenutno etabliranih protokola kako bi se prevazišle prepreke na koje se nailazi tokom ispitivanja nanosistema (Gioria i sar, 2018; Rischtić i sar, 2016). U okviru ove doktorske disertacije, izneti su određeni aspekti od značaja za ovu temu i dat doprinos u domenu postavki eksperimentalnih istraživanja i tumačenju dobijenih rezultata.

Ukupna količina inkorporirane lekovite supstance, zajedno sa procenom stepena inkapsulacije i kinetikom oslobađanja predstavljaju važne parametre za procenu efikasnosti, ali i bezbednosti nanonosaa (Coty i Vauthier, 2018), a za sveobuhvatno razumevanje i tumačenje bioloških

efekata i terapijske efikasnosti korisno je poznavati i raspodelu aktivne supstance unutar nanostrukture. Lokalizacija aktivne supstance odražava se na brzinu oslobađanja i na dostupnost za ostvarivanje terapijskih efekata, a može uticati i na hemijsku stabilnost molekula. (Mitsou i sar, 2018; Klang i Valenta, 2011). Rezultati eksperimenata prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji pokazali su da je kurkumin dominantno prisutan u međupovršinskom sloju, i to bliže nepolanim delovima stabilizatora. Ovakva lokalizacija aktivne molekule kasnije je dovedena u vezu sa brzim ostvarivanjem antioksidativnih efekata.

Jasno je da se na osnovu *in vitro* oslobađanja ne može doneti sud o bioraspoloživosti aktivne supstance nakon realne primene, ali ovaj vid ispitivanje može ukazati na određene razlike među formulacijama, odnosno efekat formulacionih i procesnih parametara na performanse proizvoda (USP, 2021; Shah i sar, 2015). Procena kinetike oslobađanja aktivne supstance iz razvijenog farmaceutskog oblika svakako je neophodan element sveobuhvatne karakterizacije i, logično, nameće se pre bilo kakvih *in vivo* procena. Dato ispitivanje u ovoj doktorskoj disertaciji sprovedeno je primenom vertikalnih difuzionih ćelija, pri *infinite dose* uslovima.

Imajući u vidu biološka svojstva kurkumina kao model aktivne supstance, ispitivanje antioksidativnog potencijala nanoemulzija u kojima je ona solubilizovan predstavlja značajan element u preliminarnoj proceni njihove biološke efikasnosti, ali i njihove podobnosti da očuvaju hemijsku stabilnost inkorporiranog kurkumina.

Kao što se i fizičko-hemijska karakterizacija nanoemulzija mora bazirati na čitavom setu metoda i tehnika, tako se ni zaključak o antioksidativnoj aktivnosti ne može izneti na osnovu samo jednog testa, posebno kada se imaju u vidu značajne razlike koje su u osnovi trenutno etabliranih metoda, te poteškoće u poređenju rezultata (Alam i sar, 2013). U ovom eksperimentalnom segmentu doktorske disertacije sprovedeni su DPPH i FRAP testovi, kao i procena stepena i kinetike antioksidativne aktivnosti primenom EPR spektroskopije. Iako je antioksidativna aktivnost kurkumina već poznata (Sharma, 2005; Jovanović i sar, 1999), nije čest slučaj da se u istraživanju sreće veći broj komplementarnih metoda koje za cilj imaju sveobuhvatnu analizu. Dodatno, rezultati ove doktorske disertacije ukazali su na pogodnost primene nanoemulzija kao nosača za ovu molekulu sklonu hemijskoj degradaciji pod uticajem faktora sredine, kao i da su efikasne u očuvanju negove hemijske stabilnosti. Dodatno, primenom EPR spektroskopije, utvrđen je i određeni antioksidativni potencijal samih placebo formulacija, što je verovatno posledica antioksidativne aktivnosti stabilizatora (lecitina pre svega) (Pan i sar, 2013), ali i poznatog antioksidativnog efekta monoterpena i etarskih ulja čiji su oni glavni konstituenti (Chabir i sar, 2011). Pan i sar. (2013) eksperimentalno su pokazali značajnu barijernu funkciju međupovršine nanoemulzija koje u svom sastavu imaju lecitin - u kontekstu zaštite solubilizovanih bioaktivnih jedinjenja od prodora oksidativnih vrsta. Ovakvi zaključci su potvrđeni i na ovom primeru, kada je merenje antioksidativnog potencijala ponovljeno nakon mesec dana. Antioksidativna aktivnost kurkumina u etanolnom rastvoru opala je za više od 70%, dok je aktivnost ispitivanih formulacija ostala skoro nepromenjena. Dakle, inkapsulacija kurkumina u dizajnirane nanoemulzije nedvosmisleno je doprinela njegovoj dugoročnoj hemijskoj stabilnosti.

Dobijeni rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji ukazali su na značaj odabira stabilizatora nanoemulzije – ne samo u kontekstu njihove sposobnosti da obezbede fizičku

stabilnost formulacije, već i na sposobnost sprečavanja oksidacionih procesa. To je posebno važno u slučaju kada inkapsulirani biomolekuli pokazuju izrazitu oksidativnu osetljivost. Do sada se pristup prevenciji neželjenih hemijskih promena uglavnom bazirao na dodavanju antioksidanasa u neku od faza nanoemulzije. Međutim, s obzirom na činjenicu da se većina procesa oksidacije dešava upravo na međupovršinskom sloju nanokapi (Lomova i sar, 2010; McClements i Dacker, 2000), prisustvo amfifila sa antioksidativnim svojstvima ima mnogo veći praktični značaj u očuvanju hemijske stabilnosti solubilizovane aktivne molekule (Pan i sar, 2013).

Konačno, u poslednjim segmentima istraživanja, razvijen je *custom made* adhezivni sistem za dermalnu isporuku kurkumina iz nanoemulzije, i to primenom jontoforeze, kao fizičke metode za poboljšanje dermalne isporuke aktivnih supstanci. Uspešno su ispitana 3 predložena protokola jontoforeze i pokazana je nedvosmislena superiornost primene jontoforeze nad hemijskim pojačivačima penetracije, čime je dat značajan doprinos istraživanju različitih modaliteta za poboljšanje dermalne isporuke aktivnih supstanci. Uprkos određenim ograničenjima na koje se naišlo tokom razvoja protokola, kroz prikazane eksperimente dokazano je da jontoforeza, pri predloženim uslovima, u kombinaciji sa naprednim nosačem sa nanostrukturom obezbeđuje efikasniju dermalnu isporuku kurkumina u poređenju sa formulacijama koje sadrže hemijske pojačivače penetracije, što u dosadašnjim istraživanjima nije urađeno na način prikazan u ovoj doktorskoj disertaciji.

Nakon sveukupne analize, rezultati dobijeni i predstavljeni u okviru ove doktorske disertacije delom su saglasni sa podacima iz literature, a rezultati određenih ispitivanja izvedenih u okviru disertacije nisu mogli biti uporedo analizirani sa publikovanim izvorima, te se smatraju doprinosom istraživačkog rada kandidata.

Literatura

Bamrungsap, S., Zhao, Z., Chen, T., Wang, L., Li, C., Fu, T. and Tan, W., 2012. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine*, 7, pp.1253-1271.

Banerjee, A., Kunwar, A., Mishra, B. and Priyadarsini, K.I., 2008. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin: Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. *Chemico-Biological Interactions*, 174, pp. 134-139.

Bisso, S. and Leroux, J.C., 2020. Nanopharmaceuticals: A focus on their clinical translatability. *International Journal of Pharmaceutics*, 578, 119098.

Bosetti, R. and Jones, S.L., 2019. Cost-effectiveness of nanomedicine: estimating the real size of nano-costs. *Nanomedicine*, 14, pp. 1367-1370.

Buchanan, M., Egelhaaf, S.U., and Cates, M.E., 2000. Dynamics of interface instabilities in nonionic lamellar phases. *Langmuir*, 16, pp. 3718-3726.

Caputo, F., Clogston, J., Calzolari, L., Rösslein, M. and Prina-Mello, A., 2019. Measuring particle size distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCI-NCL. A step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity. *Journal of Controlled Release*, 299, pp. 31-43.

Coty, J. B. and Vauthier, C., 2018. Characterization of nanomedicines: A reflection on a field under construction needed for clinical translation success. *Journal of Controlled Release*, 275, pp. 254-268.

Dahnier, F., 2016. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *Journal of Controlled Release*, 244, pp. 108-121.

De Aguiar, H.B., De Beer, A.G., Strader, M.L. and Roke, S., 2010. The interfacial tension of nanoscopic oil droplets in water is hardly affected by SDS surfactant. *Journal of the American Chemical Society*, 132, pp. 2122-2123.

Ghanema, I.I.A. and Sadek, K.M., 2012. Olive leaves extract restored the antioxidant perturbations in red blood cells hemolysate in streptozotocin induced diabetic rats. *International Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 6, pp. 124-130.

Gouze, N. and Boisseau, P., 2013. White Paper to the Horizon 2020 Framework Programme for Research and Innovation - Recommendations from the Nanomedicine Community. Dostupno na: <https://etp-nanomedicine.eu/wp-content/uploads/2018/10/2013-White-Paper-ETPN-contribution-Horizon-2020.pdf> (poslednji pristup: januar, 2022)

Gioria, S., Caputo, F., Urbán, P., Maguire, C.M., Bremer-Hoffmann, S., Prina-Mello, A., Calzolari, L. and Mehn, D., 2018. Are existing standard methods suitable for the evaluation of nanomedicines: some case studies. *Nanomedicine*, 13, pp. 539-554.

Gratieri, T., Kalia, Y.N., 2017. Iontophoresis: Basic Principles. In: Dragičević, N., Maibach, H.I. (eds.), *Percutaneous Penetration Enhancers: Physical Methods in Penetration Enhancement*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 61-76.

Gupta, A.N., 2020. Nanoemulsions. In: Chung, E.J., Leon, L., Rinaldi, C. (eds.), *Nanoparticles for Biomedical Applications: Fundamental Concepts, Biological Interactions and Clinical*. Elsevier, pp. 371-384.

Gupta, R., Dwadasi, B.S., Rai, B. and Mitragotri, S., 2019. Effect of chemical permeation enhancers on skin permeability: in silico screening using molecular dynamics simulations. *Scientific Reports*, 9, pp. 1-11.

Harkins, W.D., Davies, E.C. and Clark, G.L., 1917. The orientation of molecules in the surfaces of liquids, the energy relations at surfaces, solubility, adsorption, emulsification, molecular association, and the effect of acids and bases on interfacial tension (surface energy VI). *Journal of the American Chemical Society*, 39, pp. 541-596.

Hensel, J.K., Carpenter, A.P., Ciszewski, R.K., Schabes, B.K., Kittredge, C.T., Moore, F.G. and Richmond, G.L., 2017. Molecular characterization of water and surfactant AOT at nanoemulsion surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, pp. 13351-13356.

Jovanovic, S.V., Steenken, S., Boone, C.W. and Simic, M.G., 1999. H-atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of curcumin. *Journal of the American Chemical Society*, 121, pp. 9677-9681.

Klang, V. and Valenta, C., 2011. Lecithin-based nanoemulsions. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 21, pp. 55-76.

Komaiko, J. and McClements, D.J., 2014. Optimization of isothermal low-energy nanoemulsion formation: Hydrocarbon oil, non-ionic surfactant, and water systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, 425, pp. 59-66.

Komaiko, J.S. and McClements, D.J., 2016. Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: A review of available methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, pp. 331-352.

Lane, M. E., 2013. Skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*, 447, pp. 12-21.

Langmuir, I., 1917. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 39, pp. 1848-1906.

Lomova, M.V., Sukhorukov, G.B. and Antipina, M.N., 2010. Antioxidant coating of micronsize droplets for prevention of lipid peroxidation in oil-in-water emulsion. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2, pp. 3669-3676.

López-Montilla, J.C., Herrera-Morales, P.E., Pandey, S. and Shah, D.O., 2002. Spontaneous emulsification: mechanisms, physicochemical aspects, modeling, and applications. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 23, pp. 219-268.

McClements, D.J. and Decker, E.A., 2000. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, 65, pp. 1270-1282.

Mitragotri, S., Lammers, T., Bae, Y.H., Schwendeman, S., De Smedt, S.C., Leroux, J.C., Peer, D., Kwon, I.C., Harashima, H., Kikuchi, A. and Oh, Y.K., 2017. Drug delivery research for the future: expanding the nano horizons and beyond. *Journal of Controlled Release*, 246, pp. 183-184.

Mitsou, E., Kalogianni, E. P., Georgiou, D., Stamatis, H., Xenakis, A., and Zoumpanioti, M., 2018. Formulation and structural study of a biocompatible water-in-oil microemulsion as an appropriate enzyme carrier: the model case of horseradish peroxidase. *Langmuir*, 35, pp. 150-160.

Nikolić, B., Vasiljević, B., Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B. and Knežević-Vukčević, J., 2015. Comparative study of genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic activities of monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in bacteria and mammalian cells. *Chemico-Biological Interactions*, 242, pp. 263-271.

Onoue, S., Yamada, S. and Chan, H.K., 2014. Nanodrugs: pharmacokinetics and safety. *International Journal of Nanomedicine*, 9, pp. 1025.

Pan, Y., Tikekar, R. V. and Nitin, N., 2013. Effect of antioxidant properties of lecithin emulsifier on oxidative stability of encapsulated bioactive compounds. *International Journal of Pharmaceutics*, 450, pp. 129-137.

Rischitor, G., Parracino, M., La Spina, R., Urbán, P., Ojea-Jiménez, I., Bellido, E., Valsesia, A., Gioria, S., Capomaccio, R., Kinsner-Ovaskainen, A. and Gilliland, D., 2016. Quantification of the cellular dose and characterization of nanoparticle transport during in vitro testing. *Particle and Fibre Toxicology*, 13, pp. 1-16.

Sebastià, N., Soriano, J. M., Barquinero, J. F., Villaescusa, J. I., Almonacid, M., Cervera, J., Such, E., Silla, M. and Montoro, A., 2012. In vitro cytogenetic and genotoxic effects of curcumin on human peripheral blood lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 50, pp. 3229-3233.

Shah, V.P., Yacobi, A., Rădulescu, F.Ş., Miron, D.S. and Lane, M.E., 2015. A science based approach to topical drug classification system (TCS). *International Journal of Pharmaceutics*, 49, pp. 21-25.

Sharma, R.A., Gescher, A.J., Steward, W.P., 2005. Curcumin: the story so far. *European Journal of Cancer*, 41, pp. 1955–1968.

Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N. and Garcia-Celma, M.J., 2005. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10, pp. 102-110.

USP, 2021: United States Pharmacopoeia 43 – National Formulary 38, Chapter 1724: Semisolid drug products—performance tests. United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD.

Wagner, V., Hüsing, B., Gaisser, S. and Bock, A.K. (2008). Nanomedicine: Drivers for development and possible impacts. Luxemburg: Office for Official Publications of the European Communities. Dostupno na: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC46744> (poslednji pristup: januar, 2022)

Weltring, K.M., Gouze, N., Martin, N., Pereira, N., Baanante, I., Gramatica, F., 2016. Strategic Research and Innovation Agenda For Nanomedicine 2016 – 2030. Dostupno na: <https://etp-nanomedicine.eu/about-nanomedicine/strategic-research-and-innovation-agenda/> (poslednji pristup: januar, 2022).

Wilhelm, S., Tavares, A.J., Dai, Q., Ohta, S., Audet, J., Dvorak, H.F. and Chan, W.C., 2016. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials*, 1, pp. 1-12.

Zänker, S., Tölle, W., Blümel, G. and Probst, J., 1980. Evaluation of surfactant-like effects of commonly used remedies for colds. *Respiration*, 39, pp. 150-157.

4. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DISERTACIJE

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije do sada su objavljeni u vidu dva poglavlja u istaknutim monografijama međunarodnog značaja (M14), četiri rada u časopisima koji su na SCI listi (tri rada kategorije M21 i jedan rad kategorije M23), i u formi većeg broja saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima štampanim u celini ili u izvodu, uz tri usmena izlaganja na međunarodnim konferencijama, i jedno usmeno izlaganje na nacionalnom skupu. Podaci o publikovanim radovima dati su u nastavku.

○ Poglavlja u knjigama/monografijama međunarodnog značaja (M14)

Nikolić I, Gledović A, Tamburić S, Major T, Savić S. (2020) Nanoemulsions as Carriers for Natural Antioxidants: Formulation Development and Optimisation. In: Aboudzadeh M.A. (eds) Emulsion-based Encapsulation of Antioxidants. Food Bioactive Ingredients. Springer, Cham.

Nikolić I, Cekić N, Ilić T, Savić S.M, Savić S. D. (2017). Biocompatible Low-energy Nanoemulsions as Novel Curcumin Carriers: Formulation Design and Physicochemical Characterization. *Serbia-Italia: Nano for Health* (pp. 153-171). Belgrade, Faculty of Technology and Metallurgy – University of Belgrade

○ Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

Nikolić I, Mitsou E, Damjanović A, Papadimitriou V, Antić-Stanković J, Stanojević B, Xenakis A, Savić S. (2020). Curcumin-loaded low-energy nanoemulsions: Linking EPR spectroscopy-analysed microstructure and antioxidant potential with in vitro evaluated biological activity. *Journal of Molecular Liquids*, 301. IF 2020 = 6,165 (Physics, Atomic, Molecular & Chemical: 4/37; Chemistry, Physical: 43/162)

Nikolić I, Mitsou E, Pantelić I, Randjelovic D, Marković B, Papadimitriou V, Xenakis A, Lunter DJ, Zugić A, Savić, S. (2019). Microstructure and biopharmaceutical performances of curcumin-loaded low-energy nanoemulsions containing eucalyptol and pinene: Terpenes' role overcome penetration enhancement effect? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 142, 105135. IF 2019 = 3,616 (Pharmacology & Pharmacy: 77/271)

Nikolic I, Lunter DJ, Randjelovic D, Zugic A, Tadic V, Markovic B, Cekić N, Živković L, Topalović D, Spremo-Potparević B, Savic, S. (2018). Curcumin-loaded low-energy nanoemulsions as a prototype of multifunctional vehicles for different administration routes: Physicochemical and in vitro peculiarities important for dermal application. *International Journal of Pharmaceutics*, 550(1-2), 333-346. IF 2018 = 4,213 (Pharmacology & Pharmacy: 44/267)

○ Rad u međunarodnom časopisu (M23)

Nikolić I, Antić-Stanković J, Božić D, Randjelovic D, Marković B, Lunter DJ, Kremenović A, Savić M, Savić S. (2020). Curcumin nanonization using an alternative small-scale production unit: selection of proper stabilizer applying basic physicochemical consideration and biological activity assessment of nanocrystals. *Reviews on Advanced Materials Science*, 59(1), 406-424. IF 2020 = 3,364 (Nanoscience & Nanotechnology: 64/106)

○ **Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33)**

Nikolić I, Simić M, Pantelić I, Stojanović G, Savić S. Iontophoresis vs. chemical penetration enhancers towards improved dermal drug delivery: A case study with curcumin. 12th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 11 - 14 May 2021; online

Nikolić I, Randjelović D, Lunter DJ, Marković B, Savić S. Top-down method for lab-scale production of nanocrystals of active pharmaceutical ingredients – formulation approach and selection of optimal process parameters. 42nd International Semiconductor Conference, 9 – 11 October 2019; Sinaia, Romania (Oral communication)

Nikolić I, Mitsou E, Lunter DJ, Papadimitriou V, Xenakis A, Daniels R, Savić S. Linking microstructural analysis and drug-carrier interactions with biological activity: a study with curcumin. 3rd European Conference on Pharmaceutics, 25-25 March 2019, Bologna, Italy.

Nikolić I, Pantelić I, Marković B, Ilić T, Savić S. Low-energy nanoemulsions enriched with terpen compounds – combination of two methodologies for effective skin penetration. 10th International Congress Nanotechnology in Medicine and Biology, 15-17 April 2019, Graz, Austria.

Nikolić I, Mitsou E, Damjanović A, Papadimitriou V, Antić Stanković J, Xenakis A, Savić S. Linking microstructure of the low-energy nanoemulsions with biological effects: a curcumin case study. 3rd International Symposium on Pharmaceutical Engineering Research, 25-27 September 2019; Beauschweig, Germany

Nikolić I, Randjelovic D, Savić S. Potentials, Implementation and Perspectives of Atomic Force Microscopy for Characterization of Drug Delivery Nanocarriers. First International Conference on Electron Microscopy of Nanostructures ELMINA 2018, 27-29 August 2018, Belgrade, Serbia (Abstract book pp. 134-135)

Nikolic I, Mitsou E, Markovic B, Papadimitriou V, Xenakis A, Savić S. An insight to interface properties of low-energy nanoemulsions for curcumin dermal application using electron paramagnetic resonance - a link with release kinetics and biological activity. Nanomedicine ROME 2018, 18-21 June 2018; Rome, Italy

Nikolic I, Žukovec Topalovic D, Živkovic L, Spremo-Potparevic B, Djokovic J, Savić S. Eucalyptol as prospective co-surfactant and penetration enhancer in low-energy nanoemulsions? Physicochemical vs. genotoxicity data. 11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 19-23 March 2018; Granada, Spain

Nikolic I, Mitsou E, Randjelovic, D, Lunter D. J, Papadimitriou V, Daniels R, Xenakis A, Savić S. Interactions at the interface of low-energy nanoemulsions: closer view through atomic force microscopy and electron paramagnetic resonance spectroscopy as inspection tools. EUFEPS Annual Meeting, 24-26 May 2018; Athens, Greece (Abstract refernce: EP33)

Nikolic I, Lunter D. J, Daniels R, Randjelovic D, Žugić A, Tadić V, Živković L, Žukovec Topalović D, Spremo-Potparević B, Bubić Pajić N, Vuleta G, Savić S. Low-energy nanoemulsions for curcumin dermal application – special reference to antioxidant and antigenotoxic properties. First Croatian Congress on Dermatopharmacy with International Participation, 23-24 March 2018; Zagreb, Croatia (**Oral communication**, L-30)

Nikolić I, Ilić T, Cekić N, Savić S. M, Arsić N, Savić S. D. Biocompatible low-energy nanoemulsions for curcumin dermal delivery – the effect of terpene oil and drug content. 7th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences, 5-7 October 2017; Balatonfüred, Hungary (Abstract book: p. 140)

Nikolić I, Todosijević M, Ilić T, Daniels R, Savić S. Lecithin-based microemulsions for curcumin dermal delivery – physicochemical characterization. 2nd European Conference on Pharmaceutics, 3-4 April 2017; Krakow, Poland, USB stick (poster number 38)

- **Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)**

Nikolić I, Savić S. The nature of the nanoemulsion nano(visible)interface. NanoGVA Symposium, 13-14 October 2021, Geneva, Switzerland. **Oral presentation**: P7

Nikolić I, Mitsou E, Antić-Stanković J, Pantelić I, Randjelovic D, Papadimitriou V, Xenakis A, Savić S. Curcumin-loaded nanoemulsions in the view of dermal application: interfacial phenomena in the colloidal system and biological performances. 35th Conference of the European Colloid and Interface Society, 5-10 September 2021, Athens, Greece; Book of abstracts-Poster presentations; p. 177

Nikolić I, Simić M, Savić S. Improving dermal delivery of active substances using nanoemulsion combined with iontophoresis: A case study with curcumin. Virtual Summer School on Non-Animal Approaches in Science, 17-21 May 2021; Ispra, Italy; Poster presentation: 83

Nikolić I, Savić S. Low-energy nanoemulsions for curcumin delivery: investigation of the interfacial phenomena in the colloidal system and peculiarities important for biological performances. In: Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, (2). p. 32. (2020)

Nikolic I, Mitsou E, Papadimitriou V, Lunter D. J, Xenakis A, Daniels R, Savić S. Lecithin-based low-energy nanoemulsions with eucalyptol as a co-stabilizer: interfacial phenomena examination by electron paramagnetic resonance spectroscopy. 12th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, 20-11 September 2018; Szeged, Hungary

- **Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64)**

Nikolić I, Mitsou E, Lunter D. J, Papadimitriou V, Xenakis A, Daniels R, Savić S. Drug loading influence on the interfacial membrane dynamics of low-energy nanoemulsions – A curcumin case study. Serbian Congress of Pharmacy with International Participation, 10–13 October 2018; Belgrade, Serbia (**Oral communication**)

5. ZAKLJUČAK – OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DISERTACIJE

Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju nova ili dopunjena saznanja o: (i) fundamentalnim aspektima nastanka nanoemulzija kroz spontanoemulgujući postupak nanoemulzifikacije, (ii) fenomenima na granici faza u kontekstu doprinosa koloidnoj stabilnosti, (iii) prednostima primene nanoemulzija kao naprednih nosača za aktivne molekule sa zahtevnim fizičko-hemijskim karakteristikama, (iv) mogućnostima primene i ispitivanju jontoforeze kao fizičke metode za poboljšanje dermalne raspoloživosti, i poređenje sa efektima monoterpena (1,8-cineola i pinena) kao hemijskih pojačivača penetracije, (v) ispitivanju kombinovane primene nanonosaa sa jontoforezom sa ciljem unapređenja dermalne isporuke aktivnih supstanci.

Ukupno gledano, na osnovu prikazanih rezultata, može se zaključiti da su razvijene visokobezbedne niskoenergetske nanoemulzije namenjene dermalnoj isporuci kurkumina. Primenom niza komplementarnih tehnika, detaljno su okarakterisane u domenu mikrostrukture, oblika, veličine i morfologije dispergovane faze, fizičke stabilnosti, bezbednosti primene i pogodnosti za očuvanje hemijske stabilnosti supstance složenih fizičko-hemijskih osobina sa aspekta uključivanja u sastav formulacije farmaceutskog preparata. Na samom kraju, *in vivo* je ispitana penetracija kurkumina iz razvijenih nanoemulzija (sa hemijskim pojačivačima penetracije ili bez njih) i upoređena sa primenom adhezivnog sistema za jontoforezu u kombinaciji sa nanoemulzijom kao naprednog i inovativnog načina za efikasnu dermalnu isporuku aktivnih supstanci.

Kao najveći fundamentalni naučni doprinos ove doktorske disertacije može se smatrati analiza fenomena na granici faza, otkrivanje doprinosa različitih ekscipijenasa koloidnoj stabilnosti, i proširenje savremene teorije stabilizacije nanoemulzija, koja se bitno razlikuje od dosadašnjih razmatranja u ovoj oblasti. Poseban naglasak stavljen je i na značajnost primene većeg broja tehnika u tzv. kaskadnoj karakterizaciji nanosistema, a sve sa ciljem dobijanja pouzdanih rezultata. Prikazani rezultati eksperimentalnog dela rasvetlili su neke od mehanizama odgovornih za nastanak nanoemulzija kroz spontanoemulgujući postupak.

6. PROVERA ORIGINALNOSTI DOKTORSKE DISERTACIJE

Korišćenjem programa *iThenticate* u Univerzitetској biblioteci *Svetozar Marković* izavršena je provera originalnosti ove doktorske disertacije. Dobijena vrednost za *similarity index* iznosi 7%, i posledica je ličnih imena, citata, konstrukcija korišćenih u opisu metodologije i fraza koje se uobičajeno koriste u opisivanju i tumačenju rezultata istraživanja, kao i prethodno publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja (koji su proistekli iz njegove disertacije), što je sve u skladu sa članom 9 Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu. Dakle, može se izvesti zaključak da je priložena doktorska disertacija kandidata mag. farm. Ines Nikolić originalno naučno delo.

7. PREDLOG KOMISIJE ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija pod nazivom *Spontanoemulgujuće nanoemulzije za primenu kurkumina na koži: istraživanje uticaja međufaznih fenomena u koloidnom sistemu na efikasnost isporuke i biološku aktivnost*, čija je izrada odobrena na sednici Veća naučnih oblasti medicinskih nauka na Univerzitetu u Beogradu održanoj 25.2.2020. godine, kandidata mag. farm. Ines N. Nikolić, po svom sadržaju i formi, dobro napisanim uvodnom delu, jasno postavljenim istraživačkim ciljevima, dobro osmišljenoj metodologiji, precizno iznetim rezultatima rada, odgovarajućoj diskusiji, te dobro formulisanim zaključcima, ispunjava sve kriterijume adekvatno napisanog naučnog dela.

Stoga, Komisija sa zadovoljstvom predlaže Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta da prihvati pozitivan izveštaj o izrađenoj doktorskoj disertaciji pod nazivom *Spontanoemulgujuće nanoemulzije za primenu kurkumina na koži: istraživanje uticaja međufaznih fenomena u koloidnom sistemu na efikasnost isporuke i biološku aktivnost*, i kandidatu mag. farm. Ines Nikolić odobri javnu odbranu doktorske disertacije po dobijanju saglasnosti Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu.

Beograd, 5.1.2022. godine

Članovi Komisije

Dr sc. Danina Krajišnik, vanredni profesor – predsednik Komisije
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Lada Živković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Ana Žugić, naučni saradnik
Institut za proučavanje lekovitog bilja *Dr Josif Pančić*

Dr sc. Dominique Jasmin Lunter, redovni profesor
Eberhard-Karls Univerzitet, Tübingen (Nemačka)

Dr sc. Vassiliki Papadimitriou, stariji istraživač
Institut za hemijsku biologiju Nacionalne helenske istraživačke fondacije, Atina (Grčka);
gostujući profesor, Univerzitet Tesali, Larisa (Grčka)