

**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 11.7.2019. godine, imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata Tanje Ilić, diplomiranog farmaceuta, pod naslovom:

Mikro- i nanostrukturirani emulzioni sistemi na bazi polihidroksilnih surfaktanata za isporuku aceklofenaka u/kroz kožu primenom hemijskih pojačivača penetracije i mikroigala

Komisija u sastavu:

1. Dr Snežana Savić, redovni profesor, mentor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
2. Dr Ivana Pantelić, docent
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. Dr Miroslav Savić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
4. Dr Dušan Škiljević, docent
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

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

IZVEŠTAJ

A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija pod nazivom: „**Mikro- i nanostrukturirani emulzioni sistemi na bazi polihidroksilnih surfaktanata za isporuku aceklofenaka u/kroz kožu primenom hemijskih pojačivača penetracije i mikroigala**“, sadrži šest poglavlja: uvod, cilj istraživanja, eksperimentalni deo, rezultati i diskusija, zaključak i reference. Na početku doktorske disertacije je priložen sažetak/*abstract*, a na kraju se nalazi 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 251 strani i sadrži 54 slike (11 u uvodu, 4 u eksperimentalnom delu, 39 u rezultatima i diskusiji) i 20 tabela (3 u uvodu, 2 u eksperimentalnom delu, 15 u rezultatima i diskusiji). Pregled literature sadrži 247 navoda.

Uvod se sastoji iz 11 delova, pri čemu svaki deo sadrži informacije koje su od značaja za predmet proučavanja ove doktorske disertacije. U prvom delu uvoda kandidatkinja je ukratko izdvojila najznačajnije informacije o mehanizmu delovanja, efikasnosti i neželjenim efektima nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL), sa posebnim osvrtom na prednosti i nedostatke/ograničenja primene NSAIL preko kože. U skladu sa tim, istaknute su najznačajnije strategije koje su predmet intenzivnih ispitivanja tokom poslednjih nekoliko godina za poboljšanu penetraciju NSAIL kroz *stratum corneum* (SC), kao primarnu barijeru

kože, i/ili kontrolisano oslobađanje na mestu primene. U drugom delu uvoda date su osnovne definicije nanoemulzija kao obećavajućih nosača lekovitih/biološki aktivnih supstanci za različite puteve primene. Poređenjem sa mikroemulzijama i konvencionalnim (mikrostrukturiranim) emulzionim sistema, istaknute su najvažnije/jedinstvene karakteristike nanoemulzija, kao i izazovi i potencijalna rešenja u razvoju formulacije. U trećem delu uvoda opisane su prednosti, ali i nedostaci primene nanoemulzija kao nosača slabo rastvorljivih lekovitih supstanci za dermalnu/transdermalnu primenu. Takođe, dat je pregled nanoemulzija za primenu na koži koje su klinički odobrene ili se nalaze u različitim fazama kliničkih ispitivanja. Kako je jedna od osnovnih karakteristika nanoemulzija mogućnost poboljšanja isporuke lekovitih supstanci u/kroz kožu, u četvrtom segmentu uvoda opisani su mehanizmi za koje se smatra da se nalaze u osnovi tog procesa. Takođe, kandidatkinja je u ovom delu opisala ulogu/značaj faktora koji se smatraju ključnim za efikasnu penetraciju lekovitih supstanci u kožu iz nanoemulzija – veličina kapi, površinsko naelektrisanje i sastav formulacije. U petom delu uvoda dat je osvrt na uobičajeni sastav nanoemulzija, kao i izbor funkcionalnih i biokompatibilnih komponenata uljane faze, vodene faze i emulgatora/stabilizatora u zavisnosti od fizičko-hemijskih karakteristika NSAIL (prevashodno slabo kiseli karakter). Dodatno, kako je izbor surfaktanata od ključnog značaja za stabilnost, bezbednosni profil nanoemulzija, ali i efikasnu penetraciju inkorporirane lekovite supstance, značajan deo je posvećen lecitinu i posebno saharoznim estrima, kao relativno novim kostabilizatorima nanoemulzionih sistema. Detaljan pregled literaturnih podataka pružio je uvid u brojne prednosti primene saharoznih estara (biokompatibilnost, biodegradabilnost, nizak iritacioni potencijal), ali i specifične karakteristike od značaja za formulaciju preparata za primenu na koži (npr. potencijal za povećanje penetracije lekovitih supstanci). U šestom delu uvoda, ukratko je dat pregled visokoenergetskih i niskoenergetskih metoda koje se koriste za izradu nanoemulzija, sa posebnim osvrtom na homogenizaciju pod visokim pritiskom (metoda izbora za izradu nanoemulzija, posebno u industrijskim uslovima) i mehanizme obrazovanja nanokapi pod dejstvom spoljašnje energije. Usled brojnih faktora koji određuju karakteristike i stabilnost nanoemulzija, kandidatkinja ističe značaj primene metodologije eksperimentalnog dizajna u razvoju i optimizaciji nanoemulzija kao nosača NSAIL. Kako uprkos intenzivnim istraživanjima na polju nanotehnologije i razvoju naprednih sistema na tržištu dominiraju konvencionalni oblici lekova za primenu na koži, sedmi deo uvoda posvećen je savremenim trendovima u proceni bioekvivalencije generičkih polučvrstih preparata za primenu na koži, sa posebnim osvrtom na nedavno predložene alternativne modele/pristupe za dokazivanje terapijske ekvivalentnosti – Drvo odluke „Strašilo“ (engl., *the Strawman decision tree*) i TCS sistem klasifikacije za lekove namenjene za primenu na koži (engl., *Topical Drug Classification System, TCS*). U osmom delu uvoda kandidatkinja je iznela trenutne stavove vodećih svetskih regulatornih agencija (Američka agencija za hranu i lekove (FDA) i Evropska agencija za lekove (EMA)) u pogledu procene bioekvivalencije preparata za primenu na koži. Takođe, ukratko je opisan sadržaj nedavno donetog nacrtu vodiča za kvalitet i ekvivalentnost preparata za primenu na koži (EMA, 2018) koji daje predlog metoda i studija koje se mogu koristiti za procenu ekvivalentnosti u pogledu i) kvaliteta, ii) efikasnosti i iii) bezbednosti generičkog leka sa odgovarajućim referentnim lekom. Kako se u slučaju kompleksnih formulacija (kakvi su u najvećem broju slučajeva polučvrsti preparati za primenu na koži) prilikom procene bioekvivalencije, umesto kliničkih studija, predlaže korišćenje metoda za procenu kinetike permeacije, u devetom delu uvoda opisana su najnovija saznanja i preporuke za sprovođenje in vitro ispitivanja permeacije kroz izolovanu kožu, dermofarmakokinetičkog metoda i mikrodijalize. Vodeći se činjenicom da, usled izuzetnih barijernih svojstava kože, i pored brojnih napora, optimalnu isporuku lekovite supstance kroz kožu često nije moguće postići samo odgovarajućim dizajnom formulacije, deseti deo uvoda posvećen je mikroglama koje fizičkim putem (formiranjem pora

mikrometarskih dimenzija) omogućavaju premošćavanje barijerne funkcije SC i tako olakšavaju pasivnu difuziju lekovite supstance u/kroz kožu. U tom smislu, ukratko je opisan istorijski razvoj mikrogala, kao i prednosti i nedostaci primene mikroigala u odnosu na transdermalne flastere i parenteralne preparate. Dodatno, opisani su različiti tipovi mikroigala koji se predmet intenzivnih istraživanja tokom nekoliko poslednjih godina (čvrste, obložene, rastvorljive i šuplje mikroigle), uz objektivno navođenje njihovih prednosti, nedostataka kao i mehanizma odgovornih za poboljšanu isporuku lekovitih supstanci u/kroz kožu. Poslednji, jedanaesti deo ove celine, posvećen je čvrstim mikroiglama, koje iako među prvima korišćene, još uvek su u fokusu, pre svega zbog relativne jednostavnosti i mogućnosti poboljšanja isporuke visokodoziranih lekovitih supstanci u/kroz kožu. Na osnovu detaljnog pregleda literature, kandidat je izneo podatke o karakteristikama čvrstih mikroigala, faktorima koji određuju njihovu efikasnost penetracije u kožu i kinetiku zatvaranja mikropora formiranih u koži, kao i bezbednost primene.

Cilj rada je jasno definisan – da se sagleda mogućnost primene prirodnih polihidroksilnih surfaktanata (saharozni estri, alkil poliglukozi (APG) emulgator – cetearil glukozid i cetearil alkohol) u formulaciji nanoemulzija i konvencionalnih (mikrostrukturiranih) emulzionih sistema (podloga) za poboljšanu (trans)dermalnu isporuku aceklofenaka (model lekovita supstanca iz grupe NSAID), kao i da se, primenom različitih, prethodno optimizovanih, in vitro i in vivo metoda za procenu dermalne raspoloživosti, dobije uvid u potencijalni značaj primene naprednih sistema, kao što su nanoemulzije, u odnosu na emulzione sisteme koji se jednostavno mogu izraditi u uslovima apoteke. Takođe, imajući na umu izuzetna barijerna svojstva kože, cilj disertacije je između ostalog bio da se proceni da li se kombinovanom primenom nanoemulzija i predtretmana kože čvrstim mikroiglama, kao fizičkim pojačivačima penetracije, može obezbediti poboljšana isporuka aceklofenaka u kožu, odnosno, kroz kožu u sistemsku cirkulaciju. Ciljevi ove doktorske disertacije su realizovani kroz četiri faze istraživanja koje su opisane u eksperimentalnom delu.

U poglavlju **Eksperimentalni deo** prikazani su podaci o sastavu i postupku izrade ispitivanih nanoemulzija i mikrostrukturiranih emulzionih sistema i detaljno opisane fizičko-hemijske, biofarmaceutske, in vitro/in vivo metode i uređaji koji su korišćeni u eksperimentalnom radu. Eksperimentalni rad izveden je u četiri faze.

U prvoj fazi eksperimentalnog dela detaljno su opisani sastav i način izrade (homogenizacijom pod visokim pritiskom) nanoemulzija stabilizovanih kombinacijom lecitina i saharoznih estara, bez i sa aceklofenaka, uz variranje različitih formulacionih (sastav smeše surfaktanata) i procesnih parametara (pritisak i broj ciklusa homogenizacije). Primenom kombinovanog smeša-proces eksperimentalnog dizajna sprovedena je procena uticaja svakog od ovih parametara i njihovih interakcija na kritične attribute kvaliteta (CQA) nanoemulzija (veličina kapi i indeks polidisperznosti), kao i istovremena optimizacija sastava formulacije i uslova izrade nanoemulzija. Dat je detaljan opis metoda, uključujući opremu i uslove ispitivanja, koje su korišćene za karakterizaciju optimalnih placebo i nanoemulzija aceklofenaka u pogledu veličine i raspodele veličina kapi (foton korelaciona spektroskopija, laserska difrakcija, svetlosna mikroskopija), površinskog naelektrisanja (merenje elektroforetske pokretljivosti i prevođenje u zeta potencijal), viskoziteta (reološka merenja), pH vrednosti, električne provodljivosti, morfologije (mikroskopija atomskih sila, AFM), interakcija lek–nosač (diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC), FT-IR spektroskopija), preliminarne (tri/šest meseci na $25 \pm 2^\circ\text{C}$ i/ili $4 \pm 1^\circ\text{C}$, uz variranje tipa vodene faze) i dugoročne (godinu dana na $25 \pm 2^\circ\text{C}$ i $4 \pm 1^\circ\text{C}$) stabilnosti, kao i in vivo iritacionog potencijala (na humanim dobrovoljcima) u tzv. 24-časovnoj studiji pod okluzijom. Radi objektivnog poređenja, paralelno sa nanoemulzijama kostabilizovanim saharoznim estrima, izrađene su i sveobuhvatno okarakterisane placebo i nanoemulzije aceklofenaka stabilizovane

smešom lecitina i polisorbata 80 (kombinacija emulgatora koja je u literaturi najčešće korišćena za izradu nanoemulzija).

U drugom segmentu eksperimentalnog rada opisan je sastav i postupak izrade ispitivanih mikrostrukturiranih emulzionih sistema (prospektivnih „*ready-to-use*“ podloga) na bazi odabranog APG mešanog emulgatora uz variranje korastavarača/penetracionog inhensera (izopropanol/glicerol), kao potencijalnih surogata za široko korišćene podloge farmakopejskog kvaliteta (npr. nejonski hidrofilni krem) u izradi magistralnih lekova. Zatim je dat detaljan opis metoda (uključujući opremu i uslove ispitivanja) koje su korišćene za (i) dobijanje uvida u mikrostrukturu ispitivanih uzoraka (polarizaciona mikroskopija i konfokalna Raman spektroskopija), za (ii) analizu atributa kvaliteta koji su odabrani kao kritični, odnosno za koje je očekivano da mogu značajno da utiču na isporuku aceklofenaka u/kroz kožu i posledično, na njegove terapijske performanse – količina aceklofenaka rastvorena u podlozi (određivanje saturacione koncentracije), pH vrednost, reološke karakteristike (određivanje prinosnog napona, kontinualna reološka merenja) i način distribucije vode (termogravimetrijska analiza i merenje električne provodljivosti), kao i za (iii) procenu stabilnosti tokom čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

U trećem delu eksperimentalnog dela dat je opis metoda koje su korišćene za sistematičnu procenu dermalne raspoloživosti aceklofenaka iz ispitivanih mikro- i nanostrukturiranih emulzionih sistema. Kako je oslobađanje aceklofenaka iz nosača važan korak koji prethodi difuziji u/kroz kožu, dat je opis protokola korišćenog za određivanje in vitro profila oslobađanja primenom vertikalnih difuzionih i imerzionih ćelija. Dalje, kako bi se odredili penetracioni profili aceklofenaka kroz SC, opisana je faza razvoja protokola *tape stripping* metode na koži uha svinje sa posebnim osvrtom na definisanje 1) odgovarajuće metode za procenu integriteta kožne barijere, 2) uslova i dužine čuvanja ušiju nakon žrtvovanja svinje, 3) maksimalne dužine kontakta ispitivane formulacije sa kožom, 4) načina vršenja pritiska na adhezivnu traku i 5) postupka ekstrakcije aceklofenaka iz uklonjenih slojeva SC, sa krajnjim ciljem da se pojednostavi protokol *tape stripping* procedure koja se uobičajeno sprovodi na ljudima. Nakon definisanja konačnog protokola, ova metoda je korišćena za procenu uticaja stepena disperziteta (nano- vs. mikrostrukturirani sistemi) i stanja leka (rastvoren vs. kristalni oblik aceklofenaka) na dermalnu raspoloživost aceklofenaka pri *infinite* i *finite dose* uslovima. Radi procene pogodnosti kože uha svinje za sprovođenje komparativnih studija čiji je cilj poređenje penetracije leka u kožu iz Q1/Q2/Q3 neekvivalentnih formulacija, sproveden je i *tape stripping* na ljudima, primenom protokola koji je detaljno opisan u ovom segmentu eksperimentalnog dela. Dalje, dat je opis razvoja i optimizacije metode cijanoakrilatne biopsije kože uha svinje za procenu značaja folikularnog puta transporta u penetraciji aceklofenaka iz razvijenih nanoemulzija (sa i bez masiranja kože prilikom aplikacije uzoraka nanoemulzija). Sa druge strane, u cilju: (i) razumevanja fenomena koji su uključeni u penetraciju aceklofenaka u SC iz konvencionalnih mikrostrukturiranih emulzionih sistema, kao i (ii) procene obima i (iii) brzine isporuke aceklofenaka u kožu iz različitih formulacija, opisana je matematička analiza dobijenih profila koncentracije aceklofenaka u funkciji relativnog položaja u SC-u (fitovanje u matematičku jednačinu koja opisuje II Fick-ov zakon difuzije, kao i njeno integraljenje duž ukupne debljine SC), i način izračunavanja odgovarajućih dermofarmakokinetičkih parametara. Na kraju, dat je opis protokola korišćenog za in vitro ispitivanje permeacije aceklofenaka primenom Franz-ovih difuzionih ćelija i to (i) kroz toplotom izolovani epidermis kože uha svinje, i (ii) *dermatomed* kožu uha svinje (debljina 1 mm), sa ciljem da se razmotre dobijeni rezultati i proceni moguća korelacija sa podacima dobijenim primenom *tape stripping* metode.

U četvrtom segmentu eksperimentalnog rada dat je opis protokola koji je korišćen za procenu efikasnosti penetracije u kožu dva tipa čvrstih mikroigala (silikonske ImmuPatch mikrogile

vs. AdminPatch[®] 600 mikroigle, obe dužine 500 μm), a koji je baziran na bojenju kože tretirane mikroiglama metilenskim plavim i merenju transepidermalnog gubitka vode kože uha svinje pre aplikacije i odmah nakon uklanjanja mikroigala. Na kraju opisan je protokol sprovođenja in vivo farmakokinetičke studije i određivanja ukupne količine aceklofenaka deponovane u koži pacova *Wistar* soja, nakon primene odabranih formulacija nanoemulzija, sa i bez predtretmana kože pacova čvrstim mikroiglama od čelika (AdminPatch[®] 600 mikroigle), sa ciljem dobijanja uvida u farmakokinetičke performanse razvijenih nanoemulzija, kao i u značaj sastava ulje–voda međupovršinskog filma na stepen/obim i brzinu isporuke aceklofenaka u kožu i kroz kožu u sistemsku cirkulaciju in vivo.

Sve metode i protokoli koji su korišćeni u eksperimentalnom radu ove doktorske disertacije su odgovarajući i u skladu sa savremenim zahtevima naučnoistraživačkog rada u relevantnoj oblasti. Takođe, primenjene metode i protokoli su omogućili dobijanje objektivnih i pouzdanih rezultata na osnovu kojih je bilo moguće doneti adekvatne naučne zaključke.

Svi 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. Takođe, eksperimenti na životinjama sprovedeni su u skladu sa EU Direktivom 2010/63/EU, uz pridržavanje protokola odobrenog od strane Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama, Univerziteta u Beogradu–Farmaceutskog fakulteta.

Rezultati i diskusija su prikazani na 102 stranice teksta, kroz 39 slika i 15 tabela, i prate prethodno opisane četiri faze eksperimentalnog rada. Kroz diskusiju, kandidatkinja je na sveobuhvatan i razumljiv način iznela svoja tumačenja dobijenih rezultata i postavljenih hipoteza, a uz osvrt na relevantne nalaze drugih autora koji imaju isti ili sličan naučni interes.

U poglavlju **Zaključak** navedeni su najznačajniji zaključci svake od četiri faze eksperimentalnog rada, koji su u skladu sa dobijenim rezultatima i navedenim ciljevima istraživanja, kao i opšti zaključak doktorske disertacije.

U poglavlju **Reference** navedeno je 247 referenci citiranih harvardskim stilom.

B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Rezultati ove doktorske disertacije podeljeni su u četiri celine, u skladu sa postavljenim ciljevima, iznošenjem i tumačenjem rezultata svake od izvedenih faza eksperimentalnog rada.

U **prvom delu**, nakon odabira biokompatibilnih i funkcionalnih ekscipijenasa, kao i odgovarajućih preliminarnih ispitivanja, primenom metodologije eksperimentalnog dizajna formulisane su i uspešno izrađene (metodom tople (50°C) homogenizacije pod visokim pritiskom) nanoemulzije, sa i bez aceklofenaka, stabilizovane kombinacijom lecitina i saharoza palmitat P-1670 (SP) i/ili saharoza stearat S-970 (SS). Štaviše, rezultati ovog dela disertacije nedvosmisleno su ukazali na opravdanost primene kombinovanog smeša-proces eksperimentalnog dizajna, jer je utvrđeno da ne samo ispitivani pojedinačni faktori, već interakcije između ovih faktora, značajno utiču na vrednosti veličine kapi i polidisperznog indeksa, kao CQA nanoemulzija. Dodatno, rezultati numeričke i grafičke optimizacije ukazali su da se optimalne nanoemulzije aceklofenaka razlikuju u zavisnosti od formulacionih i procesnih parametara, te su omogućili odabir sastava smeše surfaktanata i uslova izrade koji rezultuju nanoemulzijama aceklofenaka željenih karakteristika (najmanja veličina kapi i uska distribucija kapi po veličini). Dalje, kako bi se procenila pogodnost odabranih optimalnih nanoemulzionih sistema za (trans)dermalnu primenu aceklofenaka i otkrile potencijalno prisutne lek-nosač interakcije koje mogu uticati na performanse razvijenih nanoemulzija

(efikasnost isporuke aceklofenaka u/kroz kožu i iritacioni profil), u ovom delu doktorske disertacije opisani su rezultati detaljne fizičko-hemijske karakterizacije i ispitivanja stabilnosti. Sve ispitivane formulacije nanoemulzija posedovale su kapi u nanometarskom opsegu veličina sa relativno uskom raspodelom, visok zeta potencijal, nizak viskozitet i relativno nisku pH vrednost. Interesantno, dodatak aceklofenaka doveo je do određenih promena u vrednostima praćenih parametara u odnosu na odgovarajuće placebo nanoemulzije, verovatno usled akumulacije u ulje-voda međusloju i smanjenja međupovršinskog napona (potvrđeno merenjem dinamičkog međupovršinskog napona). Analiza razblaženih uzoraka ispitivanih nanoemulzija primenom AFM tehnike potvrdila je homogenu distribuciju sfernih nanokapi, bez prisustva većih kapi, agregata i kristala nerastvornog aceklofenaka. Sa druge strane, karakterizacija nerazblaženih uzoraka sušenih u vakumu ukazala je na formiranje struktura nalik na planarne slojeve i terase, koje potiču od slabe tečnokristalne, i posebno lamelarne gel faze, što nameće zaključak da se opisane strukture mogu formirati na koži nakon aplikacije i isparavanja dela vodene faze (značajno sa aspekta efikasnosti isporuke aceklofenaka u/kroz kožu). Rezultati dobijeni primenom DSC i FT-IR spektroskopije potvrdili su odsustvo značajnih hemijskih interakcija između aceklofenaka i korišćenih ekscipijenasa, istovremeno upućujući da je aceklofenak molekularno dispergovan, odnosno rastvoren u uljanoj fazi/međupovršini nanoemulzija. Rezultati ispitivanja preliminarne/dugoročne stabilnosti ukazali su da je fizičko-hemijska stabilnost razvijenih nanoemulzija u velikoj meri zavisi od tipa vodene faze korišćene za izradu, uslova čuvanja i sastava smeše surfaktanata upotrebljenih za stabilizaciju. Uprkos inicijalnoj hipotezi da bi sinergistički efekat između SP i SS mogao da doprinese formiranju nanoemulzija sa poboljšanom dugoročnom fizičkom stabilnošću, dobijeni rezultati su ukazali da je dodatak SS (surfaktant sa umerenom lipofilnošću) kompromitovao stabilnost nanoemulzija. Drugim rečima, čuvanje u frižideru ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) i prisustvo hidrofilnog saharoznog estera (kao što je SP) neophodno je za postizanje zadovoljavajuće dugoročne fizičko-hemijske stabilnosti (ekvivalente referentnoj nanoemulziji). Na kraju, rezultati merenja ključnih biofizičkih parametara kože nakon primene ispitivanih nanoemulzija na kožu humanih dobrovoljaca, u tzv. 24-časovnoj studiji pod okluzijom, ukazali su da sve optimalne nanoemulzije na bazi saharoznih estera poseduju zadovoljavajući iritacioni profil, uprkos prisustvu lekovite supstance (aceklofenak) sa nepovoljnim iritacionim profilom.

Rezultati drugog dela istraživačkog rada su nedvosmisleno ukazali na pogodnost primene pristupa predloženog za procenu ekvivalenosti mikrostrukture tokom razvoja generičkih lekova, za detekciju razlika u mikrostrukтури između nedavno razvijenih „*ready to use*“ podloga na bazi APG emulgatora izrađenih variranjem korastvarača/penetracionih inhenjera (izopropanol/glicerol) i referente podloge (nejonski hidrofilni krem) definisanog farmakopejskog kvaliteta. Preciznije, rezultati polarizacione mikroskopije i konfokalne Raman spektroskopije potvrdili su da su značajne razlike u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu referentne podloge u odnosu na ispitivane APG podloge uslovile značajne razlike u izgledu mikrostrukture. Istovremeno, analiza kritičnih atributa kvaliteta (CQA) ukazala je na značajne varijacije u količini aceklofenaka rastvorenoj u ispitivanim podlogama (saturaciona koncentracija), reološkim karakteristikama i načinu distribucije vode u sistemu. Izuzetak predstavlja pH vrednost, gde nisu detektovane značajne razlike koje bi mogle da dovedu do značajnih varijacija u in vivo performansama ispitivanih uzoraka. Interesantno, iako primenom navedenih mikroskopskih/spektroskopskih tehnika nisu detektovane značajne razlike u mikrostrukтури u prisustvu malih varijacija u sastavu formulacija APG uzoraka sa aceklofenakom (dodatak korastvarača, izopropanola/glicerola, na račun smanjenja ukupnog sadržaja vode u preparatu), uočene su značajne promene u vrednostima praćenih CQA (uticaj izopropanola je bio izraženiji u odnosu na glicerol). Dodatno, rezultati preliminarne studije stabilnosti ukazali su da, umesto uobičajenog roka upotrebe do mesec dana za hidrofilne

kremove izrađene u apotekama, zahvaljujući zadovoljavajućoj fizičko-hemijskoj stabilnosti, preparati izrađeni sa razvijenim APG podlogama mogu se koristiti minimum tokom tri meseca, kao alternativa preparatima izrađenim sa podlogama farmakopejskog kvaliteta.

U **trećem delu** prezentovani su rezultati naredne faze eksperimentalnog rada. In vitro ispitivanje oslobađanja aceklofenaka kroz sintetsku (polikarbonatnu) membranu, sprovedeno primenom vertikalnih difuzionih ćelija, ukazalo je na značajno bolje oslobađanje aceklofenaka iz nanoemulzija u odnosu na ispitivane mikrostrukturirane emulzione sisteme, kao posledica izrazito male veličine kapi nanoemulzija (relativno velikog odnosa površine i zapremine kapi) i prisustvu aceklofenaka u rastvorenom obliku. Među nanoemulzijama, značajno veća brzina oslobađanja aceklofenaka postignuta je primenom saharoznih estara kao koemulgatora (posebno primenom SP kao jedinog koemulgatora) u odnosu na polisorbata 80, verovatno usled razlika u strukturi upotrebljenih kosurfaktanata i njihovom prostornom pakovanju na površini nanokapi. Sa druge strane, uočene razlike u reološkom ponašanju i/ili načinu distribucije vode u sistemu imale su presudnu ulogu u oslobađanju aceklofenaka iz mikrostrukturiranih emulzionih sistema – značajno bolje oslobađanje detektovano je iz formulacija na bazi APG emulgatora u odnosu na referentni uzorak izrađen sa podlogom farmakopejskog kvaliteta. Uporednim ispitivanjem in vitro brzine oslobađanja aceklofenaka iz razvijenih uzoraka primenom imerzionih (VanKel Enhancer) ćelija nije bilo moguće uočiti razlike u oslobađanju aceklofenaka iz ispitivanih formulacija nanoemulzija. U narednom segmentu istraživačkog rada, uspešno je razvijen protokol *tape stripping* metode na koži uha svinje. Preciznije, korelacionom analizom rezultata dobijenih in vitro (na koži uha svinje) sa rezultatima dobijenim in vivo (na humanim dobrovoljcima) utvrđeno je da, uprkos nešto većoj interindividualnoj varijabilnosti podataka dobijenih in vitro, postoji visok nivo korelacije, što potvrđuje pogodnost razvijenog protokola *tape stripping* metode na koži uha svinje za procenu efikasnosti penetracije lekovite supstance u kožu. Dalje, utvrđeno je da je sastav smeše surfaktanata upotrebljenih za stabilizaciju ključni faktor koji određuje razlike u penetracionim profilima aceklofenaka iz razvijenih nanoemulzija, pod *infinite dose* i *finite dose* uslovima, pri čemu je uočeno da prisustvo saharoznih estara doprinosi poboljšanju dermalne raspoloživosti aceklofenaka u poređenju sa konvencionalno korišćenim surfaktantom kakav je polisorbata 80. Takođe, uprkos inicijalnoj hipotezi da bi nanokapi mogle da penetriraju u folikule dlake u značajnom procentu, rezultati in vitro cijanoakrilatne biopsije površine kože ukazali su na relativno mali doprinos folikularnog puta u ukupnoj penetraciji aceklofenaka iz nanoemulzija. Štaviše, izgleda da prisustvo polisorbata 80 na međupovršini olakšava preuzimanje nanokapi u folikule dlake pod dejstvom masaže kože, koja imitira fiziološko kretanje dlake. Sa druge strane, penetracioni profili aceklofenaka iz mikrostrukturiranih emulzionih sistema i odgovarajući dermofarmakokinetički parametri određeni pri *infinite dose* uslovima ukazali su na značajno bolju dermalnu raspoloživost aceklofenaka iz uzoraka na bazi APG emulgatora (posebno iz formulacije sa izopropanolom) u odnosu na referentni uzorak izrađen sa konvencionalnom podlogom farmakopejskog kvaliteta, prevashodno usled razlika u afinitetu aceklofenaka za SC u odnosu na nosač primenjen na površini kože (nisu detektovane razlike u brzini percutane apsorpcije aceklofenaka). Promena eksperimentalnih uslova – količine aplikovane na površini kože (*infinite*→*finite dosing*) – uslovlila je određene promene u stepenu penetracije aceklofenaka u SC, usled promena u mikrostrukturi koje su prouzrokovane isparavanjem izopropanola i potencijalnom kristalizacijom aceklofenaka. Na kraju, rezultati dobijeni in vitro ispitivanjem permeacije aceklofenaka kroz *dermatomed* kožu uha svinje iz ispitivanih nanoemulzija bili su u potpunosti u skladu sa rezultatima in vitro ispitivanja oslobađanja, što ukazuje da je oslobađanje glavni faktor koji određuje isporuku aceklofenaka kroz kožu iz nanoemulzija (nanoemulzije sa saharoznim estrima su bile značajno efikasnije u pogledu isporuke aceklofenaka kroz kožu u odnosu na nanoemulziju sa polisorbatom 80). Sa druge strane, in

in vitro permeacioni profili aceklofenaka iz mikrostrukturiranih emulzionih sistema kroz toplotom izolovani epidermis kože uha svinje (*dermatomed* kožu nije bilo moguće koristiti zbog relativno niskih koncentracija aceklofenaka) nisu bili u potpunosti u skladu sa in vitro profilima oslobađanja, te su doveli do zaključka da stepen isporuke aceklofenaka kroz kožu zavisi od reoloških karakteristika, specifičnog načina distribucije vode u mikrostrukturi i posebno, nosač-koža interakcija, za čiju detaljnu procenu je neophodna primena biorelevantnog eksperimentalnog *setting*-a. Korelacionom analizom potvrđen je visok nivo korelacije između količine aceklofenaka u SC in vivo i ukupne količine aceklofenaka koja je permeirala kroz kožu in vitro, što ukazuje na pogodnost primene ove membrane u studijama koje imaju za cilj procenu prisustva/odsustva bioekvivalencije polučvrstih preparata za primenu na koži koji nisu Q1/Q2/Q3 ekvivalentni.

Četvrti, poslednji deo daje detaljan prikaz rezultata in vivo farmakokinetičkih ispitivanja na pacovima i određivanja količine aceklofenaka deponovane u koži nakon primene odabranih formulacija nanoemulzija, sa i bez predtretmana kože čvrstim mikroglama. Odgovarajućim preliminarnim ispitivanjima (merenje TEGV i bojenje kože uha svinje vodenim rastvorom metilenskog plavog), utvrđeno je da su komercijalno dostupne AdminPatch® 600 mikroigle izrađene od čelika dužine 500 µm efikasnije u narušavanju barijerne funkcije SC u odnosu na ImmuPatch silikonske mikroigle iste dužine, te su AdminPatch® 600 mikroigle korišćene u daljem toku eksperimenata. Prezentovani in vivo farmakokinetički profili ukazuju da iako je aplikacija AdminPatch® 600 čvrstih mikroigala od čelika dovela je do značajnog povećanja maksimalnih koncentracija aceklofenaka u plazmi, isporuka aceklofenaka u sistemsku cirkulaciju iz ispitivanih nanoemulzija je izuzetno spora (nezavisno od predtretmana kože), verovatno usled vremena neophodnog za oslobađanje aceklofenaka iz uljanog jezgra/međupovršine i, posledično, za njegovu penetraciju/difuziju u/kroz kožu. Za razliku od intaktne kože, tip koemulgatora upotrebljen za stabilizaciju nanoemulzija direktno je uticao na stepen i brzinu transdermalne isporuke aceklofenaka nakon predtretmana kože mikroglama, te je kandidatkinja zaključila da je sastav stabilišućeg filma glavni faktor koji određuje interakciju nanokapi sa okolnim tkivom u mikroporama formiranim u koži nakon uklanjanja mikroigala. Neočekivano, koncentracije diklofenaka, kao glavnog metabolita aceklofenaka kod pacova, bile su značajno manje u plazmi od koncentracija aceklofenaka nakon primene ispitivanih nanoemulzija, sa i bez predtretmana kože čvrstim mikroglama, verovatno usled zaobilaženja intenzivnog metabolizma u jetri i relativno malog doprinosa metabolizma aceklofenaka u koži. Na kraju, određivanjem ukupne količine aceklofenaka deponovane u koži pacova 24h nakon primene ispitivanih nanoemulzija, utvrđeno je da je u zavisnosti od tipa korišćenog koemulgatora, nakon predtretmana kože čvrstim mikroglama, značajna količina aceklofenaka/diklofenaka deponovana u koži pune debljine. Preciznije, dobijeni rezultati ukazuju da kombinacija čvrstih mikroigala i nanoemulzije sa SP kao koemulgatorom omogućava postizanje veće koncentracije aceklofenaka u koži/potkožnom tkivu, istovremeno ukazujući na značajan potencijal kombinacije čvrstih mikroigala i nanoemulzije sa polisorbitom 80 za poboljšanu isporuku aceklofenaka u sistemsku cirkulaciju.

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA DISERTACIJE SA PODACIMA IZ LITERATURE

Imajući na umu ograničenu biološku raspoloživost i posledično terapijski efekat nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL) primenjenih na koži, tokom poslednjih nekoliko godina postoji sve veće interesovanje za primenom različitih nanotehnoloških strategija kako bi se postigla poboljšana penetracija NSAIL kroz SC, kao primarnu barijeru za difuziju lekovitih

supstanci u/kroz kožu, i/ili kontrolisano oslobađanje na mestu primene. U tom smislu, zahvaljujući nizu jedinstvenih osobina kao što su biokompatibilnost, biodegradabilnost, dobra fizička stabilnost, jednostavan *scale up* visok solubilizacioni kapacitet za lipofilne lekovite supstance i nizak iritacioni potencijal, nanoemulzije su prepoznate kao obećavajući nosači za poboljšanu isporuku lekovitih supstanci u/kroz kožu (Sainsbury i sar., 2014; Savić, 2017; Singh i sar., 2017; Zhou i sar., 2010). Međutim, pravilan izbor funkcionalnih, biokompatibilnih ekscipijenasa, naročito surfaktanata/emulgatora, u odgovarajućoj koncentraciji, je preduslov za formiranje, stabilnost, odgovarajuća fizičko-hemijska svojstva izrađenih nanoemulzionih sistema, i posledično, za adekvatnu terapijsku efikasnost inkorporirane lekovite supstance. Iako tradicionalni etoksilovani nejonski surfaktanti pokazuju dobru funkcionalnost u stabilizaciji nanoemulzionih sistema, njihova primena može dovesti do pojave neželjenih reakcija na koži (Bergh i sar., 1997, 1998; Williams i Barry, 2004). Uz to, nizak stepen biodegradabilnosti ovih surfaktanata kao i povećanje svesti ljudi o značaju zaštite životne sredine, nametnuli su potrebu za primenom surfaktanata koji se dobijaju iz prirodnih i obnovljivih izvora, i koji ne sadrže polietilenoksidnu grupu u svojoj strukturi (Holmberg, 2001). Otuda, ova doktorska disertacija daje značajan doprinos u ispitivanju funkcionalnosti saharoznih estara u kostabilizaciji lecitinskih nanoemulzija, kao i proceni njihovih efekata na isporuku aceklofenaka u/kroz kožu. U tom smislu, treba istaći da iako se tokom poslednje dve decenije uočava povećano interesovanje za primenom saharoznih estara, do sada je publikovano samo nekoliko radova o uticaju saharoznih estara na osobine nanoemulzija i posledično na in vitro/in vivo performanse kože (perkutana apsorpcija i iritacioni profil) (Hoeller i sar., 2009; Klang i sar., 2010; Klang i sar., 2011a,b). Međutim, dobro je poznato, da pored parametara formulacije (vrsta i koncentracija komponenti u sastavu), procesni parametri (način mešanja uljane i vodene faze nanoemulzija, uslovi dobijanja preemulzije i samog procesa homogenizacije pod visokim pritiskom) i karakteristike lekovite supstance (npr. slabo kiseli karakter NSAIL) u značajnom stepenu određuju fizičko-hemijske karakteristike i stabilnost nanoemulzija (Baspinar i sar., 2010; Benita i Levy, 1993; Klang i Valenta, 2011; Washington, 1996). U tom smislu, veliki doprinos ove doktorske disertacije predstavljaju rezultati dobijeni primenom sveobuhvatnog kombinovanog smeša-proces eksperimentalnog dizajna, koji do sada nije primenjivan u razvoju nanoemulzija, u cilju istovremene 1) analize efekata komponenti smeše surfaktanata (lecitin iz jajeta, saharozni estri – SP i SS), procesnih faktora (pritisak i broj ciklusa homogenizacije) i prisustva/odsustva model lekovite supstance (aceklofenaka) na CQA nanoemulzija, 2) izračunavanja kompleksnih interakcija između ispitivanih varijabli, kao i 3) optimizacije sastava formulacije i istovremeno, uslova izrade. Potreba za sveobuhvatnom karakterizacijom odabranih optimalnih nanoemulzija koja je sprovedena u prvoj fazi eksperimentalnog rada pokazala se kao opravdana, što je potvrđeno kroz niz prikazanih rezultata čije je objašnjenje zahtevalo pozivanje na relevantne literaturne izvore, ali i povezivanje rezultata nekoliko sprovedenih metoda. Štaviše, rezultati doktorske disertacije ukazuju da je neophodno sprovesti detaljnu fizičko-hemijsku karakterizacijom i ispitivanje stabilnosti kako bi se odabirala obećavajuća formulacija nanoemulzija i odredili optimalni uslova čuvanja. Iako se smatra da saharozni estri pokazuju bolju podnošljivost od strane kože, odnosno značajno manji iritacioni potencijal u odnosu na tradicionalne, polietoksilovane surfaktante (Nava-Arzaluz i sar., 2015), u literaturi nema podataka o efektu saharoznih estara formulisanih u obliku nanoemulzija na in vivo performanse kože. Otuda upravo proističe značaj rezultata disertacije, koji ukazuju da nanoemulzije na bazi saharoznih estara imaju zadovoljavajući iritacioni profil, komparabilan referentnoj nanoemulziji, izrađenoj primenom široko korišćenog surfaktanata u farmaceutskoj industriji, kakav je polisorb 80, uprkos prisustvu lekovite supstance sa nepovoljnim iritacionim profilom.

Uporedno sa intenzivnim istraživanjima na polju nanotehnologije i razvojem naprednih sistema, evidentan je porast interesovanja za individualizacijom terapije (bol i prateći simptomi su jedinstveno iskustvo svakog pojedinca), te izrada lekova u apoteci dobija sve veći značaj (Minghetti i sar., 2014). Kako trenutno dostupne podloge koje se koriste uobičajeno u uslovima apoteke za izradu preparata za primenu na koži, često ne pružaju željeni terapijski efekat inkorporiranog NSAID i/ili ne zadovoljavaju očekivanja pacijenta u pogledu željene teksture preparata, senzornih atributa i bezbednosnog profila (Branvold i Carvalho, 2014; Nornoo i sar., 2016; Pantelić, 2013), javlja se potreba za inoviranjem sastava podloga. Međutim treba istaći da pregled dostupne literature ukazuje na nedostatak regulatornih smernica koje se odnose na razvoj „ready to use“ podloga koje bi se mogle proizvoditi u industriji, a namenjene su širokoj upotrebi u izradi magistralnih lekova. Otuda, kako bi se procenila mogućnost nedavno formulisane podloge na bazi APG emulgatora (Pantelić, 2013) da zameni konvencionalno korišćene podloge (npr. nejonski hidrofilni krem) definisanog farmakopejskog kvaliteta, u odsustvu odgovarajućih regulatornih smernica, u disertaciji primenjen je sveobuhvatni pristup predložen za pojednostavljenje razvoja generičkih polučvrstih preparata za primenu na koži. Iako „ready-to-use“ podloge namenjene širokoj primeni u izradi magistralnih lekova zaslužuju posebno „drvo odluke“ za procenu kvaliteta i biološke raspoloživosti inkorporiranih lekovitih supstanci, rezultati doktorske disertacije ukazuju da pristup baziran na (i) mikroskopskoj analizi, (ii) karakterizaciji atributa kvaliteta za koje se smatra da mogu da ukažu na eventualno prisutne razlike u mikrostrukturi kao i (iii) proceni njihovog uticaja na dermalnu raspoloživost primenom različitih in vitro i in vivo metoda, može da pruži adekvatne dokaze o ekvivalentnosti, odnosno izostanku iste. Štaviše, kako uprkos intenzivnim istraživanjima, još uvek nije u potpunosti definisan alternativni pristup/model za dokazivanje terapijske ekvivalentnosti generičkog leka sa odgovarajućim referentnim lekom (EMA, 2018; Miranda i sar., 2018), rezultati ove doktorske disertacije mogu da doprinesu akumuliranju znanja, odnosno proširenju odgovarajućih baza podataka o odnosu između odabranih CQA i in vitro/in vivo performansi polučvrstih preparata za primenu na koži, te kreiranju konačne verzije odgovarajućeg vodiča za industriju.

Imajući na umu da početak, dužina trajanja i stepen terapijskog odgovora preparata za primenu na koži zavisi od relativne efikasnosti 1) oslobađanja lekovite supstance iz nosača aplikovanog na površini kože i 2) penetracije i difuzije lekovite supstance kroz SC i druge slojeve kože (Shah i sar., 2015), u okviru ove doktorske disertacije sprovedena je karakterizacija svakog od ovih procesa nakon primene razvijenih mikro- i nanostrukturiranih emulzionih sistema korišćenjem odgovarajućih in vitro i/ili in vivo metoda. Kako za razliku od polučvrstih preparata za primenu na koži, uprkos intenzivnim istraživanjima, još uvek ne postoji standardna metoda/aparatura za in vitro ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance iz nanonosaa, ovo ispitivanje je sprovedeno primenom uobičajeno korišćenih vertikalnih difuzionih ćelija i značajno manje ispitivanih imerzionih ćelija. U slučaju mikrostrukturiranih emulzionih sistema potvrđena je mogućnost primene oba tipa ćelija, dok rezultati disertacije ukazuju da imerzione ćelije nisu pogodne za procenu malih promena u sastavu formulacije nanoemulzionih sistema. Iako se *tape stripping* metoda za procenu penetracionih profila lekovite supstance kroz SC smatra minimalno invazivnom i stoga, pogodnom za sprovođenje in vivo, na humanim dobrovoljcima (Miranda i sar., 2018; Raney i sar., 2015), tokom razvoja formulacije, javlja se potreba za pojednostavljenjem protokola, pre svega u pogledu izbegavanja pripreme obimne dokumentacije neophodne za dobijanje odobrenja od strane Etičkog komiteta (Klang i sar., 2012). Otuda se uočava povećano interesovanje za primenom in vitro *tape stripping* metode na koži uha svinje. Međutim, treba istaći da se ovom metodom trenutno bavi svega nekoliko istraživačkih grupa u svetu, i da nema jasno definisanog protokola za njegovo sprovođenje. Upravo značajan doprinos ove

doktorske disertacije predstavlja razvoj pouzdanog i ekonomičnog protokola za in vitro *tape stripping* koji se može primenjivati u laboratorijama prosečne opremljenosti. Visoka korelacija rezultata dobijenih in vitro sa rezultatima dobijenim in vivo ukazuju da je razvijeni protokol dovoljno diskriminatoran da ukaže na efekte suptilnih razlika u sastavu formulacije na penetraciju lekovite supstance kroz SC. Iako je logično očekivati da će se kapi nanoemulzija, analogno nanočesticama, akumulirati u značajnom stepenu u folikulima dlake (Raber i sar., 2014), rezultati cijanoakrilatne biopsije kože, sprovedene in vitro na koži uha svinje, ukazuju na relativno mali doprinos folikularnog puta u isporuci aceklofenaka u/kroz kožu iz razvijenih nanoemulzija. Značajno je istaći da u literaturi nema podataka o uticaju varijacija u tipu hidrofilnog kosurfaktanata (SP vs. polisorbata 80) na stepen preuzimanja lekovite supstance u folikule dlake iz nanoemulzija. Posebno treba istaći značajan doprinos rezultata in vitro ispitivanja permeacije, koji ukazuju da mogućnost primene određenog tipa membrane, odnosno, debljine kože (*dermatomed* koža vs. toplotom izolovani epidermis) zavisi između ostalog od karakteristika nosača, te su neophodna odgovarajuća preliminarna ispitivanja kako bi se odabrali adekvatni eksperimentalni uslovi. Dodatno, za razliku od *dermatomed* kože koja se vrlo često koristi u dermatološkim ispitivanjima, značajno manji broj studija u literaturi baziran je na primeni izolovanog epidermisa kože uha svinje kao membrane (npr. Bourdon i sar., 2016). Kao glavni nedostaci ovog tipa membrane navode se potencijalno formiranje pora tokom pripreme membrane (dlake ostaju u dermisu) i promene u permeabilitetu izazvane čuvanjem kože uha svinje u zamrzivaču (-20°C) (Barbero i Frasc, 2009; Sintov i Botner, 2006). Visoka korelacija između ukupne količine aceklofenaka koja je permeirala kroz kožu in vitro kroz toplotom izolovani epidermis i ukupne količine aceklofenaka u SC in vivo (određeno *tape stripping* metodom) ukazuje na pogodnost primene razvijenog protokola za poređenje različitih formulacija tokom razvoja novog leka ili prilikom preliminarne procene biološke ekvivalentnosti generičkih polučvrstih preparata za primenu na koži (ako su u istom farmaceutskom obliku). Istovremeno, dobijeni rezultati potvrđuju da čuvanje kože uha svinje na -20°C tokom mesec dana nema negativan uticaj na permeaciju aceklofenaka iz ispitivanih formulacija, što je veoma značajno sa aspekta organizacije ovog tipa ispitivanja.

Na kraju treba istaći da nasuprot relativno velikom broju publikaciju koje ukazuju na poboljšanje isporuke lekovite supstance u/kroz kožu primenom nanoemulzija, generalno su ograničeni literaturni podaci o mogućnosti primene nanoemulzija kao nosača za transdermalnu isporuku lekovitih supstanci (Klang i sar., 2015). Drugim rečima, najveći broj zaključaka o efektima primene baziran je rezultatima dobijenim in vitro ispitivanjem permeacije kroz izolovanu kožu različite debljine, odnosno nema podataka o in vivo farmakokinetičkom profilu lekovitih supstanci inkorporiranih u nanoemulzije. Stoga, u ovoj doktorskoj disertaciji je opravdano sprovedeno ispitivanje in vivo farmakokinetike aceklofenaka na pacovima *Wisar* soja, uključujući i određivanje ukupne količine aceklofenaka deponovane u koži na kraju eksperimenta, nakon primene na kožu ispitivanih nanoemulzija. Dobijeni rezultati su, između ostalog, omogućili dobijanje uvida u uticaj sastava stabilizujućeg sloja na ulje-voda međupovršini, pre svega vrste koemulgatora, na stepen/obim i brzinu isporuke aceklofenaka u kožu, odnosno kroz kožu u sistemsku cirkulaciju. Dodatna vrednost doktorske disertacije leži u rezultatima dobijenim nakon predtretmana kože čvrstim mikroiglama, koji jasno ukazuju na poboljšanje isporuke aceklofenaka u, odnosno, kroz kožu, u zavisnosti od tipa koemulgatora upotrebljenog za stabilizaciju nanoemulzija. U tom smislu treba istaći da, iako su obimna istraživanja tokom poslednjih godina usmerena ka efektima kombinovanog pristupa baziranog na predtretmanu kože mikroiglama i primeni nanonosaa, uključujući i analizu faktora koji određuju njegovu efikasnost (Coulman i sar., 2009; Larrañeta i sar., 2016; Nava-Arzaluz i sar., 2012), do sada u literaturi nije bilo podataka o efektu kombinovane primene čvrstih mikroigala od čelika i

biokompatibilnih nanoemulzija. Takođe, značajan doprinos predstavljaju i rezultati dobijeni praćenjem sadržaja diklofenaka, glavnog metabolita aceklofenaka kod pacova, u koži i u plazmi, koji za razliku od većine do sada sprovedenih studija (Todosijević, 2017), ukazuju na relativno mali doprinos metabolizma aceklofenaka u koži pacova.

Sveukupno gledano, 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 provereni u publikovanim izvorima, te se smatraju doprinosom istraživačkog rada kandidata.

Literatura

- Barbero, A.M., Frasc, H.F., 2009. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. *Toxicol. In Vitro* 23, 1–13.
- Baspinar, Y., Borchert, H.H., 2012. Penetration and release studies of positively and negatively charged nanoemulsions--is there a benefit of the positive charge? *Int. J. Pharm.* 430, 247–252.
- Benita, S., Levy, M.Y., 1993. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. *J. Pharm. Sci.* 82, 1069–1079.
- Bergh, M., Magnusson, K., Nilsson, J.L.G., Karlberg, A.T., 1997. Contact allergenic activity of Tween[®] 80 before and after air exposure. *Contact Dermat.* 37, 9–18.
- Bergh, M., Shao, L.P., Hagelthorn, G., Gäfvert, E., Nilsson, J.L.G., Karlberg, A.T., 1998. Contact allergens from surfactants. Atmospheric oxidation of polyoxyethylene alcohols, formation of ethoxylated aldehydes and their allergenic activity. *J. Pharm. Sci.* 87, 276–282.
- Bourdon, F., Lecoœur, M., Leconte, L., Ultré, V., Kouach, M., Odou, P., Vaccher, C., Foulon, C., 2016. Evaluation of Pentravan[®], Pentravan[®] Plus, Phytobase[®], Lipovan[®] and Pluronic lecithin organogel for the transdermal administration of antiemetic drugs to treat chemotherapy-induced nausea and vomiting at the hospital. *Int. J. Pharm.* 515, 774–787
- Branvold, A., Carvalho, M., 2014. Pain management therapy: the benefits of compounded transdermal pain. *J. Gen. Practice* 2, 6.
- Coulman, S.A., Anstey, A., Gateley, C., Morrissey, A., McLoughlin, P., Allender, C., Birchall, J.C., 2009. Microneedle mediated delivery of nanoparticles into human skin. *Int. J. Pharm.* 366, 190–200.
- EMA, 2018. Draft guideline on quality and equivalence of topical products. European Medicine Agency. Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP). European Medicine Agency. Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP); Jun 2018.
- Herkenne, C., Naik, A., Kalia, Y.N., Hadgraft, J., Guy, R.H., 2006. Pig ear skin ex vivo as a model for in vivo dermatopharmacokinetic studies in man. *Pharm. Res.* 23, 1850–1856.
- Hoeller, S., Sperger, A., Valenta, C., 2009. Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation. *Int. J. Pharm.* 370, 181–186.
- Holmberg, K., 2001. Natural surfactants. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 6, 148–159.
- Klang, V., Matsko, N., Zimmermann, A.M., Vojnikovic, E., Valenta, C., 2010. Enhancement of stability and skin permeation by sucrose stearate and cyclodextrins in progesterone nanoemulsions. *Int. J. Pharm* 393, 152–160.

- Klang, V., Valenta, C., 2011. Lecithin-based nanoemulsions. *J. Drug Del. Sci. Tech.* 21, 55–76.
- Klang, V., Matsko, N., Raupach, K., El-Hagin, Valenta, C., 2011a. Development of sucrose stearate-based nanoemulsions and optimization through γ -cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79, 58–67.
- Klang, V., Schwarz, J.C., Matsko, N., Rezvani, E., El-Hagin, N., Wirth, M., Valenta, C., 2011b. Semi-solid sucrose stearate-based emulsions as dermal drug delivery systems. *Pharmaceutics* 3, 275–306.
- Klang, V., Schwarz, J.C., Lenobel, B., Nadj M., Auböck, J., Wolzt, M., Valenta, C., 2012. In vitro vs. in vivo tape stripping: validation of the porcine ear model and penetration assessment of novel sucrose stearate emulsions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 80, 604–614.
- Klang, V., Schwarz, J.C., Valenta, C., 2015. Nanoemulsions in dermal drug delivery, in: Dragicevic, N., Maibach, H., (Eds), Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 255–266.
- Larrañeta, E., McCrudden, M.T., Courtenay, A.J., Donnelly, R.F., 2016. Microneedles: A New Frontier in Nanomedicine Delivery. *Pharm. Res.* 33, 1055–1073.
- Minghetti, P., Pantano, D., Gennari, C.G., Casiraghi, A., 2014. Regulatory framework of pharmaceutical compounding and actual developments of legislation in Europe. *Health Policy* 117, 328–333.
- Miranda, M., Sousa, J.J., Veiga, F., Cardoso, C., Vitorino, C., 2018. Bioequivalence of topical generic products. Part 1: Where are we now? *Eur. J. Pharm. Sci.* 123, 260–267.
- Nava-Arzaluz, M.G., Calderon-Lojero, I., Quintanar-Guerrero, D., Villalobos-Garcia, R., Ganem-Quintanar, A., 2012. Microneedles as transdermal delivery systems: combination with other enhancing strategies. *Curr. Drug Deliv.* 9, 57–73.
- Nava-Arzaluz, M.G., Piñón-Segundo, E., Ganem-Rondero, A., 2015. Sucrose esters as transdermal permeation enhancers, in: Dragičević, N., Maibach, H., (Eds.), Percutaneous penetration enhancers: chemical methods in penetration enhancement. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 270–293.
- Nornoo, A.O., Wulz, J., Yoon, H., Nan, Y., Lese, M., 2016. Impact of the chemical and physical stability of ketoprofen in various pharmaceutical bases on its topical and transdermal delivery. *Pharm. Dev. Technol.* 21, 204–213.
- Pantelić, I., 2013. Dermalna raspoloživost lekova sa antiinflamatornim delovanjem iz podloga sa šećernim emulgatorom: komparativna primena metoda in vitro/in vivo karakterizacije. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Beograd.
- Raber, A.S., Mittal, A., Schäfer, J., Bakowsky, U., Reichrath, J., Vogt, T., Schaefer, U.F., Hansen, S., Lehr, C.M., 2014. Quantification of nanoparticle uptake into hair follicles in pig ear and human forearm. *J. Control. Release* 179, 25–32.
- Raney, S.G., Franz, T.J., Lehman, P.A., Lionberger, R., Chen, M.L., 2015. Pharmacokinetics-based approaches for bioequivalence evaluation of topical dermatological drug products. *Clin. Pharmacokinet.* 54, 1095–1106.
- Savić, S., 2017. Parenteralne nanoemulzije sa slabo rastvorljivim psihofarmakološkim lekovima: formulacija, optimizacija i in vivo procena dispozicije. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Beograd.
- Sainsbury, F., Zeng, B., Middelberg, A.P.J., 2014. Towards designer nanoemulsions for precision delivery of therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Eng.* 4, 11–17.
- Shah, V.P., Yacobi, A., Rădulescu, F.Ş., Miron, D.S., Lane, M.E., 2015. A science based approach to topical drug classification system (TCS). *Int. J. Pharm.* 491, 21–25.

- Singh, Y., Meher, J.G., Raval, K., Khan, F.A., Chaurasia, M., Jain, N.K., Chourasia, M.K., 2017. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J. Control. Release* 252, 28–49.
- Sintov, A.C., Botner, S., 2006. Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: influence of skin storage conditions on the in vitro permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems. *Int. J. Pharm.* 311, 55–62.
- Todosijević, M., 2017. Formulacija, fizičko-hemijska karakterizacija i biološka ispitivanja biokompatibilnih mikroemulzija za dermalnu i transdermalnu isporuku aceklofenaka. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Beograd.
- Washington, C., 1996. Stability of lipid emulsions for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 20, 131–145.
- Williams, A.C., Barry, B.B., 2004. Penetration enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 603–618.
- Zhou, H., Yue, Y., Liu, G., Li, Y., Zhang, J., Gong, Q., Yan, Z., Duan, M., 2010. Preparation and characterization of a lecithin nanoemulsion as a topical delivery system. *Nanoscale Res. Lett.* 5, 224–230.

D. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DISERTACIJE

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije do sada su objavljeni u vidu jednog poglavlja u istaknutoj monografiji od međunarodnog značaja (M14), četiri rada u časopisima koji su na SCI listi (tri rada kategorije M21 i jedan rad kategorije M23), 2 tehnička rešenja-nova metoda (M85), kao i u formi većeg broja saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima štampanih u celini ili u izvodu. Podaci o publikovanim radovima dati su u nastavku.

Poglavlje u istaknutoj monografiji od međunarodnog značaja (M14)

1. **Isailović T**, Todosijević M, Đorđević S, Savić S. Natural surfactants-based micro/nanoemulsion systems for NSAIDs – Practical formulation approach, physicochemical and biopharmaceutical characteristics/performances. In: Čalića R (ed). *Microsized and Nanosized Carriers for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Formulation Challenges and Potential Benefits*, Elsevier, p. 179–217, ISBN: 9780128040171, doi: 10.1016/B978-0-12-804017-1.00007-8

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

- Ilić T**, Savić S, Batinić B, Marković B, Schmidberger M, Lunter D, Savić M, Savić S. Combined use of biocompatible nanoemulsions and solid microneedles to improve transport of a model NSAID across the skin: in vitro and in vivo studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2018; 125: 110–119 (IF 3,532/2018)
- Ilić T**, Pantelić I, Lunter D, Đorđević S, Marković B, Ranković D, Daniels R, Savić S. Critical quality attributes, in vitro release and correlated in vitro skin permeation-in vivo tape stripping collective data for demonstrating therapeutic (non)equivalence of topical semisolid: a case study of "ready-to-use" vehicles. *International Journal of Pharmaceutics* 2017; 528(1-2): 253–267. (IF 3,862/2017)
- Isailović T**, Đorđević S, Marković B, Ranđelović D, Cekić N, Lukić M, Pantelić I, Daniels R, Savić S. Biocompatible nanoemulsions for improved aceclofenac skin delivery: formulation approach using combined mixture-process experimental design. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2016; 105: 308–323. doi: 10.1002/jps.24706 (IF 3,051/2015)

Rad u međunarodnom časopisu (M23)

1. Pantelić I, Ilić T, Marković B, Savić S, Lukić M, Savić S. A stepwise protocol for drug permeation assessment that combines heat-separated porcine ear epidermis and vertical diffusion cells. *Hemijaska industrija* 2018; 72: 47–53. (IF 0,566/2018).

Tehnička rešenja – nova metoda (M85)

1. Ilić T, Pantelić I, Marković B, Đorđević S, Lukić M, Savić S. Metoda za in vitro ispitivanje permeacije leka kroz toplotom izolovani epidermis kože uha svinje primenom Franz-ovih difuzionih ćelija.

Positivna recenzija recenzenata prof. dr Bojane Obradović i prof. dr Gordane Vulete prihvaćena na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu 15.06.2017. godine, odlukom broj 1152/3.

2. Ilić T, Pantelić I, Marković B, Đorđević S, Lukić M, Savić S. Metoda diferencijalnog *stripping*-a na koži uha svinje za procenu dermalne raspoloživosti lekova iz nosača sa nanostrukturom.

Positivna recenzija recenzenata prof. dr Bojane Obradović i prof. dr Gordane Vulete prihvaćena na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu 15.06.2017. godine, odlukom broj 1152/2.

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33)

1. Ilić T, Savić S, Pantelić I, Marković B, Savić S. Development of suitable working protocol for in vitro tape stripping: a case study with biocompatible aceclofenac-loaded topical nanoemulsions. 3rd Braunschweig International Symposium on Pharmaceutical Engineering Research, Septembeer 25 – 27, 2019, Braunschweig, Nemačka (prihvaćeno).

2. Ilić T, Pantelić I, Marković B, Schmidberger M, Daniels R, Savić S. In vitro investigation of the follicular penetration of aceclofenac nanoemulsion: the role of co-emulsifier type and massage. 2nd European Conference on Pharmaceutics, April 3-4, 2017, Krakow, Poland.

3. Ilić T, Pantelić I, Ranković D, Marković B, Lunter D, Daniels R, Savić S. Natural surfactant-stabilized semisolid emulsion systems with aceclofenac: identification and characterization of critical quality attributes. 11th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, September, 22-24, 2016, Belgrade, Serbia.

4. Isailović T, Lunter D, Pantelić I, Đorđević S, Daniels R, Savić S. Aceclofenac nanoemulsions co-stabilized with sucrose esters: ex vivo skin penetration and permeation study. 10th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, April 4-7, 2016, Glasgow, United Kingdom.

5. Isailović T, Đorđević S, Lukić M, Pantelić I, Randelović D, Marković B, Savić S. Sucrose esters and polysorbate 80 as co-emulsifiers in development of nanoemulsions for improved aceclofenac skin delivery. 1st European Conference on Pharmaceutics: Drug Delivery, April 13-14, 2015, Reims, France.

6. Isailović T, Djordjevic S, Pantelic I, Markovic B, Cekic N, Daniels R, Savić S. Sucrose esters-based nanoemulsions for improved penetration of aceclofenac: porcine ear skin vs. human skin. 10th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, September 18-20, 2014, Portorož, Slovenia.

7. Isailović T, Đorđević S, Todosijević M, Savić SR, Pantelić I, Savić SD. Aceclofenac nanoemulsions co-stabilized with sucrose fatty acid esters: physicochemical properties and stability. 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, March 31-April 3, 2014, Lisbon, Portugal.

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)

1. **Isailović T**, Đorđević S, Randelović D, Cekić N, Savić SR, Savić SD. Kombinovani smeša-proces eksperimentalni dizajn u formulaciji nanoemulzija aceklofenaka stabilizovanih biodegradabilnim emulgatorima. II Kongres farmaceuta Crne Gore, Maj 28-31, 2015, Bečići, Crna Gora p. 219-221.
2. **Isailović T**, Đorđević S, Pantelić I, Lukić M, Marković B, Todosijević M, Savić S. Natural sucrose esters as co-emulsifiers in nanoemulsions: Influence on skin performances and drug penetration profile. Skin Forum Annual Meeting 2014: A Joint Conference with APV, September 4-5, 2014, Prague, Czech Republic, p.69.

Saopštenja sa skupa nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)

1. **Ilić T**, Savić S, Batinić B, Đoković J, Marković B, Savić M, Savić S. Biokompatibilne nanoemulzije za isporuku aceklofenaka u/kroz kožu primenom hemijskih pojačivača penetracije i čvrstih mikroigala. VII Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, oktobar 10-14, 2018, Beograd, Srbija, p. 354-355.
2. **Isailović T**, Pantelić I, Đorđević S, Lukić M, Marković B, Savić S. Procena penetracije aceklofenaka iz različitih emulzionih sistema: ex vivo vs. in vivo tape stripping. VI Kongres farmaceuta Srbije, Oktobar 15-19, 2014, Beograd, Srbija, p. 377-378.

E. ZAKLJUČAK – OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DISERTACIJE

Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju nova ili dopunjena saznanja o: (i) prednostima primene nanoemulzija kao naprednih nosača NSAIL za primenu na koži u odnosu na konvencionalne (mikrostrukturirane) emulzione sisteme (podloge) koji se mogu jednostavno izraditi u uslovima apoteke, (ii) potencijalnoj upotrebi polihidroksilnih surfaktanata (saharozni estri, APG emulgator) kao savremenih ekscipijenasa u formulaciji mikro- i nanostrukturiranih emulzionih sistema, (iv) različitim in vitro i in vivo metodama za ispitivanje dermalne raspoloživosti i (v) efektima kombinovane primene predtretmana kože čvrstim mikroglama i nanoemulzija na isporuku aceklofenaka kao model NSAIL u kožu, odnosno kroz kožu u sistemski cirkulaciju.

Ukupno gledano, na osnovu prikazanih rezultata i činjenica navedenih u uvodu ove doktorske disertacije može se zaključiti da su uspešno razvijene biokompatibilne, lecitinske nanoemulzije primenom saharoznih estara kao kosurfaktanata. Primenom multidisciplinarnog, sveobuhvatnog pristupa – počev od formulacije, izrade i optimizacije primenom koncepta eksperimentalnog dizajna, preko fizičko-hemijske karakterizacije, analize lek-nosač interakcija, ispitivanja stabilnosti razvijenih nanoemulzija, procene njihovog iritacionog potencijala, do ispitivanja in vitro i in vivo dermalne raspoloživosti i efikasnosti isporuke aceklofenaka u kožu, odnosno kroz kožu u sistemsku cirkulaciju pacova – na objektivnan način (karakterizacija sprovedena uporedo sa referentnom nanoemulzijom na bazi lecitina i polisorbata 80) demonstrirana je pogodnost primene saharoznih estara (posebno hidrofilnog saharoznog estera – SP), kao funkcionalnih ekscipijenasa u formulaciji nanoemulzija kao nosača NSAIL za primenu na koži. Dodatnu vrednost ove doktorske disertacije predstavljaju rezultati koji ukazuju da je, iako prilično kompleksan, kombinovani smeša-proces eksperimentalni dizajn pogodan „alat“ za razvoj i optimizaciju sastava formulacije i postupka izrade/proizvodnje nanoemulzija željenih karakteristika.

Kako uprkos intenzivnom razvoju naprednih sistema i dalje postoji potreba za izradom lekova u uslovima apoteke, usled težnji ka individualizaciji terapije, značajan doprinos

doktorske disertacije predstavljaju rezultati dobijeni testiranjem koncepta baziranog na proceni CQA i in vitro/in vivo performansi, kao alternativnog pristupa za dokazivanje terapijske (ne)ekvivalentnosti „*ready-to-use*“ podloga namenjenih širokoj primeni u izradi magistralnih lekova. Na ovaj način, uspešno su detektovane razlike u mikrostrukturi (za pouzdanu procenu nivoa sličnosti/razlika između test i referentnog preparata, nije dovoljno sprovesti samo vizuelizaciju mikrostrukture, već i detaljnu analiza CQA, kao što su reološki parametri, način distribucije vode u sistemu, pH vrednost, udeo rastvorenog leka) i dermalnoj raspoloživost aceklofenaka iz podloga na bazi APG mešanog emulgatora, izrađenih variranjem korastvarača/penetracionih inhensera u odnosu na referentnu podlogu farmakopejskog kvaliteta (Nejonski hidrofilni krem). Štaviše, poboljšana isporuka aceklofenaka u/kroz kožu, poželjno reološko ponašanje i unapređene organoleptičke karakteristike čine podloge na bazi APG emulgatora (sa/bez korastvarača) boljim izborom u izradi magistralnih lekova u odnosu na podloge farmakopejskog kvaliteta izrađene primenom tradicionalnih nejonskih emulgatora.

Primenom različitih in vitro i in vivo metoda za procenu dermalne raspoloživosti pokazana je značajno bolja efikasnost nanoemulzija u odnosu na konvencionalne (mikrostrukturirane) emulzije sisteme (podloge) u pogledu isporuke aceklofenaka u/kroz kožu. Takođe, potvrđeno je da prisustvo ispitivanih polihidroksilnih surfaktanata u formulacijama emulzionih sistema doprinosi poboljšanoj isporuci aceklofenaka u/kroz kožu, u odnosu na konvencionalno korišćene polietoksilovane surfaktante, kao što su polisorbati. Međutim, značajan doprinos ove doktorske disertacije upravo leži u razvoju i/ili optimizaciji protokola za ispitivanje različitih performansi razvijenih emulzionih sistema koji su pogodni za rutinsku primenu u laboratorijama prosečne opremljenosti, uključujući in vitro ispitivanje oslobađanja, in vitro *tape stripping*, in vitro cijanoakrilatnu biopsiju kože, in vivo *tape stripping* (sa odgovarajućom matematičkom analizom dobijenih koncentracionih profila i izračunavanjem dermofarmakokinetičkih parametara), in vitro ispitivanje permeacije kroz toplotom izolovani epidermis/*dermatomed* kožu uha svinje. Usled prednosti i ograničenja svake od navedenih metodologija, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da se jedino kombinovanom primenom navedenih in vitro/in vivo tehnika baziranih na farmakokinetici mogu u potpunosti sagledati performanse preparata za primenu na koži. Štaviše, specifične karakteristike svakog od ispitivanih emulzionih sistema nameću potrebu za odgovarajućim prilagođavanjima eksperimentalnih protokola, u cilju postizanja maksimalne diskriminatorne snage ispitivanja.

Konačno, veliki doprinos ove doktorske disertacije predstavljaju i rezultati dobijeni sprovođenjem in vivo farmakokinetičkih ispitivanja (uključujući i određivanje ukupne količine model lekovite supstance u koži), sa i bez predtretmana kože čvrstim mikroiglama (fizičko narušavanje barijerne funkcije SC), u cilju procene uloge sastava stabilizujućeg sloja na ulje–voda međupovršini, pre svega vrste koemulgatora, u efikasnosti isporuke aceklofenaka u kožu, odnosno kroz kožu u sistemsku cirkulaciju, te definisanje faktora koji doprinose optimalnoj dermalnoj odnosno transdermalnoj isporuci aceklofenaka. U tom smislu treba istaći da dobijeni rezultati ukazuju da kombinacija čvrstih mikroigala i nanoemulzije sa SP kao koemulgatorom omogućava postizanje nešto veće koncentracije lekovite supstance u koži/potkožnom tkivu, dok kombinacija čvrstih mikroigala i nanoemulzije sa polisorbatom 80 kostabilizatorom omogućava poboljšanu isporuku aceklofenaka u sistemsku cirkulaciju, što potencijalno pruža mogućnost za lečenje različitih bolesti koštano-mišićnog sistema transdermalnim putem.

F. PROVERA ORIGINALNOSTI DOKTORSKE DISERTACIJE

Korišćenjem programa iThenticate u Univerzitetској biblioteci Svetozar Marković, Beograd završena je provera originalnosti doktorske disertacije. Dobijena vrednost za *Similarity index*

iznosi 8% i posledica je podudarnosti ličnih imena, citata, reči korišćenih u opisu metodologije, uobičajenih fraza koje se koriste u opisu rezultata istraživanja (npr. kao što je prikazano na slici), kao i publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja, koji su proistekli iz rezultata ove doktorske disertacije. Shodno tome, može se izvesti zaključak da je priložena doktorska disertacija kandidata dipl. farm. Tanje Ilić originalno naučno delo.

G. PREDLOG KOMISIJE ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija pod nazivom „**Mikro- i nanostrukturirani emulzioni sistemi na bazi polihidroksilnih surfaktanata za isporuku aceklofenaka u/kroz kožu primenom hemijskih pojačivača penetracije i mikroigala**“, čija je izrada odobrena na sednici Veća naučnih oblasti medicinskih nauka na Univerzitetu u Beogradu održanoj 15.9.2016. godine, kandidata dipl. farm. Tanje M. Ilić, po svom sadržaju i formi, dobro napisanom uvodnom delu, jasno postavljenim istraživačkim ciljevima, zadovoljavajuće osmišljenoj metodologiji, precizno iznetim rezultatima rada, razložnoj diskusiji, i dobro formulisanim zaključcima, ispunjava sve kriterijume adekvatno napisanog naučnog dela.

Komisija, stoga, sa zadovoljstvom predlaže Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta da prihvati pozitivan izveštaj o izrađenoj doktorskoj disertaciji pod nazivom „**Mikro- i nanostrukturirani emulzioni sistemi na bazi polihidroksilnih surfaktanata za isporuku aceklofenaka u/kroz kožu primenom hemijskih pojačivača penetracije i mikroigala**“, i kandidatu dipl. farm. Tanji Ilić odobri javnu odbranu doktorske disertacije po dobijanju saglasnosti Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu.

Beograd, 6.9.2019. godine

Članovi Komisije

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

Dr Ivana Pantelić, docent
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Miroslav Savić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Dušan Škiljević, docent
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet