

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET

MIRJANA D. TIMOTIJEVIĆ

**POLIMERNI FILM-FORMIRAJUĆI SISTEMI ZA  
DERMALNU ISPORUKU  
BETAMETAZONDIPROPIONATA:  
DEFINISANJE KRITIČNIH ATRIBUTA  
KVALITETA PRIMENOM OPTIMIZOVANIH  
FIZIČKOHEMIJSKIH, TRIBOLOŠKIH I  
BIOFARMACEUTSKIH TESTOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET



MIRJANA D. TIMOTIJEVIĆ

**POLIMERNI FILM-FORMIRAJUĆI SISTEMI ZA  
DERMALNU ISPORUKU  
BETAMETAZONDIPROPIONATA:  
DEFINISANJE KRITIČNIH ATRIBUTA  
KVALITETA PRIMENOM OPTIMIZOVANIH  
FIZIČKOHEMIJSKIH, TRIBOLOŠKIH I  
BIOFARMACEUTSKIH TESTOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

MIRJANA D. TIMOTIJEVIĆ

**POLYMERIC FILM-FORMING SYSTEMS FOR  
DERMAL DELIVERY OF BETAMETHASONE  
DIPROPIONATE: DEFINING CRITICAL  
QUALITY ATTRIBUTES BY USING OPTIMISED  
PHYSICOCHEMICAL, TRIBOLOGICAL AND  
BIOPHARMACEUTICAL TESTS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta; deo eksperimentalnog rada urađen je na Katedri za farmaceutsku hemiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, i na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu.

MENTOR

---

Dr sc. Ivana Pantelić, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

1. \_\_\_\_\_

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

2. \_\_\_\_\_

Dr sc. Tanja Ilić, naučni saradnik,  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

3. \_\_\_\_\_

Dr sc. Nebojša Cekić, redovni profesor,  
Univerzitet u Nišu – Tehnološki fakultet u Leskovcu

Datum odbrane \_\_\_\_\_



Strana sa izrazima zahvalnosti

Najsrdahnije se zahvaljujem svom mentoru, prof. dr Ivani Pantelić, na svesrdnoj pomoći, angažmanu i podršci u svakoj fazi izrade ove doktorske disertacije.

Srdahnio se zahvaljujem prof. dr Snežani Savić čije je znanje i iskustvo doprinelo suštinskom usmeravanju i uobličavanju disertacije.

Najiskrenije se zahvaljujem naučnom saradniku dr. Tanji Ilić na angažmanu i saradnji u realizaciji dela eksperimentalnog rada.

Zahvaljujem se prof. dr Nebojši Cekiću na iskrenoj saradnji tokom izrade ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem dr Danijeli Randelović iz Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju na saradnji i angažmanu u realizaciji dela eksperimentalnog rada.

Zahvaljujem se srdačno prof. dr Bojanu Markoviću sa Katedre za farmaceutsku hemiju na uspešnoj saradnji i angažmanu u realizaciji dela eksperimentalnog rada.

Posebno se zahvaljujem svim ispitanicima, saradnicima i mladim istraživačima sa Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, koji su u ulozi mojih ispitanika-dobrovoljaca, pokazali izuzetno strpljenje, pažnju i interesovanje tokom dugotrajnih testiranja u okviru *in vivo* studija eksperimentalnog rada.

Konačno, najveću zahvalnost dugujem Andreasu i svojoj porodici koji su uvek bili tu da pruže neizmernu podršku, snagu i motivaciju tokom celokupih studija.

**Polimerni film-formirajući sistemi za dermalnu isporuku betametazondipropionata:  
definisanje kritičnih atributa kvaliteta primenom optimizovanih fizičko-hemijskih, triboloških  
i biofarmaceutskih testova**

**SAŽETAK**

Film-formirajući sistemi (FFS) na bazi polimera su dizajnirani kao napredni, inovativni nosači lekova koji nakon sušenja na koži formiraju tanak, supstantivan film. Ovi nosači treba da obezbede kontrolisanu dermalnu isporuku lekovitih supstanci. Cilj doktorske disertacije je bio razvoj, optimizacija i sveobuhvatna fizičko-hemijska, tribološka i biofarmaceutska karakterizacija FFS, u cilju dobijanja optimalnih FFS namenjenih za ciljanu dermalnu isporuku betametazondipropionata (BD), kako bi se smanjila učestalost primene i time potencijalnih neželjenih efekata (npr. u terapiji psorijaze). U početnoj fazi, unutar preformulacione studije korišćeni su različiti tipovi polimera ili kombinacije, poput Eudragit® RS PO, Eudragit® NE 30 D, Klucel® GF u različitim koncentracijama, kombinovani sa plastifikatorima poput trietil-citrata, tributil-citrata, propilenglikola i glicerola, opciono sa inhenserom penetracije/nejonskim surfaktantom (polisorbat 80) i više sistema rastvarača. Deo istraživanja je posvećen razvoju i/ili optimizaciji različitih *in vitro* i *in vivo* metoda koje bi bile podesne za karakterizaciju FFS, a koje bi efikasno pružile uvid u uticaj formulacionih i procesnih parametara na karakteristike dermalnih filmova koje bi se mogle odraziti na njihovu supstantivnost na koži, vodeći ka definisanju specifičnih kritičnih atributa kvaliteta. Dodatno je ispitan uticaj topografije filmova na svojstvo bioadhezivnosti. U završnoj fazi istraživanja, poseban deo je posvećen *in vitro* ispitivanju permeacije BD iz razvijenih formulacija, i definisanju seta kriterijuma i faktora formulacije koji u najvećoj meri određuju permeaciju. Razvijeni FFS su se pokazali kao podesni prospektivni nosači za ciljanu i produženu dermalnu isporuku BD, podstičući njihov dalji razvoj.

**Ključne reči:** Film-formirajući sistemi; dermalni film; betametazondipropionat; Eudragit® polimeri; hidroksipropilceluloza, produžena dermalna isporuka; supstantivnost; plastifikatori; nejonski surfaktant.

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmaceutska tehnologija

**UDK broj:**

# **Polymeric film-forming systems for dermal delivery of betamethasone dipropionate: defining critical quality attributes by using optimised physicochemical, tribological and biopharmaceutical tests**

## **ABSTRACT**

Polymer-based film forming systems (FFS), designed as advanced, innovative drug carriers after drying form a thin, substantive film. These vehicles should provide controlled dermal delivery of active pharmaceutical ingredients. The aim of the present doctoral dissertation was the development, optimization and comprehensive physicochemical, tribological and biopharmaceutical characterization of the FFS, with the goal to obtain optimal FFS for targeted dermal delivery of betamethasone dipropionate (BD), in order to reduce the dosing frequency and thereby potential side effects (e.g. in therapy of psoriasis). Within the pre-formulation phase of the study, distinct types of polymers or combinations such as Eudragit® RS PO, Eudragit® NE 30 D, Klucel® GF, were used in various concentrations, combined with a range of plasticizers like triethyl citrate, tributyl citrate, propylene glycol and glycerol, optionally with a penetration enhancer/non-ionic surfactant (polysorbate 80), and with several solvent systems. A part of the research was dedicated to development and/or optimization of diverse *in vitro* and *in vivo* methods able to discern formulation and process parameters crucial for dermal film characteristics which might reflect their skin substantivity, leading to defining specific critical quality attributes. Additionally, the film topography's influence on bioadhesion was tested. In the final phase, a special part of the research was dedicated to the *in vitro* biopharmaceutical testing of the developed formulations and defining a set of criteria and formulation factors which have the most influence on BD permeation. The developed FFS were shown to be adequate prospective drug carriers for targeted and prolonged dermal delivery of BD, encouraging their further development.

**Key words:** Film forming systems; dermal film; betamethasone dipropionate; Eudragit® polymers; hydroxypropyl cellulose; prolonged dermal delivery; substantivity; plasticizers; non-ionic surfactant.

**Scientific field:** Pharmacy

**Scientific subfield:** Pharmaceutical technology

**UDK No.:**

## LISTA VAŽNIJIH SKRAĆENICA I SIMBOLA

AFM	mikroskopija atomskih sila
API	aktivni farmaceutski sastojak
BD	betametazondipropionat
BTM	betametazon
DSC	diferencijalna skenirajuća kalorimetrija
EtOH	etanol, 96% V/V
FDA	Američka agencija za hranu i lekove
FF	film-formirajući
FFS	film-formirajući sistem(i)
FT-IR	infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom
GR	glukokortikoidni receptor
HPLC	tečna hromatografija pod visokim pritiskom
HPC	hidroksipropilceluloza
KS	kortikosteroidi
MCT	srednje-lančani trigliceridi
MFFT	minimalna temperatura formiranja filma
MS	masena spektroskopija
Ph. Eur.	Evropska farmakopeja
NE	Eudragit® NE 30 D
PAM	površinski aktivna materija
PVA	polivinilalkohol
RS	Eudragit® RS PO
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija
TBC	tributil-citrat
TEC	trietil-citrat
Tg	temperatura staklastog prelaza
Tt	tačka topljenja
TMA	termalna mehanička analiza
USP	Američka farmakopeja

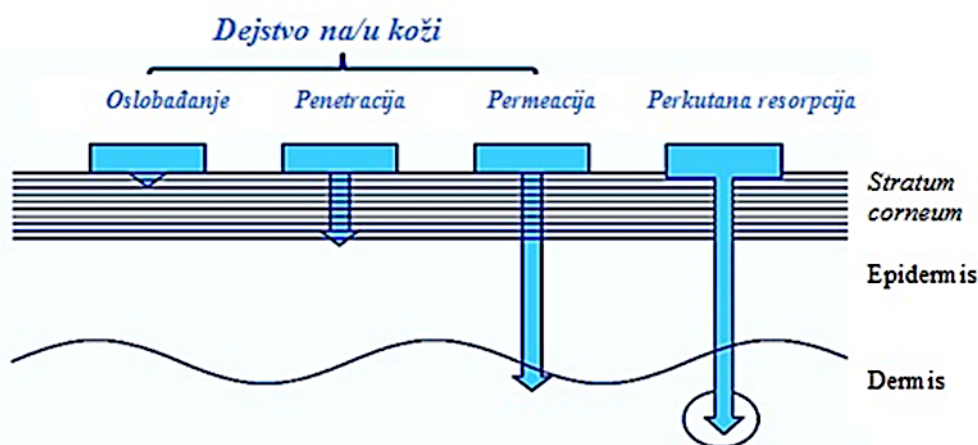
# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Topikalni kortikosteroidi za dermalnu primenu.....	2
1.2. Sastav i karakteristike film-formirajućih sistema.....	4
1.3. Film-formirajući sistemi za kontrolisano oslobađanje lekovite supstance u različitim farmaceutskim oblicima.....	13
1.4. Noviji zahtevi regulatornih vodiča za topikalne preparate.....	15
1.5. Film-formirajući sistemi kao nosači lekovitih supstanci za dermalnu/transdermalnu primenu.....	17
1.6. Struktura i fizičko-hemijska svojstva betametazondipropionata kao lekovite supstance u film-formirajućim sistemima za dermalnu primenu.....	22
2. CILJ RADA.....	24
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	26
3.1. Materijali.....	26
3.2. Metode.....	28
3.2.1. Izrada polimernih film-formirajućih sistema.....	28
3.2.2. Skrining fizičko-mehaničkih i senzornih svojstava.....	29
3.2.2.1. Ispitivanje vremena sušenja filmova na sobnoj temperaturi.....	29
3.2.2.2. Ispitivanje vremena sušenja filmova na 32 °C.....	29
3.2.2.3. Senzorna svojstva filmova dobijenih nakon sušenja na sobnoj temperaturi vs. 32 °C.....	29
3.2.2.4. Ispitivanje debljine filma.....	30
3.2.2.5. Ispitivanje površine filma.....	30
3.2.2.6. Ispitivanje fleksibilnosti/mehaničke otpornosti filmova.....	31
3.2.2.7. Skrining mikrostrukture filmova.....	32
3.2.3. Određivanje pH vrednosti film-formirajućih sistema.....	32
3.2.4. Preliminarna procena in vivo iritacionog potencijala i supstantivnosti film-formirajućih sistema na bazi polimetakrilatnih kopolimera i/ili hidroksipropil celuloze.....	33
3.2.5. Izrada polimernih film-formirajućih sistema sa betametazondipropionatom.....	37
3.2.6. Optička mikroskopija.....	37
3.2.7. Reološka karakterizacija.....	38
3.2.8. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR spektroskopija).....	38
3.2.9. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC).....	39
3.2.10. Mikroskopija atomskih sila (engl. AFM).....	39
3.2.11. Preliminarna procena stabilnosti uzoraka.....	39

3.2.12. In vitro ispitivanje permeacije model lekovite supstance betametazondipropionata.....	40
3.2.13. UHPLC-MS/MS.....	42
3.2.14. Statistička analiza.....	43
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	44
4.1. Rezultati i diskusija prve faze eksperimentalnog rada.....	44
4.1.1. Razvoj formulacija film-formirajućih sistema u okviru preformulacione studije.....	44
4.1.2. Fizičko-hemijska, senzorna i mehanička karakterizacija optimalnih film- formirajućih sistema.....	48
4.1.3. Procena mikrostrukture formiranog filma primenom polarizacione mikroskopije.....	53
4.1.4. pH vrednosti razvijenih film-formirajućih sistema.....	54
4.2 Rezultati i diskusija druge faze eksperimentalnog rada.....	55
4.2.1. In vivo procena iritacionog potencijala razvijenih film-formirajućih sistema.....	55
4.2.2. In vivo procena supstantivnosti razvijenih film-formirajućih sistema.....	57
4.3. Rezultati i diskusija treće faze eksperimentalnog rada.....	65
4.3.1. Fizičko-hemijska, reološka i mikroskopska karakterizacija odabranih film- formirajućih sistema bez i sa betametazondipropionatom, praćena preliminarnom studijom stabilnosti.....	65
4.3.2. FT-IR spektroskopija - uvid u eventualne interakcije između betametazondipropionata i ostalih sastojaka film-formirajućih sistema.....	75
4.3.3. DSC analiza.....	81
4.3.4. Određivanje topografije filmova primenom mikroskopije atomskih sila.....	86
4.4. Rezultati i diskusija četvrte faze eksperimentalnog rada.....	96
4.4.1. In vitro ispitivanje permeacije betametazondipropionata primenom vertikalnih Franz-ovih difuzionih ćelija.....	96
4.4.2. Definisavanje kritičnih atributa kvaliteta film-formirajućih sistema.....	100
5. ZAKLJUČAK.....	106
6. REFERENCE.....	110
7. PRILOZI.....	120
7.1 Publikovani i saopšteni radovi koji čine deo doktorske disertacije.....	120
7.2. Biografija autora.....	121
7.3. Izjave autora.....	122

# 1. UVOD

Lekovi za topikalnu dermatološku primenu među kojima su kortikosteroidi (KS) veoma zastupljeni u terapiji kožnih oboljenja, uključuju široki opseg preparata formulisanih za primenu na obolelu kožu, sa ciljem da uglavnom ispolje lokalni efekat na mestu primene. Željeni cilj ovakve terapije je da se, uz pružanje izvesnog komfora pacijentu, postigne maksimalna koncentracija lekovite supstance u koži, uz njenu minimalnu perkutanu resorpciju (Savić i Vuleta, 2008). Stoga, navedeni dermalni sistemi su obično dizajnirani da obezbede isključivo lokalno dejstvo. Mogu se koristiti kako u terapiji akutnih kožnih infekcija tako i kod hroničnih kožnih bolesti. Obično se tečni ili polučvrsti preparati aplikuju u propisanim vremenskim intervalima, a formulacija je osmišljena tako da aktivni farmaceutski sastojak (engl. *active pharmaceutical ingredient*, API) u njenom sastavu penetrira u epidermis da bi u odgovarajućim slojevima kože ispoljio dominantno lokalni efekat. Da bi se izbegao sistemski efekat, važno je utvrditi stepen i brzinu prolaska API kroz različite slojeve kože. Ovo je od posebnog značaja u slučaju lekova kao što su antibiotici ili imunosupresivi (poput kortizona), gde se dovoljno visoka terapijska koncentracija može postići dermalnom primenom bez sistemskog opterećenja organizma (Pünnel i Lunter, 2021, slika 1.1).



**Slika 1.1.** Struktura kože sa shematskim prikazom različitih dometa dermalnih i transdermalnih sistema (preuzeto i prilagođeno iz Pünnel i Lunter, 2021).

U današnje vreme, topikalna isporuka lekova je oblast koja se intenzivno razvija, u kojoj je tehnološko unapređenje formulacije kombinovano sa prednostima u razumevanju mehanizama kožne barijere dovelo do optimizacije u isporuci API i to putem povezivanja jedinstvenih svojstava nosača / sistema za isporuku lekovite supstance sa prirodom same aktivne molekule. Danas, postaje sve aktuelnije usklađivanje i optimizacija sastojaka nosača/formulacije da bi se olakšala ciljana isporuka lekovite supstance na obolelo mesto. Topikalni nosači koji optimizuju isporuku kortikosteroida za lečenje određene kožne patologije uz smanjenje sistemske resorpcije, mogli bi da poboljšaju terapijski tok i ishod mnogih kožnih imunoloških oboljenja, kao što je psorijaza (Kircik i sar., 2017). Uvođenje novih nosača za dermalnu isporuku je kvalitativno i suštinski proširilo mogućnosti u lečenju psorijaze, ali i doprinelo personalizovanom izboru najadekvatnije terapije za svakog pojedinačnog pacijenta. Savremeni formulacioni pristupi pružaju nadu za bolju satisfakciju pacijenata, te i njihov poboljšani kvalitet života (Buechler i sar., 2021).

## **1.1. Topikalni kortikosteroidi za dermalnu primenu**

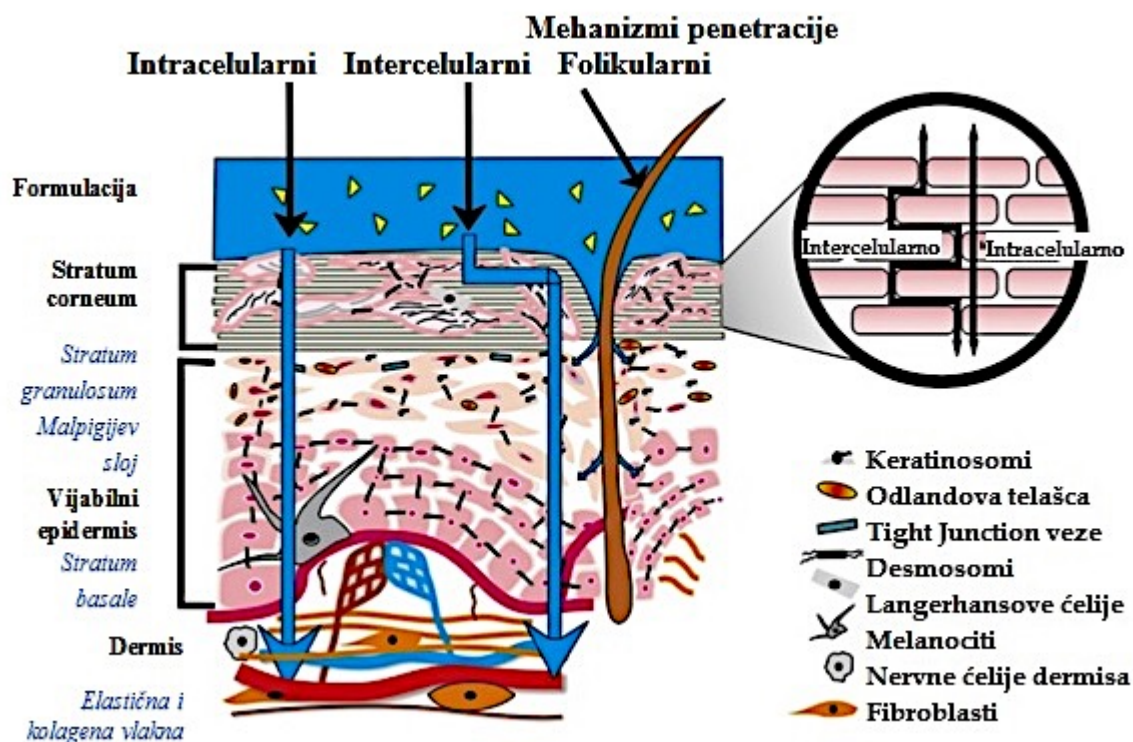
Lokalno primenjeni (topikalni) kortikosteroidi su najčešće korišćene lekovite supstance za tretman pacijenata sa inflamatornim oboljenjima kože. U Sjedinjenim Američkim Državama, topikalni kortikosteroidi su među najčešće propisivanim topikalnim API (Feldman i sar., 2000). Poseduju antiinflamatornu aktivnost, imunosupresivne karakteristike i antiproliferativno delovanje, zbog čega se koriste u lečenju psorijaze, atopijskog ekcema, dermatitisa, pruritusa i dr. (Elenkov i Chrousos, 2002; Valencia i Kerdel, 2003).

Kortikosteroidi su steroidni hormoni koji su fiziološki proizvedeni u kori nadbubrežne žlezde i omogućavaju normalno funkcionisanje organizma, ali se brojni derivati uspešno dobijaju i sintetski. Fiziološki i farmakološki efekti KS su posredovani vezivanjem za glukokortikoidni receptor (GR), protein koji pripada superfamiliji nuklearnih hormonskih receptora (ID gena: *NR3C1*) (Evans, 1988). Generalno, kortikosteroidi slabo penetriraju u kožu te, kako bi se poboljšala lokalna isporuka, sintetisani su njihovi estri koji imaju povećanu lipofilnost. Topikalni preparati koji sadrže estre kao što su betametazondipropionat i betametazonvalerat su dostupni u različitim farmaceutskim oblicima (rastvori, kremovi, masti) i klasifikovani su prema njihovoj jačini (Callis i Krueger, 2003). Najčešći neželjeni efekti topikalnih KS su: atrofija kože, poremećaj u zarastanju rana, akneiformne erupcije, hipopigmentacija, fotoosetljivost, kožne superinfekcije, kontaktni dermatitis. Rizik povezan sa primenom kortikosteroida, paralelno sa koristima od njihove terapijske efikasnosti i odnos rizik/korist je u direktnoj vezi sa jačinom steroida i kapacitetom za penetraciju, odnosno permeaciju kroz kožu i eventualnu perkutanu resorpciju (Brazzini i Pimpinelli., 2002).

Postoji mnogo faktora koji utiču na penetraciju i permeaciju supstanci kroz kožu, a uglavnom su sledeći: razlike između tipova kože, starost kože, deo tela na koji se nanosi, temperatura kože, stanje kože (normalna, suva i ispucala, bolesna), površina kože obuhvaćena primenom leka, dužina kontakta, zatim stepen vlaženja kože, eventualni prethodni tretman kože, fizičko-hemijske karakteristike samog penetrirajućeg agensa, itd. Mehanizam penetracije lekovite supstance kroz kožu odvija se primarno difuzijom, te zavisi od koncentracije. Većinom molekule permeiraju kroz SC intercelularnim, intracelularnim (transcelularnim) i folikularnim putevima, pri čemu je intercelularni put najočitiiji. Prema Eliasovoj shemi, rožasti sloj (*stratum corneum*, SC) simulira strukturnu sliku modela sastavljenog iz dva odeljka (tzv. struktura „cigle i cementa“) korišćenog za bazično razumevanje strukture spoljašnjeg sloja kože, kao što je prikazano na slici 1.2. Korneociti hidratisanog keratina čine „ciglu“ položenu u „cement“ sastavljen od višeslojnih intercelularnih lipidnih dvosloja ceramida, masnih kiselina, holesterola, estara holesterola i dr. Ovi dvosloji čine regione polukristalnog gela i tečne kristalne domene (Alexander i sar., 2012; Elias, 1983).

Ipak, treba istaći da ni topikalni kortikosteroidi kao značajna grupa dermofarmaceutskih preparata nisu izbegli očekivanja proizašla iz upotrebe kozmetičkih proizvoda, a odnose se na zadovoljavajuće osnovne organoleptičke, ali i sofisticirane teksturne i senzorne karakteristike nosača primenjenog za isporuku, što se direktno odražava na komplijansu savremenog pacijenta (Pantelić, 2013). Poznato je da izbor podloge ili vehikuluma ima značajan uticaj na dermalnu ili transdermalnu isporuku lekovite supstance koja je u nju inkorporirana (Otto i sar., 2009). Iz tog razloga, prilikom formulacije leka koji se primenjuje na koži treba razmotriti više kriterijuma, generalno grupisanih kao: *i*) farmaceutsko-tehnološki, *ii*) biofarmaceutski i *iii*) kozmetički/kozmetološki (Surber i sar., 2001).





**Slika 1.2.** Prikaz mehanizama penetracije kroz kožu (preuzeto i prilagođeno iz referenci Alexander i sar., 2012; Elias, 1983).

Prema najnovijoj klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije, dostupnoj u 25-om izdanju vodiča za ATC klasifikaciju i DDD dodelu (Guidelines for ATC classification and DDD assignment, 2021), kortikosteroidi za lokalnu terapiju su prema jačini dejstva grupisani u 4 grupe na sledeći način (WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, Norwegian Institute of Public Health, ažurirali su podatke 01.01.2022.):

- ❖ Slabi (grupa I): metilprednizolon, hidrokortizon, prednizolon.
- ❖ Umereno jaki (grupa II): klobetazon, hidrokortizonbutirat, flumetazon, fluokortin, fluperolon, fluorometolon, flupredniden, desonid, triamcinolon, alklometazon, hidrokortizonbutirat, deksametazon, klokortolon, kombinacije kortikosteroida.
- ❖ Jaki (grupa III): betametazon, fluklorolon, dezoksimetazon, fluocinolonacetonid, fluokortolon, diflukortolon, fludroksikortid, fluocinonid, budesonid, diflorazon, amcinonid, halometazon, mometazon, metilprednizolonaceponat, beklometazon, hidrokortizonaceponat, flutikazon, prednikarbat, difluprednat, ulobetazol.
- ❖ Vrlo jaki (grupa IV): klobetazol, halcinonid.

## ***1.2. Sastav i karakteristike film-formirajućih sistema***

Polimerni sistemi u obliku tečnih (film-formirajući (FF) rastvori i film-formirajuće emulzije) ili polučvrstih oblika doziranja (film-formirajući gelovi) su ocenjeni kao noviji, obećavajući nosači za produženu i ciljanu (trans)dermalnu isporuku lekovitih supstanci. Mogu biti veoma pogodni za lokalnu primenu na koži i dermalnu isporuku hidrofилnih, a posebno lipofilnih lekovitih supstanci. Među njima, film-formirajući sistemi (FFS) obrazuju *in situ* tanke i transparentne polimerne filmove nakon evaporacije rastvarača na površini kože (Ammar i sar., 2013; Frederiksen i sar., 2015; Garvie-Cook i sar., 2015; Gennari i sar., 2019; Misra i sar., 1996; Pünnel i Lunter, 2021; Schroeder i sar., 2007a), koja ima prosečnu površinsku temperaturu između 28 i 32 °C.

FFS se zbog svojih brojnih prednosti (pre svega lakoće primene, odsustva okluzivnih svojstava, brzog sušenja i obrazovanja *in situ* gotovo nevidljivog, transparentnog, kozmetički kompaktnog filma na koži, posedovanja visokog solubilizacionog kapaciteta za lipofilne i hidrofилne API, manje učestalosti doziranja u odnosu na konvencionalne polučvrste preparate, smanjenja iritacije i rizika od sistemske toksičnosti, omogućavanja produženog i kontrolisanog oslobađanja lekovite supstance formiranjem rezervoara u i/ili na koži i poboljšanja biofarmaceutskih performansi i adherence pacijenata) intenzivno istražuju kao potencijalni nosači lekova za različite puteve primene (Ammar i sar., 2013; Frederiksen i sar., 2015; Gennari i sar., 2017; Kathe i Kathpalia, 2017; Schroeder i sar., 2007a; Tran i Tran, 2019; Yang i sar., 2020). Precizni i efikasni FFS obezbeđuju veliki potencijal za kontrolisanu isporuku API u ili kroz kožu sa kombinovanim prednostima konvencionalnih farmaceutskih oblika (najčešće rastvora za kožu, emulzija za kožu ili hidrofилnih gelova) i filmova (Tran i Tran, 2019). Lakoća primene i poželjna kozmetička svojstva FFS sa aspekta da se brzo suše, manje zamašćuju ili su potpuno nemasni na koži i gotovo nevidljivi nakon aplikacije, čine ih superiornijim u odnosu na konvencionalne farmaceutske oblike, naročito polučvrste konzistencije (Asasutjarit i sar., 2020; Schroeder i sar., 2007a). Ovo je posebno izraženo u lečenju hroničnih kožnih oboljenja, s obzirom da je stalni kontakt FFS sa kožom tokom čitavog perioda primene od presudne važnosti. S druge strane, manja učestalost doziranja FFS se može postići povećanjem vremena kontakta i/ili održavanjem isporuke lekovite supstance na mestu delovanja formiranjem njenog rezervoara u ili na koži (Ammar i sar., 2009; Frederiksen i sar., 2015).

Pored primene u oblasti farmacije, polimerni film-formirajući sistemi se intenzivno koriste u sastavu različitih kozmetičkih proizvoda, pre svega zahvaljujući sposobnosti da indirektno hidratišu kožu, stvaraju lubrikantni film na koži, poboljšaju prolazak kozmetički aktivnih supstanci u dublje slojeve kože bez prodora u sistemsku cirkulaciju, pružajući tzv. efekat druge kože (Kessler i sar., 2016; Pünnel i Lunter, 2021).

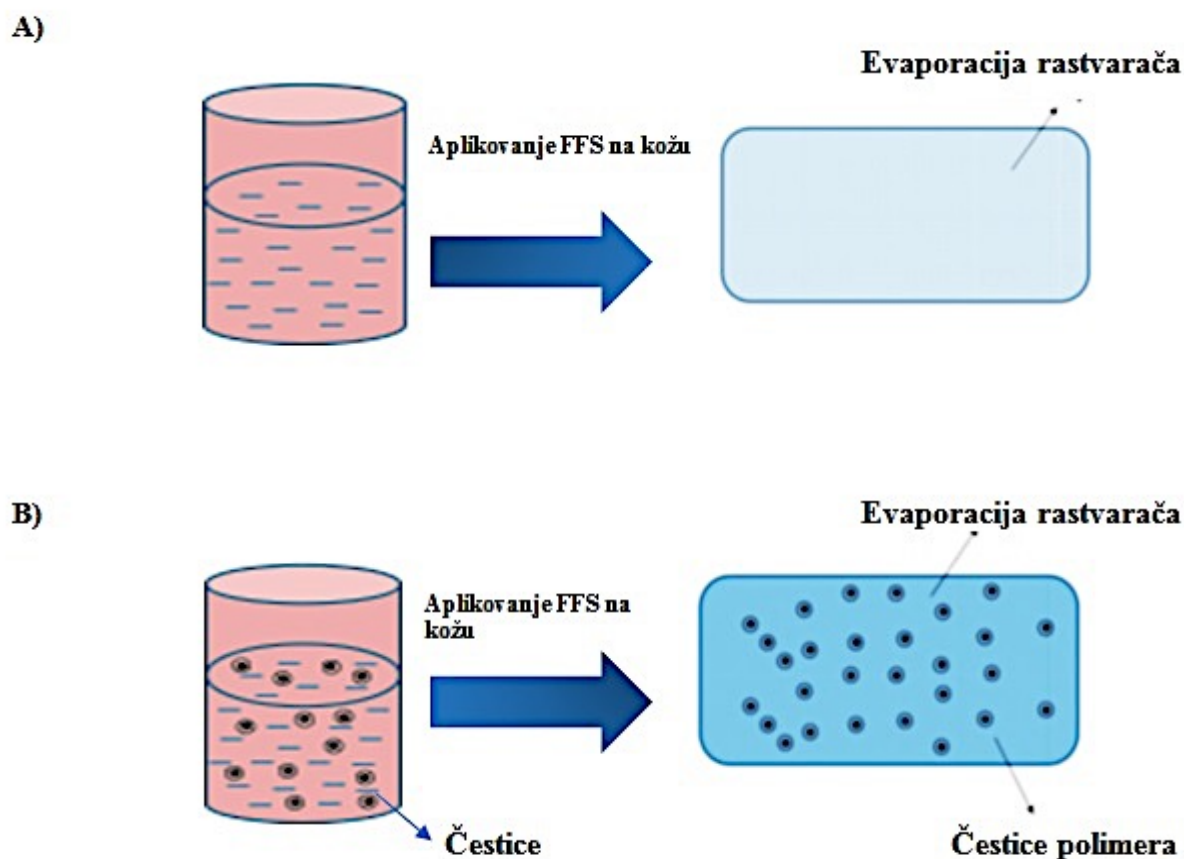
***FFS za dermalnu primenu u tečnom obliku***, mogu biti tipa rastvora, odnosno disperzija koje u svom sastavu sadrže sledeće osnovne grupe ekscipijenasa:

1. ***Polimere***, ili kombinacije polimera;
2. ***Plastifikatore***;
3. ***Organske rastvarače***;
4. Sa opcionim dodatkom:
  - ❖ *inhensera penetracije i*

- ❖ *lipidnih ekscipijenasa* (poput triglicerida srednje dužine lanca (engl. *medium-chain triglycerides*, MCT))

koji doprinose povećanom i produženom oslobađanju lekovite supstance (Frederiksen i sar., 2015; Garvie-Cook i sar., 2015).

Prvi i odlučujući faktor u razvoju i dizajnu polimernih FFS je izbor adekvatnog polimera, koji je odgovoran za karakteristike rezultujućeg filma, ali može da izazove i određene efekte na koži (Bodratti i Alexandridis, 2018). Pored toga što treba da poseduje dobra film-formirajuća svojstva i da ne iritira kožu, polimer mora biti rastvorljiv u rastvaraču prihvatljivom za primenu na koži (Schroeder i sar., 2007a). Rastvorljivost polimera u organskim rastvaračima je obično viša nego u prečišćenju vodi, te iako je prisustvo organskih rastvarača manje poželjno za kožu, ali i životnu sredinu, brza isparljivost organskih rastvarača dovodi do kraćeg vremena sušenja FFS i obrazovanja kontinuiranog filma. Etanol je obično rastvarač izbora u ovakvim formulacijama, a FDA prihvata sadržaj od > 95% ovog anhidrovanog rastvarača za primenu u topikalnim rastvorima.



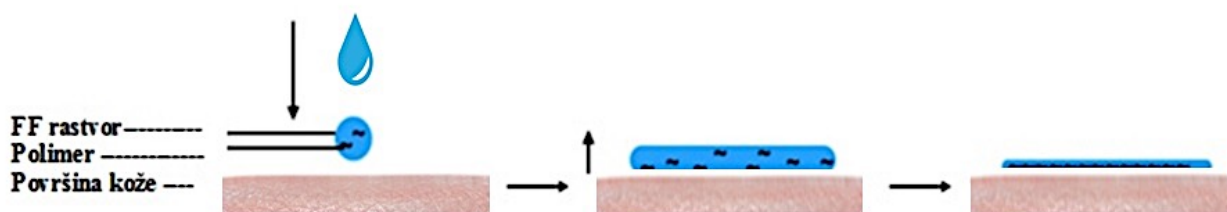
**Slika 1.3.** Ilustracija formiranja filma iz FFS (A) u obliku rastvora ili (B) disperzije čestica (različitih asocijata) polimera (preuzeto i prilagođeno iz Tran i Tran, 2019).

Osim toga, korišćeni rastvarač mora biti u dovoljnoj meri kompatibilan sa kožom i ne sme dovesti do značajne iritacije kože tokom procesa evaporacije. Film-formirajući polimer mora biti u potpunosti rastvoren ili homogeno dispergovan u izabranom rastvaraču (Kathe i Kathpalia, 2017).

Kada je FFS u obliku rastvora, polimer može da uspostavi bliske molekulske interakcije koje su ključne za nastanak filmova glatke površine. Suprotno, koalescencija čestica nakon

isparavanja rastvarača iz disperzija FFS može rezultirati filmovima grublje, neravne površine (Altmann i sar., 2014) (slika 1.3.). Iz polimernih rastvora obrazovanje filma se odvija brzom evaporacijom rastvarača i interpenetracijom individualnih polimernih lanaca, tako da nastali tanki, transparentni film uspešno adherira za kožu (slika 1.4.). Ova faza interpenetracije lanaca između ostalog zavisi i od viskoziteta rastvora, što je svojstvo koje ukazuje na hidrodinamičku interakciju između polimera i rastvarača koja se odvija pri definisanoj koncentraciji polimera (Felton, 2013; Lecomte i sar., 2004; Siepmann i sar., 2008). Naravno, sa porastom koncentracije polimera, takođe se povećava i viskozitet rastvora. Viskoizitet dodatno zavisi od molekulske mase polimera, te njeno povećanje očekivano rezultira i većim viskozitetima na datoj temperaturi.

Naravno, nakon evaporacije rastvarača do obrazovanja filma dolazi i iz polimernih disperzija. Međutim, u tom slučaju prvo mora doći do koalescencije i izvesne deformacije pojedinačnih polimernih asocijata, kako bi u narednom koraku bila omogućena interpenetracija individualnih polimernih lanaca, što rezultuje obrazovanjem filma (Felton, 2013). Ovaj proces je usko povezan sa dimenzijama (tj. indeksom polidisperznosti) nastalih polimernih čestica, ali je tačka kritična za uspeh formiranja filma - temperatura. Naime, neophodno je da se evaporacija rastvarača desi na temperaturi većoj od minimalne temperature obrazovanja filma (engl. *minimum film forming temperature*, MFFT) da bi se garantovala željena koalescencija čestica. Vrednost MFFT zavisi striktno od tipa polimera i veličine čestica, tj. agregata polimera (Gennari i sar., 2019).

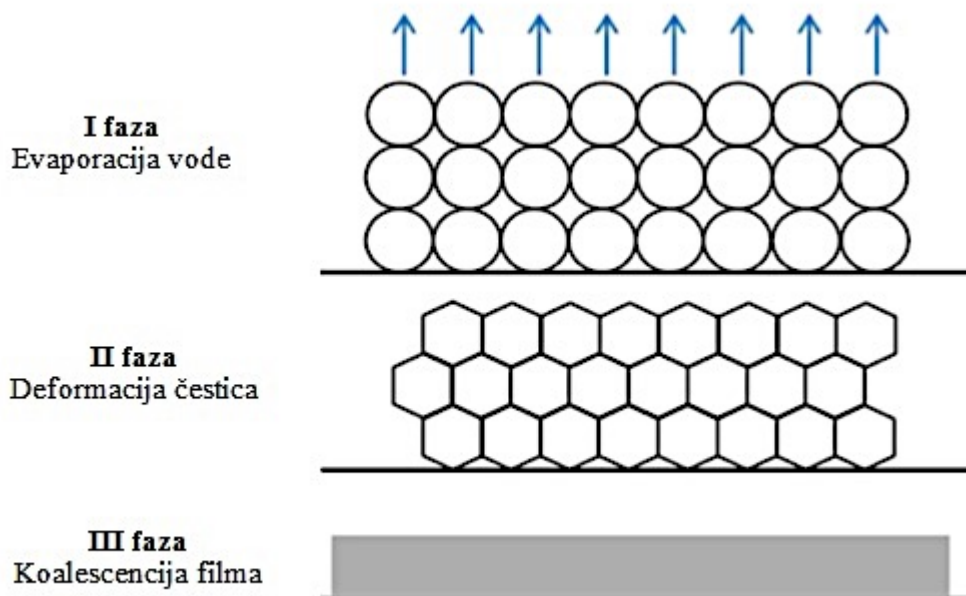


**Slika 1.4.** Ilustracija osnovnih faza procesa formiranja filma iz FFS u obliku rastvora (preuzeto i prilagođeno iz Pünnel i Lunter, 2021).

Specifično, kada je prisutna vodena disperzija polimera poput Eudragit® NE (prema proizvođačkoj specifikaciji u pitanju je 30% vodena disperzija) tada proces formiranja filma obuhvata 3 faze koje uključuju: evaporaciju vode, ireverzibilni kontakt i deformaciju čestica do koalescencije i nastanka filma, kao što je prikazano na slici 1.5. Ipak, ovaj mehanizam se zbog kompleksnosti procesa transformacije još uvek istražuje. Evaporacija vode se verovatno dešava tokom celokupnog procesa formiranja filma, počevši od sudaranja čestica na površini supstrata do intermedijernog stadijuma koji se završava koalescencijom i krajnjeg stadijuma formiranja filma kada voda evaporira difuzijom preko obrazovanog filma u gornjim slojevima, pri čemu u različitim fazama transformacije dolazi do varijacija u brzini evaporacije vode. U prvoj fazi brzina evaporacije vode je najveća, a zatim se progresivno smanjuje do finalnog stadijuma (Steward i sar., 2000; Vanderhoff i sar., 2007; Yang i Craig, 2020).

U FFS, polimeri mogu biti korišćeni samostalno ili u kombinaciji. Uspostavljena je osnovna razlika između FF polimera rastvorljivih u vodi i onih koji nisu rastvorljivi u vodi. Polimeri rastvorljivi u vodi imaju hidrofilni karakter i oni su uglavnom pogodni za formulacije iz kojih lekovita supstanca brzo penetrira u *stratum corneum*, gde se može obrazovati i svojevrsan rezervoar. Međutim, kod FF formulacija cilj je da se obezbedi rezervoar lekovite supstance u samoj formulaciji, te iz tog razloga sami hidrofilni polimeri često nisu pogodni, odnosno dovoljni. Nasuprot tome, polimeri nerastvorljivi u vodi formiraju vodotporni film sa visokom supstantivnošću na koži, ali su često kruti i nefleksibilni, što kompromituje ujednačenu adheziju za kožu i uzrokuje ljuškanje ili kidanje FF formulacija. Stoga, da bi se povećala uniformnost filma i

njegova fleksibilnost, obično se dodaju plastifikatori ili se kombinuju FF polimeri različite rastvorljivosti u vodi (de Oliveira i sar., 2020).



**Slika 1.5.** Ilustracija tri osnovne faze u procesu formiranja filma pripremljenog korišćenjem vodenih disperzija FF polimera (preuzeto i prilagođeno iz Yang i Craig, 2020).

U zavisnosti od broja strukturno ponavljajućih jedinica svi polimeri, pa i FF polimeri, se mogu podeliti u 2 velike grupe: homopolimere i heteropolimere (kopolimere). Polimeri ili makromolekuli su molekuli velike molarne mase koji nastaju u polimerizacionim reakcijama putem pretežno *kovalentnog vezivanja* velikog broja malih molekula tj. monomernih, ponavljajućih jedinica. Obično su u osnovnom lancu prisutne grupe poput alkana, estera, karbonata, arila, silana, amida i imida, dok su alkoholi, karboksilne kiseline i amini često zastupljeni u bočnim grupama. Postoji određena sličnost između polimera i koloidnih (disperznih) sistema u pogledu same veličine čestica (1-100 nm), kao i izvesnih fizičkih karakteristika poput sedimentacije, difuzije i sposobnosti rasipanja svetlosti. Pa ipak, bitno je istaći da za razliku od koloidnih sistema kod kojih usled promene rastvarača može doći do agregacije čestica i narušavanja same strukture sistema, kod polimernih sistema to nije slučaj, te sama promena rastvarača može usloviti isključivo promenu pojedinih svojstava makromolekula, ne narušavajući time njihovu makromolekularnu strukturu. Ovo se upravo i objašnjava prisustvom izuzetno jakih kovalentnih veza (Marjanović-Čirić, 2013).

Generalno, polimeri se prema svom poreklu klasifikuju na prirodne, sintetske i modifikovane.

Prirodni polimeri se dalje mogu klasifikovati na :

1. **Organske biopolimere** poput želatine, kolagena, hijaluronske kiseline, celuloze, alginata, kazeina, keratina, miozina, fibroina, hondroitin sulfata, hitozana, nukleinskih kiselina, i dr.
2. **Neorganske polimere** poput hidroksiapatita, kalcijum sulfata, kalcijum karbonata, tetrakalcijum fosfata,  $\alpha$ -trikalcijum fosfata,  $\beta$ -trikalcijum fosfata, alumosilikata i dr.

Polimerni lanci makromolekula biološkog porekla su obično kruti, dok sintetski polimeri poseduju fleksibilnije lance. Za razliku od bioloških polimera koji najčešće sadrže više različitih tipova monomernih jedinica koje se ponavljaju uzastopno, sintetski polimeri obično sadrže svega jedan do dva ili nekoliko tipova ponavljajućih monomernih jedinica u svom lancu (Marjanović-Ćirić, 2013).

Na osnovu svoje strukture polimeri mogu biti: linearni, razgranati sa kratkim i dugim granama, umreženi ili lestvičasti. Veće dužine lanaca tj. veće molarne mase polimera determinišu i veći broj interakcija i međusobnih preplitanja fleksibilnih lanaca u materijalu. Ova odlika karakteriše veću čvrstoću, elastičnost i niz drugih svojstava polimernih ekscipijenasa. Osim toga mehaničke karakteristike polimernih molekula zavise od gustine unutrašnjih polja interakcija unutar ovako specifičnih tzv. „mikro-termodinamičkih“ sistema ili unutar materijala u celini. Zbog toga se svojstva materijala određuju kao zbirni efekat mnoštva različitih interakcija. Međutim, sa druge strane, kada su polimerni lanci isuviše dugi, njihova fluidnost donekle opada što otežava oblikovanje materijala u željene, krajnje proizvode. U tipičnoj lančastoj strukturi polimera, prostorna organizacija i fleksibilnost lanaca kao i njihova dužina (tj. molarna masa) determinišu važne karakteristike svakog FF polimera. Tipične vrednosti molarne mase za linearne polimere kao biomaterijale se kreću u opsegu od 25,000-100,000 relativne molekulske mase. Optimalnim molarnim masama za farmaceutsku primenu obično se smatraju one u opsegu od 50,000-300,000 (Balać i sar., 2010).

Nadalje, **temperatura staklastog prelaza ili temperatura prelaska u staklasto stanje  $T_g$**  (°C) (engl. *glass transition temperature*) definisana kao temperatura na kojoj ili iznad koje molekularna struktura ispoljava makromolekularnu pokretljivost predstavlja suštinsko svojstvo u pogledu karakterizacije termalne aktivnosti polimera, a odnosi se samo na amorfni deo polukristalnog materijala tj. polimere amorfne (neuređene) strukture.  $T_g$  predstavlja meru jačine interakcija između polimernih lanaca. Na nižoj temperaturi amorfni delovi polimera su u staklastom stanju gde su molekuli pretežno fiksirani. Doduše, oni i tada mogu neznatno da vibriraju, ali izostaje kretanje određenih delova molekule. Kada su amorfni delovi polimera u staklastom stanju, polimer će uglavnom biti tvrd, sklon pucanju i krut. Pri postepenom zagrevanju polimer gradijalno dostiže temperaturu staklastog prelaza. Pri toj temperaturi delovi molekula počinju postepeno da se pokreću i polimer prelazi u stanje nalik gumi, tj. postaje mekan i savitljiv. Raspoređenost većeg broja polimernih lanaca čini intermolekulsku strukturu materijala, kao što su kristali i polimerne mreže (poput hidrogela). Inače, sintetski polimeri mogu da grade veoma sitne submikroskopske kristale koji mogu biti pločasti ili vlaknasti (Balać i i sar., 2010).

Dalja karakterizacija polimera ukazala je da je reč o ekscipijensima koji potencijalno ispoljavaju anti-nukleacionu aktivnost, tj. mogu da odlože kristalizaciju lekovite supstance tokom dovoljno dugog vremenskog perioda da bi se na taj način postigla poboljšana isporuka. Izraz „nukleacija“ definiše stvaranje supramolekulskih agregata molekula kristalizirajuće materije, nukleusa, koje se u sledećoj fazi povećavaju do nastanka makroskopskih kristala, što se naziva rastom kristala. Stoga će ispitivanje efekta polimera na samu isporuku lekovite supstance, kao i stabilizaciju superzasićenih filmova biti presudno u poboljšanju dizajna ovakvih tipova formulacija (Edwards i sar., 2017).

Prema dosadašnjem stanju tehnike u razvoju FFS ispitivani sa različiti polimeri (npr. akrilati, akrilat/oktilakrilamid kopolimeri, poliuretan-akrilati, hitozan, derivati celuloze, poli(vinil piroolidoni), polivinilpirolidon/vinilacetat kopolimeri, poliizobutileni, silikoni i mnogi drugi) (Frederiksen i sar., 2015; Schroeder i sar., 2007a). Među njima, čini se da je upotreba metil metakrilatnih kopolimera od posebnog interesa za oblast farmacije (Ammar i sar., 2013; Cilurzo i sar., 2014; Frederiksen i sar., 2015; Garvie-Cook i sar., 2015; Lunter i Daniels, 2012).

Gennari i sar. (2017) su ispitivali FFS na bazi polimera Eudragit® RL (amonijum metakrilat kopolimer u koncentraciji 10, 20 ili 30 %, m/m) i posledični efekat rastvarača na određena tehnološka i biofarmaceutska svojstva FFS, uključujući smeše izopropil alkohola i acetona u različitim odnosima (90:10, 80:20, 70:30, 60:40 %, V/V) sa ili bez odabranog plastifikatora.



Ponašanje optimalnih formulacija je dalje razmatrano ispitivanjem permeacije na koži tri različite lekovite supstance: flurbiprofena, ibuprofena i ketoprofena u koncentraciji od 4 % (m/m).

S druge strane, istraživačka grupa prof. Dominique Lunter okrenula se razvoju film-formirajućih emulzija, što je zahtevalo prilagođavanje određenih metoda karakterizacije, poput ispitivanja supstantivnosti i permeabilnosti ovih formulacija (Lunter i Daniels, 2013; Lunter i sar., 2014; Rottke i sar., 2014).

Većina polimetakrilatnih polimera je komercijalizovana i prepoznatljiva pod trgovačkim nazivom Eudragit<sup>®</sup> koji danas predstavlja zaštitni brend kompanije Evonik Industries AG (Darmstadt, Nemačka). Oficinalni su prema Američkoj (USP-NF), Britanskoj (BP) i Evropskoj farmakopeji (Ph. Eur.). Njihova prva komercijalna primena je započela 1950-tih godina. Tako su 1954. godine plasirana prva dva sintetska polimera - Eudragit L i Eudragit S namenjena za oblaganje tableta filmom koji je bio znatno poboljšanog kvaliteta u odnosu na do tada korišćene materijale za oblaganje kao što su šećeri i šelak. Uvođenje vodenih disperzija Eudragit-a 1972. godine predstavlja glavnu prekretnicu u tehnici oblaganja koja postaje jednostavnija, bezbednija i ekonomičnija.

Pored naziva Eudragit, polimetakrilati su poznati i pod ostalim različitim trgovačkim nazivima kao što su Acryl-EZE, Acryl-EZE MP, Eastacryl 30D; Kollicoat MAE 30 D; Kollicoat MAE 30 DP; ili kao polimerni metakrilati. Dobijaju se polimerizacijom akrilne i/ili metakrilne kiseline ili njihovih estara, a dostupni su na tržištu u obliku praškova, vodenih disperzija ili rastvora organskih rastvarača. Suvi praškovi su stabilni u vremenskom periodu tokom najmanje 3 godine, pod uslovom da se čuvaju u dobro zatvorenim kontejnerima na temperaturi nižoj od 30 °C; dok je za disperzije preporuka da se čuvaju na temperaturi između 5 i 25 °C, u vremenskom periodu od oko 18 meseci. Prema poreklu i sastavu, polimetakrilati najčešće mogu biti sintetski anjonski ili katjonski polimeri dimetilaminoetil metakrilata, metakrilne kiseline i estara metakrilne kiseline u različitom odnosu (Patra i sar., 2017). Polimetakrilati uključuju, mnoge kopolimere estara akrilne i/ili metakrilne kiseline sa različitim fizičko-hemijskim svojstvima prema funkcionalnim grupama (tabela 1.1.).

Eudragit<sup>®</sup> NE 30D, NE 40D i NM 30 D predstavljaju vodene disperzije neutralnog kopolimera (30%, 40% i 30%, respektivno) na bazi etil akrilata i metil metakrilata. Dostupni su u obliku tečnosti niskog viskoziteta, mlečno-bele boje i karakterističnog mirisa. Sve tri navedene vrste imaju MFFT od 5 °C. Po svojstvima su visoko fleksibilni, pa obično ne zahtevaju korišćenje plastifikatora. Druga prednost koja se ističe je da se koriste u formulacijama preparata za kontrolisano oslobađanje koji su nezavisni od pH vrednosti gastrointestinalnog trakta. Osim toga, veličina koloidnih čestica navedene grupe polimera je dovoljno niska (oko 100 nm) da obezbedi kompletnu fuziju između čestica i omogući nastanak uniformnog i homogenog filma (Fahier, 2016).

**Tabela 1.1.** Osnovna fizičko-hemijska svojstva odabranih polimetakrilatnih polimera (Skalsky i Petereit, 2008).

Tip polimera	Molarna masa (g/mol)	Tg (°C)	MFFT (°C)
Eudragit® NE	~ 800 000	~ 9	5
Eudragit® NM	~ 600 000	~ 11	5
Eudragit® E	~ 47 000	~ 48	
Eudragit® RS	~ 30 000	~ 65	~ 45
Eudragit® L	~ 123 000	~ 110	~ 25

Važno je napomenuti da polimetakrilatni polimeri (iz Eudragit® linije) poseduju pogodna svojstva za FFS jer ispoljavaju visoku fleksibilnost, kompatibilnost na koži i kontrolisano oslobađanje lekovitih supstanci. Nakon višedecenijske upotrebe u formulacijama za različite puteve primene, polimetakrilati su generalno ocenjeni kao stabilni, netoksični i neiritirajući materijali.

Tako se u farmaceutskim oblicima namenjenim za oralnu primenu kao što su tablete i kapsule polimetakrilatni polimeri najčešće primenjuju kao sredstva za oblaganje koja omogućavaju kontrolisano i produženo oslobađanje lekovite supstance, ali i kao sredstva za maskiranje gorkog ili generalno neprijatnog ukusa, sredstva za poboljšanje čvrstoće i kao vezivna sredstva u tabletama. U preparatima za oralnu primenu, doza od 2 mg/kg telesne mase smatra se bezbednom za upotrebu i prema FDA zadovoljavajuća je za ekscipijense u oralnim tabletama i kapsulama. Ova doza se često sreće i na listama prihvatljivih neaktivnih sastojaka za neparenteralne lekove koji su odobreni u Velikoj Britaniji i Kanadi (Patra i sar., 2017).

S druge strane, poznato je da je upotreba *polimetilmetakrilata* (PMMA) kao netoksičnih materijala uvedena u stomatologiju još davne 1937. godine. Kasnije, krajem 1960-tih i početkom 1970-tih godina, počinje intenzivno ispitivanje i istraživanje različitih potencijalnih „biomaterijala“ za korišćenje u medicinske i stomatološke svrhe, među kojima su dosta zastupljeni i polimeri. Tada se možda i prvi put pominje izraz „biomaterijali“. Polimeri se pretežno koriste kao biomaterijali za zamenu mekih tkiva u kardiovaskularnoj i plastičnoj hirurgiji. Međutim polimeri se mogu koristiti i za zamenu koštanih tkiva kada se u kombinaciji sa metalima koriste za izradu veštačkog kuka. Takođe, kombinovana primena polimera sa drugim materijalima se primenjuje u izradi srčanih zalistaka gde se polimeri kombinuju sa metalima i materijalima na bazi ugljenika. Danas je upotreba PMMA dosta zastupljena u izradi veštačkih očnih sočiva koja se koriste za zamenu prirodnih sočiva usled zamućenosti ili katarakte (Ratner i sar., 2004).

Polimeri kao široko zastupljeni biomaterijali u medicinskoj praksi mogu biti:

- *Nedegradabilni sintetski,*
- *Biodegradabilni prirodni i sintetski, i*
- *Bioderivativni prirodni i sintetski.*

Sa aspekta medicinske upotrebe najvažnija svojstva koja ih karakterišu su: biokompatibilnost na koži, netoksičnost, kohezija sa okolnim tkivom kostiju, niska cena ali i druge specifične karakteristike poput potencijalne bioaktivnosti, zatim mogućnost bioapsorpcije (tj. biorazgradivosti), otpornosti na infekcije, na stvaranje tromba i dr. Tako se npr. iz grupe jeftinijih nedegradabilnih sintetskih polimera izdvajaju *poliamidi* i *poliolefini* koji se koriste kao materijali za hirurške konce; zatim *poliestri* kao materijali za krvne sudove (bajpasove); *poliformaldehidi* za matrice srčanih zalistaka; *polivinilhlorid* za cevčice u sastavu kesa za krv. Iz grupe nedegradabilnih sintetskih polimera koji imaju veću cenu izdvajaju se *polimetilmetakrilati* koji se



koriste za izradu kontaktnih sočiva; *poliuretani* za katetere i veštačke srčane mehurove; dok su silikoni često zastupljeni u rekonstruktivnoj hirurgiji; a *hidrogelovi* se koriste za kontaktna sočiva i kateterske prevlake. Iz grupe bioderivativnih polimera koji generalno pokazuju i visoku reproduktivnost najčešće se koriste: *hitozan* za formulacije za oblaganje rana; *kolagen* za implantate mekih tkiva i oblaganje rana, zatim razne prevlake; *elastin* se takođe koristi za prevlake, dok se *umreženi želatin* koristi za specijalne prevlake veštačkih srčanih mehurova. Iz grupe biodegradabilnih prirodnih i sintetskih polimera najčešće se koriste: *umreženi kolagen* u rekonstruktivnoj hirurgiji i za prevlake krvnih sudova; zatim *kopolimeri polimlečne/glikolne kiseline* za hirurške konce i koštane ploče; *umreženi albumin* za prevlake krvnih sudova, poliaminokiseline i polianhidridi za kontrolisano izlučivanje i dr. (Balać i sar., 2010).

Posebno važnu ulogu i široku primenu u kardiohirurškoj i ortopedskoj hirurgiji imaju polimeri u preparatima za prevenciju i lečenje bakteriološki-rezistentnih bolničkih infekcija na mestu samog operativnog zahvata ili nakon izvedene intervencije, koje se dešavaju u post-operativnom ili post-interventnom vremenskom periodu unutar 30 dana od same procedure ili operativnog zahvata. Registrovani patentni pronalazak pod brojem EP 3 200 748 B1 objavljen 27.10.2021. opisuje jedan takav sastav u obliku biorazgradivog impregniranog supstrata namenjenog za produženo i kontrolisano oslobađanje lekovite supstance iz grupe antibiotika – doksiciklina ili doksiciklin-hiklata, čija je površina obložena sastavom matrice na bazi dve vrste lipida sa biorazgradivim polimerom. Polimer je izabran iz grupe biorazgradivog poliestra koji se sastoji od polimlečne kiseline (PLA), poliglikolne kiseline (PGA), ili poli(mlečne-ko-glikolne kiseline (PLGA). "PLA" se odnosi na poli(L-laktid), (poli(D-laktid) i poli(DL-laktid), gde se biorazgradivi poliestar može koristiti u rasponu koncentracija od 5-30%. Prvi lipidni sastojak je odabran iz grupe sterola – holesterola koji je nekovalentno povezan sa biorazgradivim poliestrom, dok je drugi lipidni sastojak najmanje jedan fosfolipid izabran od fosfatidilholina. Biorazgradivi mineralni supstrat je bioapsorbujući hidrofobni materijal u obliku granula trikalcijum fosfata sastavljenih od  $\alpha$ -trikalcijum fosfata ( $\alpha$ -TCP) i  $\beta$ -trikalcijum fosfata ( $\beta$ -TCP). Supstrat može biti i sintetski polimer rastvorljiv u vodi, kao što je na primer polivinilalkohol (PVA), polivinilpirolidon (PVP), poliakrilna kiselina (PAA), N-(2-hidroksipropil) metakrilamid (HPMA), poli(2-alkil-2-oksazoloni), polifosfoestri (PPE), polifosfati i polifosfonati, sa napomenom da je sintetički supstrat samo deskriptivno opisan u prijavi pronalaska, i ne predstavlja deo zahtevanog pronalaska.

Postupak izrade ovog preparata se sastoji od sledećih faza:

*Faza I* Biorazgradivi polimer i prva lipidna komponenta (npr. sterol) mešaju se sa isparljivim organskim rastvaračem da bi se dobio rastvor ili suspenzija polimerne matrice zasićene lipidima;

*Faza II* Aktivni agens i druga lipidna komponenta (npr. najmanje jedan fosfolipid) mešaju se sa drugim isparljivim organskim rastvaračem da bi se dobio drugi rastvor ili suspenzija;

*Faza III* Dva rastvora ili suspenzije se kombinuju i mešaju dok se ne postigne ravnoteža;

*Faza IV* Mineralni supstrat se zatim meša sa dobijenim rastvorom iz faze III; i

*Faza V* Organski rastvarači se zatim uparavaju, dajući supstrat obložen i/ili impregniran sa polimernim matriksom zasićen lipidima koji sadrži lekovitu supstancu.

Navedeni preparat prema pronalasku ima dosta široku primenu te se može koristiti u čitavoj paleti terapijskih indikacija: kod hirurških operacija na kičmi, hirurških operacija digestivnih organa, kardijalnih zahvata, popravke kile, vaskularnih intervencija, carskog reza, prostatektomije, akušerskih i ginekoloških hirurških operacija, hirurgije karcinoma glave i vrata, operacija transplantacije, neurohirurgije i plastičnih operacija (EP 3 200 748 B1, datum patentne publikacije 27.10.2021). Patent je validiran u R. Srbiji.

Iako polimeri u farmaceutskim preparatima predstavljaju neaktivne sastojke, odnosno farmaceutske ekscipijense, njihov efekat na formulacione i procesne parametre FFS, kao i ponašanje na koži, je presudan i može biti višestruk, otkrivajući njihov potencijal da budu multifunkcionalni materijali (Berkenkemper i sar., 2020), ili visoko funkcionalni ekscipijensi (van der Merwe i sar., 2020). Uprkos činjenici da su neki od polimera korišćenih tokom razvoja FFS dobro poznati ekscipijensi u farmaceutskim oblicima namenjenim za druge puteve primene (kao što je već spomenuto, upotreba Eudragit® polimera je postepeno proširena sa oralnih, čvrstih farmaceutskih oblika do sistema za lokalnu isporuku (Gennari i sar., 2017; Patra i sar., 2017)), evolucija formulacionih strategija je ukazala na potrebu za nizom novih informacija. U mnogim od dostupnih publikacija primetno je odsustvo podataka koji se odnose na bioadhezivna svojstva, te supstantivnost formulacija koje ih sadrže (Ammar i sar., 2009; Cilurzo i sar., 2014).

Nezavisno od izbora polimera, drugi važan faktor u razvoju FFS je izbor plastifikatora. Plastifikatori su klasifikovani u 2 osnovne grupe: na one rastvorljive u vodi kao što su trietil-citrat (TEC), triacetin, propilenglikol, polietilenglikol; i nerastvorljive u vodi kao što su dibutil-sebacat (DBS), dibutil-ftalat (DBF), acetiltriethyl-citrat (ATEC), tributil-citrat (TBC). Važno je napomenuti da se u skladu sa njihovom rastvorljivošću podešava i adekvatno vreme mešanja u prisustvu polimera. Generalno, plastifikatori rastvorljivi u vodi zahtevaju kraće vreme plastifikacije u odnosu na one koji nisu rastvorljivi u vodi, usled simultanog rastvaranja u vodenoj fazi i svojevrsne solubilizacije od strane prisutnog polimera (Siepmann i sar., 2008). Međutim, za optimalnu interakciju sa česticama polimera lipofilni plastifikatori zahtevaju vreme mešanja u opsegu od 5 h do 24 h nakon dodavanja vodene disperzije polimera. Plastifikator treba da penetrira kompletno u čestice polimera pre formiranja filma kako bi se postigla optimalna plastifikacija, najniža MFFT i visoka permeabilnost nastalog filma. Jedino na taj način će biti formiran homogen film (Lippold i sar., 1990; Lippold i sar., 1999).

Plastifikator ispoljava jak uticaj na svojstva nastalih filmova, rezultirajući u većoj fleksibilnosti, smanjenju krtosti, unapređenom integritetu filma, poboljšanoj adhezivnosti filma sa drugim površinama ili membranama (Briddick i sar., 2016; Wokovich i sar., 2006) i izvesnoj permeabilnosti filmova (Ammar i sar., 2009). Pored polimera, plastifikatori takođe doprinose isporuci leka kroz kožu ne samo smanjenjem  $T_g$  obrazovanih polimernih filmova već i povećanjem difuzije lekovite supstance (Frederiksen i sar., 2015). Tako se katjonski polimetakrilatni polimer Eudragit® RS sa visokom  $T_g$  (približno 65 °C) može inkorporirati sa plastifikatorom kao što je TEC da bi se snizila  $T_g$  polimera za primenu na koži i formiranje filma (Frederiksen i sar., 2015; Wagner i sar., 2005).  $T_g$  je od velikog značaja za oslobađanje lekovitih supstanci (Jenquin i sar. 1990), stabilnost formulacije (Felton i sar., 2001; Fujimori i sar., 2002) i njena mehanička svojstva (Felton i sar., 2001, Wesseling i sar., 1999). Kada je FF formulacija u obliku rastvora, prisustvo plastifikatora povećava slobodni volumen i olakšava pokretljivost lanaca polimera, smanjujući njegovu  $T_g$ , i na taj način poboljšava oslobađanje lekovite supstance (Ammar i sar., 2009; Frederiksen i sar., 2015; Mahnaj i sar., 2011). Kada je FF formulacija u obliku disperzije, plastifikator olakšava i ubrzava koalescenciju polimernih čestica dovodeći do formiranja kontinuiranog i debljeg filma, sa obično produženim profilom oslobađanja (Frederiksen i sar., 2015; Rao i sar., 1997).

Bez obzira da li je lek namenjen za dermalnu ili transdermalnu primenu, mora biti sposoban da dobro penetrira u/kroz *stratum corneum*. API sa pretežno lipofilnim karakterom obično penetriraju u kožu bolje od hidrofilnih lekovitih supstanci, s obzirom da je matriks *stratum corneum*-a takođe lipofilnog karaktera. Tipično, API koji su namenjeni za transdermalnu isporuku su umerene lipofilnosti (vrednost log P je u opsegu od 1 do 5, idealno između 1 i 3). Molekulska masa takođe, ima odlučujuću ulogu, s obzirom da male molekule odlikuje velika brzina difuzije (Mr je u idealnom slučaju < 500 Da). Ove API treba da imaju nisku tačku topljenja ( $T_t$  < 250 °C), a terapijska doza koja treba da bude transdermalno isporučena na dnevnom nivou da bude manja od 10 mg (Alberti i sar., 2005; Guy i Hadgraft, 1985; Hearnden i sar., 2012; Pastore i sar., 2015; Subedi i sar., 2010).

Sledeće važno svojstvo lekovite supstance koje treba uzeti u obzir prilikom razvoja FF formulacije je rastvorljivost. Ako se nosač FF formulacija uglavnom sastoji od organskog rastvarača, lekovita supstanca u njemu mora biti rastvorljiva. Usled evaporacije isparljivog rastvarača, povećava se i koncentracija lekovite supstance u formulaciji. Tokom ovog procesa lekovita supstanca ne sme da kristališe, te je isto tako važna njena dovoljna rastvorljivost i u neisparljivim komponentama formulacije. Studije su pokazale da formulacije sa rastvorenim lekovitim supstancama treba da imaju pH vrednost od 5 do 10 (Alberti i sar., 2005). pH vrednost same kože je oko 5, tako da pH vrednost formulacije treba biti u ovom opsegu da bi se izbegla iritacija kože tokom primene. Optimalnom pH vrednošću formulacije koja poboljšava (ili bar ne inhibira) penetraciju lekovite supstance smatra se ona veća od 7. Stoga se raspon pH vrednost od 5 do 10 smatra svojevrsnim kompromisom (Bucher i Walz, 1979; Matousek i sar., 2003). Kako je cilj održati lekovitu supstancu u rastvorenom obliku i nakon obrazovanja filma, formirani film treba da bude homogen, bistar i fleksibilan (Woertz i Kleinebudde, 2015a).

Ipak, do kristalizacije i rasta kristala lekovite supstance može doći ukoliko njena koncentracija pređe granicu rastvorljivosti u polimeru, bilo nakon obrazovanja filma na koži ili tokom čuvanja leka (Woertz i Kleinebudde, 2015b). Gubitkom isparljive komponente nosača, povećava se koncentracija lekovite supstance, dostižući ponekad i stanje (super)saturacije na površini kože. Supersaturacija može rezultirati poboljšanom isporukom lekovite supstance povećanjem termodinamičke aktivnosti formulacije bez uticaja na kožnu barijeru (Gennari i sar., 2019). Međutim, superzasićeni sistemi su inherentno nestabilni i ukoliko se odgovarajućim formulacionim parametrima ne spreči sledstvena precipitacija lekovite supstance, gube se sve prednosti ovakvog tipa sistema (Edwards i sar., 2017). Iz tog razloga, razvoj formulacije mora biti podržan odgovarajućim setom fizičko-hemijskih, odnosno termalnih i spektroskopskih metoda, kako bi se pratila promena termodinamičke aktivnosti leka, ali i eventualni doprinos molekularnih interakcija prisutnih ekscipijenasa tom fenomenu (Tran i Tran, 2020).

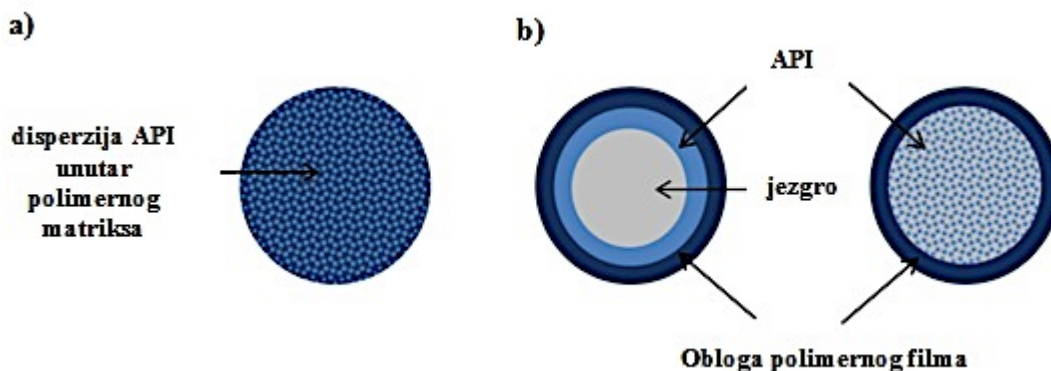
Slabo rastvorljive lekovite supstance mogu biti inkorporirane u FF formulacije suspendovanjem u pripremljenom vehikulumu (ili jednom njegovom delu) ili rastvaranjem i/ili solubilizacijom u odgovarajućem rastvaraču/smeši ekscipijenasa (Bhattacharjee i sar., 2014; Desai i sar., 2011, Kianfar i sar., 2012). Vodene nanosuspencije lekovitih supstanci slabo rastvorljivih u vodi su takođe, uspešno inkorporirane u FF sisteme, rezultujući na koži u vidu tankih filmova bez surfaktanata. Međutim, ovakve formulacije za sada pokazuju isključivo potencijal za brzo oslobađanje inkorporirane lekovite supstance (Krull i sar., 2015).

### ***1.3. Film-formirajući sistemi za kontrolisano oslobađanje lekovite supstance u različitim farmaceutskim oblicima***

FF formulacije predstavljaju noviji oblik dermalnih preparata sa produženim oslobađanjem lekovite supstance (Frederiksen i sar., 2015; Pünnel i Lunter, 2021).

Uopšteno, sistemi za kontrolisano oslobađanje lekovite supstance imaju za cilj da kontrolišu kinetiku oslobađanja aktivne supstance iz određenog oblika doziranja u jedinici vremena. Sistemi za kontrolisanu isporuku na bazi polimera koji su najčešće zastupljeni u čvrstim farmaceutskim oblicima za peroralnu primenu (poput peleta i granula) su podeljeni u 2 grupe:

1. *Sistemi matrice* gde je API dispergovan unutar polimerne matrice (slika 1.6.a);
2. *Sistemi tipa rezervoara* gde je API okružen polimernim filmom koji kontrolišu oslobađanje (slika 1.6.b).



**Slika 1.6.** Shematski prikaz a) sistema matrice i b) sistema rezervoara polimernih filmova kod čvrstih farmaceutskih oblika za (per)oralnu primenu (preuzeto i prilagođeno iz Fahier, 2016).

### 1. Sistemi matrice u čvrstim farmaceutskim oblicima

U sistemima matrice, lekovita supstanca može biti rastvorena ili dispergovana u polimernoj mreži (polimernom matriksu) tako da se dobije matrica sa kontrolisanim oslobađanjem lekovite supstance. Ovakvi sistemi obezbeđuju niz prednosti kao što su: lakoća izrade, niska cena i mogućnost inkorporiranja visoke količine (doze) API. Mogu se dizajnirati različiti tipovi sistema pa će samim tim i mehanizmi oslobađanja lekovite supstance očekivano biti različiti. Mnogi od polimera su formulisani u obliku *vodene koloidne disperzije* da bi se prevazišli problemi koji su povezani sa korišćenjem organskih polimernih rastvora, odnosno disperzija. Do oslobađanja lekovite supstance dolazi difuzijom iz homogenog matriksa ili difuzijom preko pora i/ili bubrenjem i/ili erozijom heterogenog matriksa (Dashevsky i sar., 2004; Fahier, 2016).

### 2. Sistemi tipa rezervoara u čvrstim farmaceutskim oblicima

Kod sistema tipa rezervoara zastupljenim u čvrstim farmaceutskim oblicima, API se nalazi u sloju oko jezgra ili je inkorporiran u hidrosolubilnoj smeši ekscipijenasa koja je u potpunosti obložena polimernim filmom. U zavisnosti od karakteristika polimera, mehanizmi oslobađanja lekovite supstance, te samim tim i profili oslobađanja, biće takođe različiti. Sistemi rezervoara mogu da poseduju: a) „izvor aktivnosti koji nije konstantan“, gde je koncentracija API u rezervoaru ispod saturacione; u tom slučaju lekovita supstanca je rastvorena, i molekule API koje se oslobađaju preko membrane se ne zamenjuju novim, tako da će se koncentracija API smanjivati tokom vremena (posledično, dobijaju se *in vitro* profili oslobađanja u skladu sa kinetikom prvog reda); i b) „izvor konstantne aktivnosti“, gde je API prisutan u višku i oslobođene molekule lekovite supstance se brzo zamenjuju rastvaranjem preostale količine nerastvorenog API. Na taj način, oslobađanje ostaje konstantno dokle god je raspoloživa dovoljna količina API u višku (*in vitro* profili oslobađanja prate kinetiku nultog reda). U ovom slučaju samo deo API je rastvoren usled njegove niske rastvorljivosti. Nakon prethodno objašnjenog, molekule lekovite supstance difunduju kroz polimerni film u skladu sa koncentracionim gradijentom (Lee i Li, 2010; Siepmann i Siepmann, 2012).

## 1.4. Noviji zahtevi regulatornih vodiča za topikalne preparate

Sa stanovišta najnovijih regulatornih vodiča u pogledu kvaliteta i ekvivalentnosti topikalnih proizvoda (CHMP/QWP/708282/2018), ciljani profili kvaliteta proizvoda moraju biti dopunjeni dodatnim podacima dobijenim putem specifičnih tehnika karakterizacije (Sanchez-Ballester i sar., 2020). Dinamička priroda FFS podrazumeva potrebu za definisanjem ciljanog profila kvaliteta proizvoda (engl. *quality target product profile*, QTPP), koji se može postići samo identifikacijom njihovih kritičnih atributa kvaliteta (engl. *critical quality attributes*, CQAs), tako da se relevantne karakteristike koje imaju uticaja na kvalitet mogu dalje istraživati i kontrolisati (Kis i sar., 2019; Kovács i sar., 2020).

„*Metamorfoza*“ ili *transformacija* formulacija film-formirajućih sistema za topikalnu primenu koja se odvija nakon aplikovanja FFS na koži je svojstvo od posebnog značaja, imajući u vidu da se karakteristike formulacije drastično menjaju nakon kratkotrajnog isparavanja i razmeštanja rastvarača na površini kože, omogućavajući generisanje rezidualnog filma na koži.

Važnost metamorfoze topikalnih formulacija prilikom primene je nedavno ozvaničena od strane Evropske agencije za lekove (EMA 2018) i to nacrtom gorepomenutog vodiča (pun naziv *Draft guideline on quality and equivalence of topical products*).

Do danas je ovo svojstvo bilo predmet interesovanja svega nekoliko grupa istraživača (Danby i sar., 2020; Fantini i sar., 2019; Frederiksen i sar., 2016; Surber i Knie, 2018). Pored standardnih aspekata koji se odnose na kvalitet, bezbednost i efikasnost preparata za topikalnu primenu, „*metamorfoza*“ ili *transformacija FFS zahteva posebnu procenu jer ona ima suštinski uticaj na brojne mehanizme koji utiču na dalje ponašanje sistema na koži (npr. precipitaciju inkorporiranog API) i njihovu stabilnost*.

Nezavisno od očiglednog uticaja na dermalnu raspoloživost, prepoznato je da značajna transformacija nosača lekovite supstance tokom i nakon primene, može drastično uticati na njegovu supstantivnost i taktilna svojstva (Danby i sar., 2020).

U zavisnosti od kinetike evaporacije ekscipijenasa, (1) *inicijalna ili primarna* formulacija se najpre transformiše u (2) *sekundarnu*, a zatim dalje do (3) *tercijarne (rezidualne)* koja ostaje na koži (Surber i Knie, 2018). Zahvaljujući kontrolisanim modifikacijama, povećava se termodinamička aktivnost lekovite supstance, što ide u prilog efikasnijoj penetraciji, te i bioraspoloživosti u odnosu na konvencionalne polučvrste i tečne farmaceutske oblike (Gennari i sar., 2019). Nažalost, regulatorne smernice ne preciziraju metode karakterizacije metamorfoze/transformacije formulacija. Nakon isparavanja isparljivih rastvarača kod ovakvih sistema postoje dve mogućnosti: 1. aktivna supstanca ostaje u rastvorenom stanju i formira superzasićeni sistem ili 2. kristališe usled čega se obično smanjuje brzina i stepen penetracije aktivnog sastojka. Stoga, održavanje superzasićenog stanja koje je stabilno u relevantnom vremenskom periodu je od presudne važnosti za efikasnost FFS. Prema nacrtu navedenog vodiča, procena dela performansi topikalnih proizvoda se izvodi *in vitro* ispitivanjem brzine oslobađanja ili *in vitro* ispitivanjem permeacije. S druge strane, ukoliko je potrebno sprovesti procenu ekvivalentnosti u pogledu efikasnosti (prisustvo ekscipijenasa koji mogu da utiču na performanse) umesto kliničkih studija, predlaže se korišćenje metoda za procenu kinetike permeacije (npr. *in vitro* ispitivanje permeacije kroz izolovanu humanu kožu). Osim fenomena transformacije i supersaturacije, moraju se razmotriti i drugi parametri kvaliteta koje treba idealno postići na finalnom stupnju razvoja proizvoda i proizvodnje, uzimajući u obzir kvalitet, efikasnost, bezbednost i prihvatljivost leka od strane pacijenata.

Trenutno dostupni ISO i ASTM standardi (npr. ISO 2014; ASTM 2017, 2018, 2020) odnose se na karakterizaciju tankih filmova pretežno namenski korišćenih u industriji boja i lakova. Bliže opisan Internacionalni standard ISO 2813:2014 odnosi se na boje i lakove, specificirajući postupak za određivanje sjaja prevlaka / premaza uz korišćenje tri geometrije, tj. uglova refleksije od 20°, 60° ili 85°. Sjaj je definisan kao optičko svojstvo površine sposobne da reflektuje svetlost, a sam princip merenja sjaja je baziran na merenju usmereno reflektovane svetlosti. U ovom kontekstu njen

intenzitet je meren u definisanom ugaoom polju oko ugla refleksije. Ova metoda je pogodna za merenje sjaja ne-teksturnih premaza, ali i sjaja metalnih premaza. Primeri stepena sjaja mogu biti: visokog sjaja, sjajan, svilenkastog sjaja, polu-sjajan, saten, mat i potpuno mat. Vrednost sjaja se izračunava kao odnos pomnožen sa 100 od svetlosnog fluksa reflektovanog iz uzorka prema onom reflektovanom od strane staklene površine sa indeksom refrakcije od 1,567, pri talasnoj dužini od 587,6 nm u spekularnom pravcu, za specifikovani ugao refleksije i specifikovane otvore uglova svetlosnog izvora i receptora (fotodetektora). Izražava se u svetlosnim jedinicama kao ceo broj (engl. *gloss unit* - GU). Da bi se odredio stepen sjaja, polirano tamno staklo kao referentni materijal sa indeksom refrakcije od 1,567, pri talasnoj dužini od 587,6 nm (centralnoj talasnoj dužini funkcije spektralne svetlosne efikasnosti) je pridruženo vrednosti 100 za geometrije 20°, 60° ili 85°. Vrednosti se mere reflektometrijskim aparatom na premazanim površinama, u korelaciji sa vizuelnom percepcijom sjaja, odnosno dobija se odnos sjaja premaza i sjaja polirane ravne staklene ploče sa specifikovanim referentnim indeksom refrakcije. Postupak merenja sjaja je određen sledećim parametrima: mernim uglovima, zonama otvora, spektralnom adaptacijom. Intenzitet reflektovane svetlosti zavisi od površine materijala i ugla refleksije. U skladu s ovim, premazane površine sa povećanim upadnim uglom reflektuju više svetlosti.

U zavisnosti od stepena sjaja površine korišćeni su sledeći merni uglovi:

- 20° geometrija za površine visokog sjaja;
- 60° geometrija za polu-sjajne površine;
- 85° geometrija za mat površine.

Prema navedenom standardu, za svaku vrednost sjaja mora biti označena i korišćena geometrija.

Sledeći opisani standard je ASTM standard: D3359-17 koji specificira standardnu test metodu za merenje adhezije tankih filmova pomoću trake i to adhezije relativno elastičnih filmova za metalne supstrate. Ova metoda se izvodi putem nanošenja i uklanjanja trake osetljive na pritisak preko useka ili proreza načinjenih na filmu. Koristi se isključivo za ocenu adhezije filma za supstrat, odnosno da li je adhezija adekvatna za namenjenu primenu. Ovaj standard je sličan po sadržaju sa ISO 2409, ali nije tehnički ekvivalentan. Dalje naveden ASTM standard (2018): D523-14 determiniše standardnu test metodu za spekularni sjaj. Sledeći, opisani ASTM standard (2020): D1005-95 determiniše standardnu test metodu za merenje debljine suvog filma formiranog od organskih premaza. Ova metoda se primenjuje za merenje debljine filmova boja, lakova i sličnih proizvoda korišćenjem mikrometra. Metodom su propisane procedure koje koriste stacionarne mikrometre (A i B), kao i procedure koje koriste ručne mikrometre (C, D). Procedure A i C se ne preporučuju za filmove čija je debljina manja od 12,5 µm. Minimalna debljina prema procedurama B i D je u funkciji one koja je potrebna da omogući uklanjanje uzorka kao slobodnog filma. Tako se procedura A odnosi na stacionarni mikrometar koji se nanosi na ravne površine; zatim procedura B se odnosi na stacionarni mikrometar za merenje slobodnih filmova; dok se procedura C odnosi na ručno-držeći mikrometar za merenje premaza aplikovanih na glatke i ravne površine i procedura D se odnosi na ručno-držeći mikrometar za merenje slobodnih filmova. Međutim, kako svi gore opisani i dostupni ISO i ASTM standardi koji se odnose na karakterizaciju tankih filmova uglavnom ne odgovaraju specifičnostima **dermalnih filmova za farmaceutsku primenu** (npr. ISO 2014; ASTM 2017, 2018, 2020), sveobuhvatna karakterizacija performansi FFS zahtevaće od istraživača u ovoj oblasti razvoj i/ili optimizaciju posebnih protokola ispitivanja.

Dalje, u pogledu karakterizacije jedno od najvažnijih funkcionalnih svojstava (trans)dermalnih terapijskih sistema je bioadhezivnost. Bioadhezija je definisana kao vezivanje (pripajanje) sintetskih ili bioloških makromolekula za biološko tkivo (Peppas i Buri, 1985). U sistemu izveštavanja o kvalitetu lekova, FDA je primila brojne izveštaje o „nedostatku adhezije“ transdermalnih terapijskih sistema (engl. *transdermal drug delivery systems*, TDDS). Adhezija TDDS je kritična za bezbednost, efikasnost i kvalitet proizvoda. Adhezija ili nedostatak adhezije je kritičan parametar koji se direktno odnosi na isporuku lekovite supstance i terapijsku efikasnost

leka. Stoga, samo konstantan kontakt terapijskog sistema sa kožom tokom čitavog perioda primene omogućava postojanu isporuku i resorpciju lekovite supstance (Ammar i sar., 2009; Minghetti i sar., 1999). Adhezija za kožu se odvija na međupovršini usled prisustva interatomskih i intermolekulskih privlačnih sila, obezbeđujući da se postigne prisni kontakt. Da bi se ostvario ovaj stepen kontakta film mora biti mekan i fleksibilan. Nakon početne adhezije, veza TDDS/koža se može izgraditi jačim interakcijama (npr. posredstvom vodoničnih veza), koje će zavisiti od karakteristika kože, prisustva određenih funkcionalnih grupa i mnogih drugih parametara (Wokovich i sar., 2006).

Na osnovu svega navedenog, za optimizaciju kvaliteta FFS kao prospektivnih nosača lekovitih supstanci potrebno je definisati **kritične attribute kvaliteta** koji na najbolji način karakterišu FFS za dermalnu primenu, a koji su potencijalno kritični za njihove terapijske performanse. Set kritičnih atributa kvaliteta za FFS kao inovativne nosače lekova još uvek nije definisan. S druge strane, raznolikost terapijskih indikacija za topikalne tretmane primenom FFS kao nosača, otvara potrebu za opsežnim istraživanjima, idući dalje od fizičko-hemijskih zahteva, kako bi uključili i *in vivo* procenu biofizičkih svojstava kože (npr. pH kože kao jedan od relevantnih parametara kod pojedinih kožnih oboljenja) (Danby i sar., 2020; de Melo i Campos., 2019; Umar i sar., 2020).

### ***1.5. Film-formirajući sistemi kao nosači lekovitih supstanci za dermalnu/transdermalnu primenu***

Nakon što su FFS prvobitno pretežno korišćeni u oblasti hirurgije ili za tretman rana (Boateng i sar., 2008; Gupta i sar., 2019; Ovington, 2007; Patel i sar., 2018), započeta su ispitivanja ovih sistema za (trans)dermalnu isporuku različitih lekovitih supstanci, s obzirom da u odnosu na konvencionalne formulacije omogućavaju postojaniji kontakt sa kožom (Frederiksen i sar., 2015; Singh Malik i sar., 2016; Tran i Tran, 2017). Dok su polimerni FFS korišćeni za transdermalnu isporuku steroidnih hormona i analgetika da bi se postigao sistemski terapijski efekat, ovi sistemi takođe, predstavljaju atraktivne, alternativne topikalne formulacije u dermatologiji. Konkretno, FFS mogu biti formulisani u obliku sprejeva za kožu, rastvora za kožu, emulzija za kožu i hidrofилnih gelova (tabela 1.2.) (Frederiksen i sar., 2016; Gennari i sar., 2019; Yu i sar., 2016).

Svega nekoliko FF formulacija se trenutno nalazi na tržištu. Primer dostupnog preparata za lokalnu primenu na koži na bazi polimernih film-formirajućih sistema predstavlja Lamisil® Once 1% (Novartis Consumer Health SA, Nyon, Švajcarska) koji sadrži antifungalni lek terbinafin namenjen za ciljano lečenje dermatofitoza u *stratum corneum*-u, poput atletskog stopala (tinea pedis) sa jednokratnom primenom (Lamisil® Once sažetak karakteristika leka). Ispitivanja su pokazala da navedeni FFS zasnovan na kombinaciji film-formirajućih polimera (konkretno poli(akrilamid-koizooktilakrilata) i hidrosipropilceluloze) obezbeđuje produženo oslobađanje terbinafina. Povećano vreme zadržavanja leka na koži omogućava manju učestalost primene u poređenju sa preporučenom primenom konvencionalnih formulacija tipa krema ili gela (Kienzler i sar., 2007; Pünnel i Lunter, 2021).

Iako je na tržištu do sada dostupan ograničen broj lekova tipa polimernih FFS za topikalnu primenu, pri čemu je njihova dermalna upotreba u terapiji različitih kožnih oboljenja relativno nova, aktuelnost polimernih FFS kao potencijalnih nosača različitih lekovitih supstanci ogleda se i u broju formulacija tipa film-formirajućih rastvora, gelova ili emulzija koje se trenutno nalaze u fazi razvoja.

Prema sadašnjem stanju tehnike, na tržištu je dostupno svega nekoliko patentiranih tehnologija na bazi polimera za neposredno formiranje filma na koži, tzv. *in-situ*, dizajniranih za dermalnu/transdermalnu isporuku leka poput: Liqui-Patch® tehnologije (Epinamics GmbH, Berlin, Nemačka), Medspray® tehnologije (MedPharm Ltd., Guildford, Velika Britanija), ili DuraPeel® tehnologije. DuraPeel® tehnologija je namenjena za produženu isporuku leka u obliku kreme/gela do 12h (Crescita Therapeutics Inc., Mississauga, ON, Kanada

<http://www.crescitatherapeutics.com/technology/durapeel>). Tako je ova tehnologija korišćena za produženu isporuku ropivakaina u obliku gela. Dalje, Liqui-Patch® tehnologije su u fazi razvoja formulacija sa rivastigminom, testosteronom, terbinafinom i vitaminom D3 (Pünnel i Lunter, 2021). Medspray® tehnologije koriste tzv. „patch-in-a-can“ koncept pružajući dugo zadržavanje na koži ili mukoznoj membrani nakon raspršivanja film-formirajućih rastvora (<https://www.medpharm.com/en/medspray>).

S druge strane, na tržištu je dostupno nekoliko patentiranih i komercijalizovanih preparata tipa FFS u obliku nisko-doznih sprejova tzv. MDTS® (engl. *Metered Dose Transdermal System*) dizajniranih od strane kompanije Acrux Inc. (Melbourne, Australija), a namenjenih za transdermalnu isporuku hormonskih lekova preko površine kože. Sam koncept MDTS je prvi put bio razvijen od strane Victorian College of Pharmacy, Australija, dok je prvi komercijalni preparat razvijen i plasiran od strane Acrux Ltd. korišćenjem inovativne tehnologije za primenu lekova preko kože, kojom se zaobilaze moguće inter- i intraindividualne varijacije u doziranju. Ovi sistemi u osnovi sadrže kombinovane sisteme rastvarača (isparljive i neisparljive) i polimere, a mogu da isporuče tačno definisanu količinu API po jednoj primeni. Kao isparljivi rastvarači najčešće se koriste metanol, etanol, dihlorometan, izopropanol, dok se kao neisparljivi rastvarači koriste propilenglikol, voda i dietil-sebacat. Kao polimeri u njihovom sastavu navodno mogu biti korišćeni bilo koji prirodni ili sintetski polimeri. Ovaj tip sistema ima niz prednosti u odnosu na konvencionalne preparate polučvrste ili tečne konzistencije jer se jednokratno aplikuje u obliku sprej sistema, a zapremina po površini primene je tačno definisana i formulacija je ravnomerno distribuirana na koži preko definisane površine. Tako je transdermalni sprej estradiola na različitim tržištima zastupljen pod sledećim brendovima: Evamist®, Lenzetto® i Ellavie®. Pod brendom Ellavie® transdermalni sprej estradiola je od 2009. godine distribuiran u Australiji od strane kompanije Aspen Pharmacare Australia, a u Švajcarskoj od strane kompanije Vifor Pharma (Glattbrugg, Švajcarska) (Parhi i Swain, 2018). Evamist® MDTS je bio prvi regulatorno odobren merno-dozni transdermalni sistem u obliku spreja razvijen od strane kompanije Acrux Inc. (Melbourne, Australija) koji je dalje u 2016. godini komercijalizovan u Evropi i Evroaziji pod brendom Lenzetto® (Gedeon Richter Ltd., Velika Britanija), za transdermalnu isporuku estradiola (jednim raspršivanjem isporučuje se 90 µL transdermalnog spreja koji sadrži 1,53 mg estradiola, odnosno 1,58 mg estradiol-hemihidrata). Korišćen je u hormonskoj supstitucionoj terapiji za lečenje umerenih do jakih toplotnih valunga, tj. vazomotornih simptoma učestalih u periodu menopauze. Ovaj brzo-sušeci i nevidljivi sprej (vreme sušenja približno oko 2 min) se najčešće koristi za jednodnevnu aplikaciju (ponekad je ordiniran i dva puta dnevno, a maksimalno može biti ordiniran 3 puta dnevno) na unutrašnjoj strani podlaktice, isporučujući nisku dozu estradiola što rezultira poželjnim terapijskim koncentracijama u krvi slično drugim odobrenim preparatima estrogena. Za razliku od ostalih dostupnih transdermalnih proizvoda, prednost ovog preparata je da ima nisku učestalost prijavljene iritacije na koži, dok je u odnosu na oralno primenjene estrogene izbegnut metabolizam prvog prolaska kroz jetru, zatim, omogućava produženo delovanje estradiola tokom najmanje 24 sata i smanjen je uticaj enzimskih induktora. Pomoćni ekscipijensi su: oktisalat i etanol, 96%. Sadržaj alkohola u preparatu je 72,74% (<https://www.acrux.com.au/product/estradiol-mdts/>; <https://www.medicines.org.uk/emc/product/11175/smpc#gref>).

Sledeći polimerni FFS na tržištu u obliku spreja, takođe razvijen od strane kompanije Acrux Inc. (Melbourne, Australija) je Axiron® topikalni rastvor (Eli Lilly and Co., Indianapolis, SAD) namenjen za transdermalnu isporuku sistemski aktivnog testosterona (30 mg testosterona u 1,5 mL). Ovo je bio prvi komercijalizovani polimerni film-formirajući rastvor u obliku spreja odobren od strane FDA 2010. godine, za primenu u hormonskoj supstitucionoj terapiji kod muškog hipogonadizma (kongenitalnog ili stečenog) ili niskog nivoa / odsustva testosterona. Sprej se nanosi preko pazušnog aplikatora putem dodira (<https://www.lilly.com/products/historic-products>). Nešto kasnije, Acrux je takođe razvio brzo-sušeci preparat za isporuku testosterona pod nazivom Testosterone MD-Lotion® koji se aplikuje direktno pod pazuhom, i to uz pomoć inovativnog beskontaktnog aplikatora. 2015. godine kompanija Eli Lilly je uspešno kompletirala fazu III kliničkog ispitivanja za ovaj preparat u različitim zemljama širom sveta. Za razliku od topikalnog



rastvora koji se pazušno aplikuje direktnim kontaktom sa aplikatorom, gde svakoj sledećoj primeni mora prethoditi dodatni korak pranja i sušenja aplikatora, uočava se jasna prednost ovako dizajniranog beskontaktnog aplikatora, iz razloga jednostavne primene ali i veće satisfakcije pacijenata (<https://www.eurekalert.org/news-releases/763653>).

Još jedan polimerni FFS u obliku spreja razvijen od strane kompanije Acrux Inc. (Melbourne, Australija) je Nestorone MDTS<sup>®</sup> koji sadrži sintetski gestagen – nestoron kao derivat progesterona (19-norprogesteron), koji se vezuje isključivo za progesteronske receptore i namenjen je za primenu u transdermalnoj kontracepciji. Nestorone MDTS<sup>®</sup> je tečni, brzo-sušeci sprej koji sadrži oktisalat i etanol. Oktisalat se često koristi kao sastojak u preparatima za sunčanje. Nestoron pokazuje izrazito antiovlatorno dejstvo bez androgene ili estrogene aktivnosti *in vivo*. Dosadašnja ispitivanja utvrdila su da se lekovita supstanca kontinuirano oslobađa u cirkulaciji tokom perioda od 72 h (Fraser i sar., 2007).

Još jedan polimerni FFS u obliku spreja, takođe razvijen od strane kompanije Acrux Inc. (Melbourne, Australija) je Nicotine MDTS<sup>®</sup> sa nikotinom kao API, a koristi se kod odvikavanja od pušenja. U ovom slučaju, završena je prva faza kliničkog ispitivanja (Parhi i Swain, 2018).

Sledeći polimerni FFS u obliku spreja, takođe razvijen od strane kompanije Acrux Inc. (Melbourne, Australija) je fentanil MDTS<sup>®</sup> za primenu u terapiji hroničnog bola. Tehnologija je licencirana kompaniji CSL Limited (Melbourne, Australija).

Sledeći preparat plasiran od strane Elanco Pvt. Ltd pod brendom Recuvyra<sup>®</sup> sa opioidnim analgetikom fentanilom kao API (50 mg/mL) je bio u obliku transdermalnog rastvora, za tretman postoperativnog bola prilikom ortopedskih i hirurških intervencija na mekom tkivu. Korišćen je isključivo za veterinarsku upotrebu i to kod pasa. Nosilac marketinške dozvole je od 2011. godine kompanija Eli Lilly and Company Limited (Hamphshire, Ujedinjeno Kraljevstvo). Primenjivan je u pojedinačnoj dozi 2-4 sata pre intervencije, a obezbeđuje analgeziju tokom najmanje 4 dana. Aktuelni status je da je lek povučen sa tržišta EU jer nosilac dozvole nije aplicirao za njenu obnovu ([https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/recuvyra-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/recuvyra-epar-product-information_en.pdf);

<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/recuvyra#authorisation-details-section>).

Prema podacima FDA iz 2016. godine, nekoliko lekovitih supstanci je inkorporirano u transdermalne filmove sa produženim oslobađanjem kao što su buprenorfin, klonidin, estradiol, fentanil, granisetron, metilfenidat, nikotin, nitroglicerina, oksibutinina, rivastigmina, rotigona, skopolamina i selegilina.

Druga oblast potencijalne primene FFS je topikalna primena lokalnih anestetika. S druge strane, cilj je takođe smanjenje ukupne koncentracije lekovite supstance u preparatu, da bi se izbegli određeni neželjeni efekti i ostvario produženi efekat na ciljnom mestu (de Paula i sar., 2010). Za topikalnu analgeziju, Ranade i sar. su razvili film-formirajući sprej sa ropivakainom. Formulacije su izrađene sa lekovitom supstancom i različitim koncentracijama polimera Eudragit<sup>®</sup> EPO koji su dispergovani u etanolu i izopropil alkoholu. Anestetički efekat spreja je bio uporediv sa komercijalnim gelom lidokaina, ali je sprej aplikovan mnogo lakše i sa manjom učestalošću, što svakako povećava komplijansu pacijenta (Ranade i sar., 2017).

Nicoli i sar. su razvili tzv. *patch-no-patch* sistem, formulišući rastvore PVA, butil metakrilat-metil metakrilat kopolimera (Plastoid<sup>®</sup>, Evonik Operations GmbH, Nemačka), PVP, sorbitola, glicerina, lidokain-hidrohlorida i vode koji su osušeni na sobnoj temperaturi do transparentnog filma na silikonskom matriksu. Takav način formiranja filma zahtevao je da tretirana površina kože najpre bude ovlažena sa vodom pre samog nanošenja filma. Zatim je film sa silikonskim supstratom postavljen na površinu kože i silikonski posrednik je uklonjen (Padula i sar., 2007). Time je omogućeno da transparentni film adherira za površinu kože. Aplikovani film tj. „flaster koji nije flaster“ se ponaša kao sistem kontrolisan matriksom, te obezbeđuje unapređenu permeaciju uporedivu sa vodenim rastvorom lidokaina, a bez neželjenih efekata, kao što su alergijske reakcije prema adhezivu. Ne treba zanemariti ni poželjne kozmetičke aspekte ovakvog tehnološkog rešenja (Padula i sar., 2003).

U tabeli 1.2. u nastavku dat je pregled dosadašnjih ispitivanih FFS od strane brojnih istraživačkih grupa sa različitim model lekovitim supstrancama za potencijalnu (trans)dermalnu primenu.

**Tabela 1.2.** Pregled najznačajnijih FFS formulacija i inkorporiranih API, u različitim fazama istraživanja.

<i>Farmaceutski oblik</i>	<i>Aktivni sastojak</i>	<i>Polimer</i>	<i>Rastvarač</i>	<i>Reference</i>	
-	Betametazonvalerat	Klucel™ LF; Kollidon® 12 PF/17 PF/25/30; EC; CH; PAMA <sup>+</sup> ; PME; PAOC	Etanol	Frederiksen i sar., 2015	
	Betametazonvalerat	HPC, PAMA <sup>+</sup> , PAOC	Etanol	Garvie-Cook i sar., 2015	
	Betametazonvalerat	HPC, PAMA <sup>+</sup> , PAOC	Etanol	Herrmann i sar., 2017	
	Etinilestradiol	PAMA <sup>+</sup> , HPC, PU	Etanol ili etanol/voda	Schroeder i sar., 2007b	
	Flurbiprofen	PAMA <sup>+</sup>	Izopropil alkohol/aceton	Gennari i sar., 2017	
	Ketoprofen				
	Ibuprofen				
	Ketorolak	PAMA <sup>+</sup> , Eudragit E, PVP K30	Etanol	Ammar i sar., 2013	
	Mupirocin	PAMA	Etanol/aceton	Sritharadol i sar., 2017	
	Oksibutinini	Karbopol 940, Lutrol F127	Etanol/aceton/metilal <sup>#</sup>	Bakshi i sar., 2008	
	Klotrimazol	PAMA <sup>+</sup>	Etanol/aceton	Paradkar i sar., 2015	
	Sprej	Metilfenidat	PAMA, PAMA <sup>+</sup>	Etanol; izopropil alkohol	Edwards i sar., 2017
		Ropivakain	PAMA <sup>+</sup> , PAMA, PAA, HPC, polaksamer, PVA, PVP	Etanol; izopropil alkohol	Ranade i sar., 2017
		Betametazonvalerat	PVP K90	Etanol	Reid i sar., 2013
		Testosteron	PAMA <sup>+</sup> , Eudragit E, PVPS630, PVP K30	Etanol	Lu i sar., 2013
Losion*	Flukonazol	EC, PAMA <sup>+</sup>	Alkohol/aceton	Gohel i sar., 2009	
	Vorikonazol			Mori i sar., 2017	
	Testosteron	PVP	Izopropil alkohol	Malik i sar., 2016	
Emulzija	Nonivamid		Voda	Heck i sar., 2016	
	Nonivamid	PAMA <sup>+</sup>	Voda	Heck i sar., 2017	
	Nonivamid	PME, PAMA <sup>+</sup>	Voda	Lunter i Daniels, 2012	

<i>Farmaceutski oblik</i>	<i>Aktivni sastojak</i>	<i>Polimer</i>	<i>Rastvarač</i>	<i>Reference</i>
	--	PVA	Voda	Guo i sar., 2011
<i>Gel</i>	Kafein	Fibroin	Voda/etanol	Gennari i sar., 2006
	Ketoprofen	CH	Voda/etil alkohol	Oh i sar., 2017
	Rotigotin	HPC i Karbomer 934	Voda/etanol	Li i sar., 2014
	Tolterodin	Karbopol 980 (neutralisan sa TEA), HPC, HPMC	Voda/etil alkohol	Liu i sar., 2014

Skraćenice: PAMA<sup>+</sup> - poli(amonijum-metil metakrilat) (Eudragit<sup>®</sup> RL ili Eudragit<sup>®</sup> RS); PAMA - poli(aminometil metakrilat) (Eudragit<sup>®</sup> E); PAA - poli(metilmetakrilna kiselina) (Eudragit<sup>®</sup> L); HPC - hidroksipropilceluloza, poloksamer, PVA - polivinilalkohol; PME - polimetiletilakrilat (Eudragit<sup>®</sup> NE); PVP - polivinilpirolidon; EC - etilceluloza; CH - hitozan; HPCH - hidroksipropilhitozan; PAOC - akrilati/oktilakrilamid kopolimer (Dermacryl 79); PU - poliuretan; HPMC - hidroksipropilmetilceluloza.

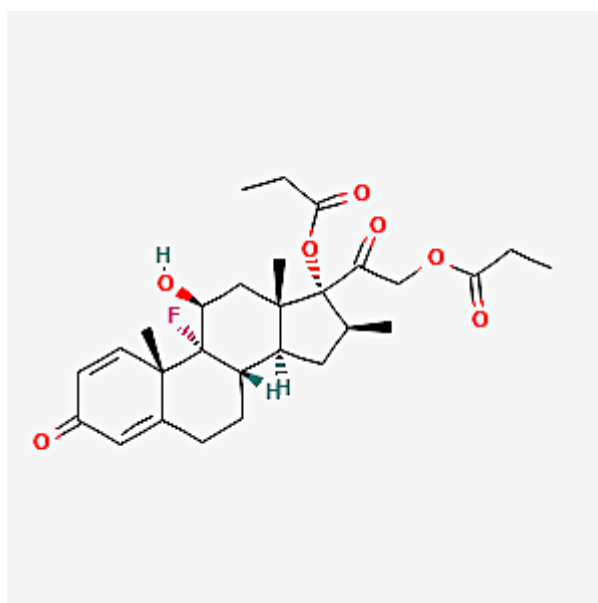
# dimetoksimetan

\*Iako losion nije zvaničan farmaceutski oblik prema listi standardnih termina EDQM-a, sreće se na tržištima pod ingerencijom FDA.

Na osnovu sprovedenih preliminarnih *in vivo* ispitivanja okularne toksičnosti primenom modifikovanog *Draizeovog* testa na mužjacima albino zečeva, nanošenjem placebo uzoraka polimernih nanosuspenzija sa polimerom Eudragit<sup>®</sup> RS i RL, pokazano je odsustvo okularne toksičnosti kao i iritacije na oku do 24 h nakon primene, što ukazuje na pogodnost korišćenja ovih materijala kao potencijalnih nosača čak i za oftalmološku primenu. Da bi se procenio efekat čuvanja Eudragit<sup>®</sup> RS i RL nanodisperzija na okularnu toleranciju, svaka serija je ispitana 1 dan i 4 meseca nakon pripreme. S obzirom da je sluzokoža oka izuzetno osetljiva, pa su i zahtevi za izradu/proizvodnju preparata za oči rigorozniji u odnosu na zahteve za preparate za primenu na koži, rezultati ovog testa upućuju na bezbednost i nizak iritacioni potencijal formulacija sa polimerom Eudragit<sup>®</sup> RS namenjenim za primenu na koži (Pignatello i sar., 2002). Rezultati *in vivo* testa iritacije na Wistar pacovima su pokazali da polimerni film-formirajući sistemi za transdermalnu isporuku tramadola na bazi hitozana i hitozan-Eudragit<sup>®</sup> NE 30 D polimera (1:1) nisu izazvali bilo kakvu iritaciju. Nakon praćenja datih filmova na pojavu edema ili eritema tokom 24 h i 72 h, formulacije su klasifikovane kao neiritirajuće (Ammar i sar., 2009).

## 1.6. Struktura i fizičkohemijska svojstva betametazondipropionata kao lekovite supstance u film-formirajućim sistemima za dermalnu primenu

Imajući u vidu da FFS obezbeđuju značajnu supstantivnost leka na koži, kao i da dosadašnja istraživanja favorizuju inkorporiranje lekovitih supstanci dovoljne lipofilnosti (Pünnel i Lunter, 2021), od interesa je buduće model lekovite supstance za polimerne nosače za dermalnu isporuku izabrati iz grupe kortikosteroida jakog delovanja, poput slaborastvornog betametazona u obliku njegovog lipofilnog estera betametazondipropionata (BD, slika 1.7.). BD je 17,21-dipropionatni ester betametazona, sintetski glukokortikoid sa metaboličkim, imunosupresivnim i antiinflamatornim delovanjem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Betamethasone-dipropionate>). BD je neutralno jedinjenje, molekulske formule  $C_{28}H_{37}FO_7$ . Njegova hemijska i fizička svojstva su prikazana u tabeli 1.3.



**Slika 1.7.** Hemijska struktura betametazondipropionata (preuzeto sa <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Betamethasone-dipropionate>).

Hemijski naziv: Pregna-1,4-dien-3,20-dion, 9-fluoro-11-hidroksi-16-metil-17,21-bis (1-oksopropoksi)-, (11 $\beta$ ,16 $\beta$ ); 9-Fluoro-11 $\beta$ ,17,21-trihidroksi-16 $\beta$ -metilpregna-1,4-dien-3,20-dion 17,21-dipropionat (USP 44, 2021).

**Tabela 1.3.** Fizičkohemijska svojstva betametazondipropionata (Carrer i sar., 2020; PubChem, 2021; Merck Index, 2001; USP 44, 2021).

<i>Molekulska masa</i>	<b>504,6 Da</b>
<i>Organoleptički izgled</i>	beo do kremasto beo prašak
<i>Tačka topljenja</i>	170-179 °C
<i>Particioni koeficijent (oktanol/voda)</i>	log <i>P</i> = 3,96
<i>Rastvorljivost</i>	Lako rastvorljiv u acetonu, i hloroformu, umereno rastvorljiv u alkoholu (96%), nerastvorljiv u vodi.

Koristi se u lečenju različitih tipova dermatitisa, a efikasan je i kod psorijaze kosmatog dela glave, hronične plak psorijaze na šakama i stopalima. Efikasnost betametazona kod prethodno navedenih indikacija mogla bi se značajno unaprediti savremenim formulacionim pristupima, odnosno ciljanom primenom formulacija unapredene supstantivnosti na mestu primene, tj. na samim psorijaznim plakovima. Tokom lokalne primene kortikosteroida poznate su moguće neželjene reakcije (<https://www.alims.gov.rs/ciril/files/lekovi/pil/515-01-00838-17-001.pdf>).

Imajući u vidu da odgovarajuće formulacije FFS mogu obezbediti kontrolisano, tj. produženo oslobađanje lekovite supstance od interesa je ispitati njihov potencijal za smanjenje učestalosti primene lokalnih kortikosteroida jakog delovanja.

Iako je primena film-formirajućih materijala, odnosno sistema koji ih sadrže, interesantan i obećavajući pristup postizanja kontrolisanog oslobađanja leka uz smanjenje učestalosti primene (de Oliveira i sar., 2020; Gennari i sar., 2017), primetan je nedostatak studija sa sveobuhvatnim pristupom karakterizaciji ovih nosača koje, osim razmatranja uticaja formulacionih i procesnih parametara, obuhvataju i optimizaciju postojećih ili uključivanje specifičnih tehnika karakterizacije (posebno studija u *in vivo* segmentu). Razvoj FFS kao nosača novije generacije za dermalnu isporuku kortikosteroida posebno onih jakog delovanja poput BD, može doneti određene terapijske koristi, odnosno voditi ka za pacijenta komfornom, manje učestalom, efikasnijem i bezbednijem lečenju kožnih oboljenja.

## 2. CILJ RADA

Kako bi se poboljšala dermalna raspoloživost i terapijski efekat lokalno primenjenih kortikosteroida na koži, neophodno je rešiti problem njihove ograničene isporuke u/kroz kožu, usled značajnih barijernih svojstava *stratum corneum*-a, naročito kod određenih dermatoloških oboljenja i stanja. Cilj ove doktorske disertacije bio je razvoj, optimizacija i sveobuhvatna fizičko-hemijska, tribološka i biofarmaceutska karakterizacija dermalnih FFS. U cilju dobijanja optimalnih FFS na bazi polimera namenjenih za ciljanu, ali produženu dermalnu isporuku kortikosteroida jakog delovanja (kao pogodna model lekovita supstanca odabran je betametazon u obliku estera - betametazondipropionata), potrebno je proceniti uticaj tipa i koncentracije izabranog polimera i/ili njihove kombinacije u sastavu FFS, kao i koncentracije lekovite supstance, i/ili prisustva/odsustva inhenjera penetracije ili surfaktanta na produženu isporuku kortikosteroida u/kroz kožu. Deo istraživanja je posebno bio posvećen optimizaciji različitih *in vitro* i *in vivo* metoda kako bi se dobio uvid o uticaju varijacija u sastavu formulacije (prisustvo hidrofobnog ili hidrofilnog polimera, ili njihove kombinacije, prisustvo/odsustvo plastifikatora i/ili hemijskih pojačivača penetracije) na karakteristike obrazovanih filmova koje bi se mogle odraziti na njihovu supstantivnost na koži, odnosno definisao set kritičnih atributa kvaliteta specifičnih za navedene inovativne nosače lekovitih supstanci. Generalno, cilj je bio da se izvrši procena potencijalnog značaja primene novijih, naprednih sistema nosača (FFS) koji ispoljavaju produženo zadržavanje na koži, smanjujući učestalost primene dermatokortikosteroida, uz zadovoljenje kozmetičkih očekivanja savremenih pacijenata. Stoga, eksperimentalni rad u okviru ove doktorske disertacije podeljen je u četiri faze, sa sledećim pojedinačnim ciljevima:

*Cilj prve faze eksperimentalnog rada* je bio razvoj i odabir optimalnih polimernih FFS u obliku rastvora i/ili disperzija na bazi polusintetskih ili sintetskih polimera kao potencijalnih nosača za BD, model slabo rastvorljive lekovite supstance iz grupe kortikosteroida jakog delovanja, za produženu i ciljanu isporuku na koži. U tom smislu, kako kvalitet FFS zavisi ne samo od sastava formulacije, već i od uslova izrade, tokom procesa razvoja, nakon odgovarajućih preliminarnih preformulacionih ispitivanja i odabira biokompatibilnih ekscipijenasa u eksperimentalnom dizajnu formulisanom iz serije FFS (ukupno 55 formulacija), cilj je bio da se ispita uticaj prisustva različitih polimera (tipa i koncentracija) (Eudragit® RS PO, Eudragit® NE 30 D, Klucel® GF) ili njihovih kombinacija, uticaj prisustva različitih plastifikatora (poput trietil-citrata, tributil-citrata, propilenglikola ili glicerola, sa opcionalnom upotrebom inhenjera penetracije kao što su srednje-lančani trigliceridi Miglyol® 812 ili nejonskog surfaktanta (polisorbat 80), i odabranog sistema rastvarača (etanol 96% V/V, propilenglikol, izopropil alkohol, etil acetat ili njihove kombinacije), a zatim proceni uticaj procesnih parametara (brzina i stepen rastvaranja/dispergovanja polimera, vreme i brzina mešanja), prisustva/odsustva BD, i njihovih interakcija na kritične attribute kvaliteta (vreme sušenja filma, debljinu filma, površinu filma, fleksibilnost/mehaničku otpornost) i senzorna svojstva FFS. Nakon detaljne analize i kvantifikacije efekata svake pojedinačne komponente i njihovih potencijalnih interakcija, cilj je bio da se izvrši optimizacija sastava formulacije, uslova i načina izrade kako bi se dobili FFS optimalnih/željenih karakteristika za dermalnu isporuku (najkraće vreme sušenja, niska lepljivost, odgovarajuća debljina filma, transparentnost filma, fleksibilnost filma, lateralno širenje i fiziološka prihvatljivost na koži). Odabrane optimalne formulacije dalje su podvrgnute detaljnoj fizičko-hemijskoj, mehaničkoj i senzornoj karakterizaciji, kao i proceni stabilnosti, kako bi se dobio dodatni uvid u pogodnost primene razvijenih FFS kao potencijalnih nosača za model lekovitu supstancu betametazondipropionat. Pojedini protokoli ispitivanja su posebno osmišljeni i optimizovani potrebama ispitivanja farmaceutskih dermalnih FFS, odnosno obrazovanih filmova. Iako postoji nekoliko oficijalnih vodiča (ISO 2813, 2014; ASTM D3359-09, 2009; ASTM D1005-95, 2013; ASTM D523, 1996) za ispitivanje tankih filmova, oni su uglavnom dizajnirani za filmove proizvedene i korišćene u drugim industrijama izuzev farmaceutske, stoga su njihovi protokoli modifikovani kako bi odgovarali potencijalnim

sistemima za isporuku lekovitih supstanci. Nakon prve faze ispitivanja značajno je racionalizovan broj uzoraka koji su ušli u studiju *in vivo* ispitivanja u okviru druge faze ispitivanja.

*Cilj druge faze eksperimentalnog rada* bio je preliminarna *in vivo* procena podnošljivosti (tj. iritacionog potencijala) FFS bez model lekovite supstance, na bazi hidrofobnih polimetakrilatnih kopolimera: Eudragit® NE 30 D (poli (etil akrilat-ko-metil metakrilat 2:1, poliakrilatna disperzija 30 % Ph. Eur.) i Eudragit® RS PO (amonijum metakrilat kopolimer tip B, Ph. Eur.) i hidrofilnog polimera Klucel® GF (hidroksipropilceluloza) ili njihove kombinacije, radi kvantifikacije i poređenja efekata koje ovi sistemi ostvaruju na koži tokom 24-očasovne studije pod okluzijom primenom neinvazivnih biofizičkih tehnika. Dodatno, kako bi se dobio dublji uvid u fenomen transformacije FFS tokom primene na koži, kao i u potencijalne interakcije između kože i generisanih filmova izvedena je posebna 24-časovna tribološka studija. Finalno, na istim uzorcima, a u cilju procene očekivane adherencije/prijemčivosti ispitivanih formulacija na koži/za kožu, sproveden je *in vivo* test supstantivnosti koji simulira kontakt koža-FFS i FFS-odeća.

*Cilj treće faze eksperimentalnog rada* bio je detaljna fizičko-hemijska karakterizacija izabranih FFS sa model lekovitom supstancom BD, kako u pogledu fizičkog stanja BD u formulacijama i nakon aplikovanja, razmatranja (super)saturacije, odnosno precipitacije lekovite supstance u rezidualnoj formulaciji, kao i oceni morfoloških i topografskih karakteristika generisanih filmova, odnosno detekciji lek-nosač interakcija. U cilju procene dugoročne fizičko-hemijske stabilnosti, relevantna ispitivanja odabranih FFS sa BD sprovedena su inicijalno, nakon tri meseca, nakon šest meseci i nakon godinu dana čuvanja na sobnoj temperaturi ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

*Cilj četvrte faze eksperimentalnog rada* bio je biofarmaceutska karakterizacija uporednim *in vitro* ispitivanjem brzine i stepena permeacije BD iz razvijenih FFS, koja će biti suštinska za potvrđivanje anticipirane produžene dermalne isporuke izabranog model kortikosteroida. *In vitro* ispitivanje permeacije BD sprovedeno je primenom Franz-ovih difuzionih ćelija kroz toplotom izolovani epidermis kože uha svinje sa ciljem da se razmotre dobijeni rezultati. Takođe, cilj je bio da se proceni dermalna raspoloživost i/ili ekvivalentnost preparata za primenu na koži koji nisu Q1/Q2/Q3 ekvivalentni. U ispitivanje, radi poređenja, je uključen i referentni lek sa tržišta. Konačno, nakon uvida u rezultate dobijene iz svih sprovedenih metoda karakterizacije, cilj je bio definisanje **specifičnih atributa kvaliteta** koji na najbolji način karakterišu FFS za primenu na koži, a koji su potencijalno kritični za njihove terapijske performanse.

### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

#### 3.1 Materijali

API korišćen kao model lekovita supstanca je betametazondipropionat, koji je dobijen od kompanije Galenika a.d. (Srbija). Hidrofilni polimer, Klucel® GF (hidroksipropilceluloza, HPC) je nabavljen od Caesar & Loretz GmbH (Nemačka). Hidrofobni polimetakrilatni kopolimeri, Eudragit® NE 30 D (poli (etil akrilat-ko-metil metakrilat) 2:1 (poliakrilatna disperzija 30 % oficinalna u Ph. Eur.)) i Eudragit® RS PO (poli (etil akrilat-ko-metil metakrilat-ko-trimetilamonijumetil metakrilat hlorid) tj. kopolimer tip B prema Ph. Eur.) dobijeni su od Evonik Rohm GmbH (Nemačka). Kao kontrolni polimer u poredbenoj formulaciji za *in vivo* deo studije, polivinilalkohol je nabavljen od Sigma Aldrich (Nemačka). Plastifikatori, trietil-citrat i tributil-citrat su nabavljeni od kompanije Merck GmbH (Nemačka). Kao potencijalni ubrzivači/inhenseri penetracije, trigliceridi srednje dužine lanca, trgovačkog naziva Miglyol® 812, nabavljeni su od Fagron (Grčka), a nejonski surfaktant (polisorbat 80) je nabavljen od Sigma Aldrich (Nemačka). Takođe, korišćeni su glicerol i propilenglikol proizvođača Carl Roth GmbH (Nemačka). Svi ostali korišćeni rastvarači i reagensi su bili farmakopejskog (Ph. Eur, USP) ili hromatografskog (HPLC) kvaliteta i korišćeni su bez daljeg prečišćavanja.

Kao referentan lek za potrebe *in vitro* ispitivanja permeacije korišćena je betametazon mast Beloderm®, proizvođača Belupo, lijekovi i kozmetika d.d. (Hrvatska).

Tipovi korišćenih polimera i njihove osnovne karakteristike su prikazane u tabeli 3.1. u nastavku.



**Tabela 3.1.** Polimeri korišćeni u izradi ispitivanih film-formirajućih sistema.

<b>Polimer</b>	<b>Tip</b>	<b>Svojstva</b>	<b>Reference</b>
Hidroksipropilceluloza	Hidrofilni polimer	Rastvorljiv u vodi; Dostupan u nekoliko Mr (50 000 – 1 250 000); Omogućava fleksibilan izbor rastvarača u odnosu na rastvorljivost lekovite supstance; Umerena mukoadhezivna svojstva; Dobar kapacitet solubilizacije i sveukupne procesibilnosti.	Alanazi i sar., 2007; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016; Produtturi i sar., 2004;
Polivinilalkohol	Hidrofilni polimer	Lako rastvorljiv; Dostupan u nekoliko Mr (20 000–200 000); Odlična sposobnost formiranja filma i optička transparentnost; Umereno bubrenje; Umerena mukoadhezivna svojstva.	Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016; Briddick i sar., 2016; Jug i sar., 2009.
Poli (etil akrilat-ko-metil metakrilat) 2:1 (poliakrilatna disperzija 30 %, Ph. Eur.)	Hidrofobni neutralni polimetakrilatni kopolimer	Nerastvorljiv; Prosečna molarna masa je približno 750 000 g/mol; Niske permeabilnosti i moći bubrenja sa pH-nezavisnim profilom; Veoma slaba bioadhezivna svojstva; 1 deo se meša sa 5 delova acetona, etanola ili izopropil alkohola dajući bistre do blago zamućene rastvore; Tg (°C) – 10; pH 5,5 – 8,6; relativna gustina 1,037 – 1,047.	Cilurzo i sar., 2014; Evonik Industries, 2016; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016; Lunter i Daniels, 2012; Patra i sar., 2017.
Poli (etil akrilat-ko-metil metakrilat-ko-trimetilamonioetil metakrilat hlorid) 1:2:0,1	Hidrofobni katjonski polimetakrilatni kopolimer	Nerastvorljiv; Prosečna molarna masa je 32 000 g/mol; Permeabilan, sa pH-nezavisnim profilom i niskim kapacitetom bubrenja; Veoma slaba bioadhezivna svojstva, visoka mukoadhezivna svojstva; 1 deo se rastvara u 5 delova acetona, etanola ili izopropil alkohola dajući bistre ili zamućene rastvore; Tg (°C) – 65; Pogodan za matriksne sisteme sposobne za različito oslobađanje i hidrofилnih i hidrofobnih lekovitih supstanci.	Desai i sar., 2011; Evonik Industries, 2016; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016; Lunter i Daniels, 2012.

## Prva faza eksperimentalnog rada

### 3.2. Metode

#### 3.2.1. Izrada polimernih film-formirajućih sistema

Film-formirajuće formulacije sa pažljivo odabranim ključnim polimerima su pripremljene na sobnoj temperaturi bez zagrevanja, uz kontinuirano mešanje na magnetnoj mešalici (IKA magnetna mešalica RCT basic, IKA<sup>®</sup>, Nemačka) prema sledećem postupku: izabrani polimer ili smeša polimera je rastvorena ili dispergovana u izabranom rastvaraču ili smeši rastvarača, kao što je specificovano (tabela 3.2.) i rastvor je mešan do kompletne disperzije polimera (tipično 2,5 - 3 h, osim HPC čije je potpuno dispergovanje zahtevalo neprekidno mešanje u trajanju od 24 h). Mešanje je vršeno u zatvorenim staklenim bočicama i, po potrebi, nastavljeno tokom noći. Sledećeg dana, dodat je izabrani plastifikator i mešanje je nastavljeno pri brzini od 900 obrt/min do kompletne homogenizacije. Prisutni ekscipijensi u sastavu svih ispitivanih uzoraka unutar preformulacione studije ispitivanja, kao i njihov koncentracijski raspon je predstavljen u tabeli 3.2. Ispitivane formulacije su čuvane u tamnim, dobro zatvorenim staklenim bočicama, na sobnoj temperaturi.

**Tabela 3.2.** Procentni sastav ekscipijenasa u okviru film-formirajućih sistema ispitivanih u preformulacionoj fazi studije.

<b>Funkcija</b>	<b>Ekscipijensi</b>	<b>[% , m/m]</b>
<b>Polimer ili kombinacija polimera</b>	Eudragit <sup>®</sup> RS PO	8,5–19,0
	Eudragit <sup>®</sup> NE 30 D	5,0–10,0
	Klucel <sup>®</sup> GF	2,5–5,0
	Eudragit <sup>®</sup> RS/Klucel <sup>®</sup> GF	4/1
<b>Plastifikator/Inhenser penetracije</b>	TEC <sup>1</sup>	20*
	TBC <sup>2</sup>	20*
	Propilenglikol	20*
	Glicerol	20*
	MCT <sup>3</sup>	20*
<b>Rastvarač ili smeša rastvarača</b>	Polisorbat 80	0,3–3
	Propilenglikol/EtOH <sup>4</sup> /Voda <sup>5</sup>	1–5/73,4–92,4/1,3–12,7
	EtOH/Voda	73,4–86,0/3,3–8,2
	Izopropil alkohol/Voda	73,0–87,5/3,3–12,7
	EtOH/Voda/Etil acetat	74,0/10,6/1

\* %, m/m suvog polimera. <sup>1</sup> TEC= trietil-citrat; <sup>2</sup> TBC= tributil-citrat; <sup>3</sup> MCT= srednje-lančani trigliceridi; <sup>4</sup> EtOH = etanol, 96% V/V, <sup>5</sup> Voda = prečišćena voda.

### **3.2.2. *Skrining fizičko-mehaničkih i senzornih svojstava***

Tokom prve faze studije, formulacije su podvrgnute seriji specifično optimizovanih metoda karakterizacije, kako bi se dobio uvid u sledeća svojstva: *vreme sušenja, debljinu, fleksibilnost i senzorna svojstva obrazovanih filmova, kao i površinu difuzije formulacije, odnosno obrazovanih filmova.*

#### **3.2.2.1. *Ispitivanje vremena sušenja filmova na sobnoj temperaturi***

Prethodno definisana količina svakog uzorka (500  $\mu$ L) je uniformno distribuirana u Petri sudovima (površine 18 cm<sup>2</sup>) pomoću automatske pipete (slika 3.2.1). Merenja su sprovedena pomoću štoperice u triplikatu, sa pažljivom kontrolom ambijentalnih uslova (temperatura  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , relativna vlažnost  $40 \pm 10\%$ ). Rezultat je izražen kao srednja vrednost tri sukcesivna merenja  $\pm$  standardna devijacija (SD).



**Slika 3.2.1.** Ilustracija ispitivanja brzine sušenja FFS na sobnoj temperaturi.

#### **3.2.2.2. *Ispitivanje vremena sušenja filmova na 32 °C***

Kako bi se tokom ispitivanja simulirali realni uslovi primene, odnosno sušenja uzoraka na prosečnoj temperaturi kože, vreme potrebno za potpuno sušenje filmova ispitano je i primenom uređaja Orbital Shaker Incubator ES 20 (Biosan, Letonija). Sat vremena pre početka eksperimenta temperatura uređaja je podešena na  $32,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Nakon što je prethodno definisana količina svakog uzorka (500  $\mu$ L) uniformno distribuirana u Petri sudovima (18 cm<sup>2</sup>) pomoću automatske pipete, sudovi su postavljeni u inkubator.

Vreme sušenja filma je mereno štopericom. Dobijeno vreme sušenja filmova na  $32^\circ\text{C}$  je potom ocenjeno kao kratko (ukoliko je dobijena vrednost  $\leq 5$  min), srednje (dobijena vrednost između 5 i 7 min) ili dugo ( $> 7$  min) (u skladu sa preporukama Schroeder i sar., 2007a). Rezultat je izražen kao srednja vrednost tri ponovljena merenja  $\pm$  SD.

#### **3.2.2.3. *Senzorna svojstva filmova dobijenih nakon sušenja na sobnoj temperaturi vs. 32 °C***

Ovaj deo profilisanja FFS je uključivao organoleptički izgled i lepljivost generisanih filmova. Nakon sušenja uzoraka u odgovarajućim Petri posudama, organoleptička svojstva filma su praćena vizuelno pomoću lupe. Vizuelna svojstva obrazovanih filmova nakon sušenja na sobnoj

temperaturi i na 32 °C, deskriptivno su procenjena kao transparentni - gotovo nevidljivi film, kao film koji nije potpuno transparentan ili je pak beličaste boje, i kao film koji je netransparentan ili zamućen. Lepljivost obrazovanog filma je ocenjena aplikovanjem komada pamučne vate pod niskim pritiskom na suvi film kao što je opisano od strane Schroeder i sar. (2007a), sa razlikom da je komad pamučne vate izmeren na analitičkoj vagi ABJ 120–4 M (Kern & Sohn GmbH, Nemačka) pre i posle aplikacije.

Shodno tome, lepljivost je ocenjena kao niska (nisu uočena pamučna vlakna na površini filma), srednja (vidljiv je tanak sloj vlaknastih niti, a nakon merenja utvrđeno je da je ne manje od 0,01 g vate zadržano na ispitivanom uzorku) i visoka (vidljiv je deblji sloj vlaknastih niti, a nakon merenja utvrđeno je da je ne manje od 0,02 g vate zadržano nakon primene na ispitivanom uzorku) (slika 3.2.2). Svaki individualni uzorak je testiran više puta, kako bi rezultati bili izraženi kao prosečna vrednost najmanje tri merenja  $\pm$  SD.



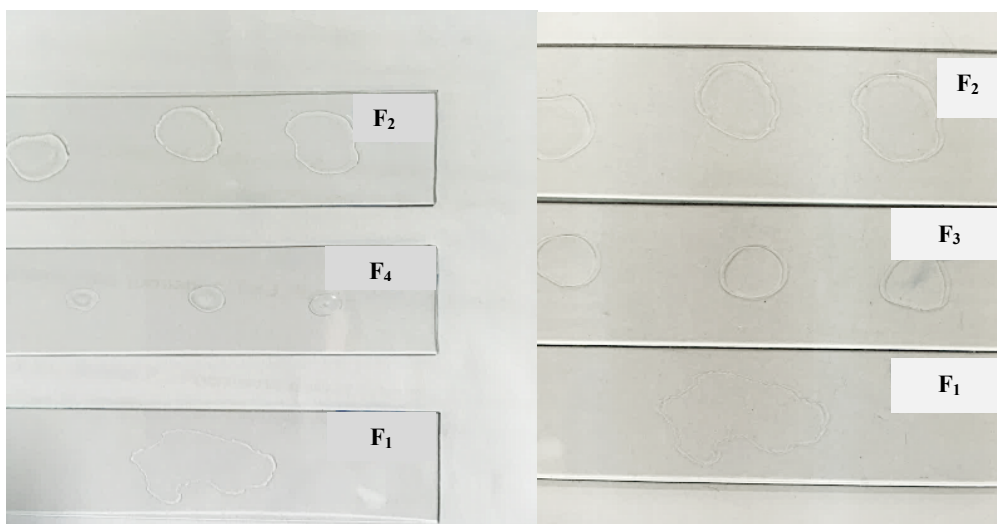
Slika 3.2.2. Ilustracija ispitivanja lepljivosti filma nakon sušenja.

#### 3.2.2.4. Ispitivanje debljine filma

Debljina obrazovanih filmova ispitana je korišćenjem digitalnog mikrometra usaglašenog sa standardom DIN 863, koji podržava opseg merenja debljine 0 - 25 mm/0,001 mm (Kern, Nemačka) prema precizno definisanom postupku. Na staklenu mikroskopsku pločicu koja je služila kao supstrat aplikovano je 10  $\mu$ L od svakog uzorka pomoću automatske pipete. Pre nanošenja ispitivanog uzorka, debljina svake staklene pločice je izmerena u 3 različite tačke, kako bi se uočila odstupanja koja bi mogla da kompromituju tačnost ispitivanja. Nakon potpunog sušenja uzorka, izmerena je debljina obrazovanog filma na staklenoj pločici i korigovana sa debljinom staklene pločice na koju nije nanet uzorak. Svaki uzorak je testiran u triplicatu, a srednje vrednosti su izražene u mm ( $\pm$  SD).

#### 3.2.2.5. Ispitivanje površine filma

Test je izvršen nanošenjem 10  $\mu$ L svakog uzorka pomoću automatske pipete, upravno na površinu mikroskopske staklene pločice. Nakon sušenja filma, površina difuzije formulacije je određena korišćenjem milimetarskog grafičkog papira, tj. postavljanjem papira ispod staklene pločice i preračunavanjem površine filma pomoću uveličavajućeg stakla. Dobijene vrednosti su izražene u mm<sup>2</sup>  $\pm$  SD, kao srednja vrednost tri uzastopna merenja. Prikaz procene difuzione površine nastalih filmova je dat na slici 3.2.3.



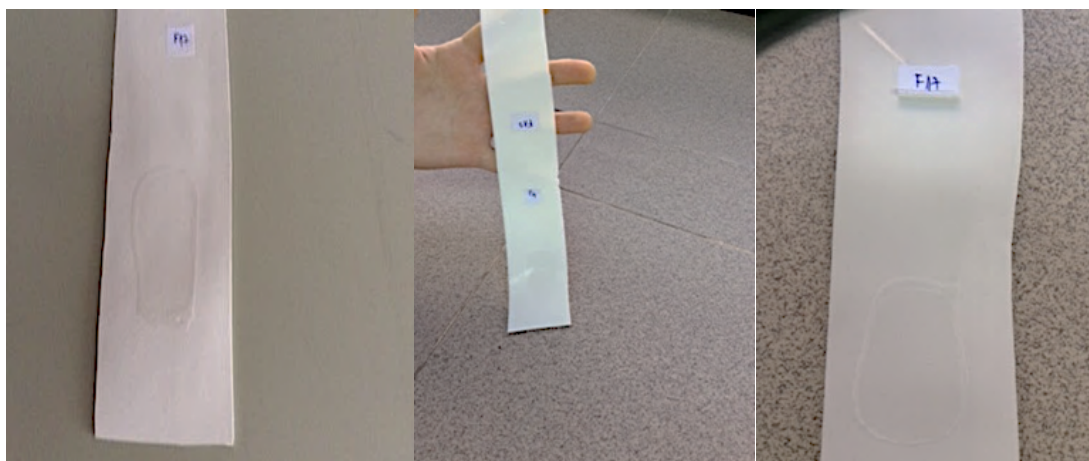
**Slika 3.2.3.** Prikaz ispitivanja površine formiranog filma nakon lateralne difuzije FFS na mikroskopskoj pločici.

### **3.2.2.6. Ispitivanje fleksibilnosti/mehaničke otpornosti filmova**

Fleksibilnost, kao glavni parametar mehaničke otpornosti filma je procenjen tzv. tehnikom uvijanja filma (engl. *folding endurance technique*) na odgovarajućoj podlozi. Vrednost uvijanja filma je definisana kao broj puta za koji se film može uviti/presaviti na istom mestu (uz primenu odgovarajuće podloge/supstrata) bez lomljenja filma ili druge vidljive promene. Ovaj test ukazuje na krtost dermalnih filmova i/ili njihovu sklonost ka pucanju. Dakle, što je dobijena niža vrednost uvijanja filma, veća je njegova lomljivost i krtost, što omogućava i procenu integriteta filma (Aqil i sar., 2004).

Ispitivanje je optimizovano laboratorijskim uslovima i izvršeno na sledeći način: 500  $\mu$ L od svakog uzorka je aplikovano korišćenjem mikropipete i uniformno distribuirano u dužini od 4 cm na adekvatno izabranoj gumenoj podlozi u obliku trake, dimenzija  $27 \times 4,4$  cm. Nakon sušenja filma gumena traka je ponavljano uvijana i odvijana duž cele dužine filma (slika 3.2.4.). Nakon svakog ciklusa uvijanja, film je pregledan na prisustvo pukotina ili drugih specifičnih promena korišćenjem uveličavajućeg stakla (lupe).

Dobijena vrednost je definisana kao „vrednost uvijanja filma“, a izražena je brojem uvijanja koji je vodio do prve vidljive promene filma na gumenom supstratu, odnoseći se na sklonost filma ka pucanju. Test je izvršen u triplikatu i zabeležene su prosečne vrednosti  $\pm$  SD.



**Slika 3.2.4.** Ispitivanje fleksibilnosti filma tehnikom sukcesivnog uvijanja na gumenoj podlozi.

### ***3.2.2.7. Skrining mikrostrukture filmova***

Preliminarni uvid u mikrostrukturu obrazovanih filmova dobijen je primenom polarizacionog mikroskopa Carl Zeiss ApoTome Imager Z1 mikroskop (Zeiss, Nemačka) integrisanim sa AxioCam ICc1 digitalnom kamerom i AxioVision 4.6 softverskim paketom. Mala količina ispitivanih uzoraka uzeta je sa različitih mesta u okviru svakog uzorka i postavljena na mikroskopsku pločicu. Nakon potpunog sušenja, obrazovani filmovi su posmatrani pod polarizacionim mikroskopom sa i bez uključivanja  $\lambda$  pločice kako bi se detektovalo eventualno prisustvo anizotropnih struktura. Mikrografije od interesa snimljene su pri uveličanju  $20\times$ .

### ***3.2.3. Određivanje pH vrednosti film-formirajućih sistema***

pH vrednost sistema nosača može značajno uticati kako na stanje model lekovite supstance tako i na puferski kapacitet kože, potencijalno izazivajući promene u naknadnoj raspodeli u/na koži (Surber i Knie, 2018).

Merenje pH vrednosti FFS je izvršeno direktno, prethodno kalibrisanim uređajem pH checker<sup>®</sup> HI98103 (Hanna Instruments Inc., Mičigen, SAD), na  $25 \pm 2$  °C, jednostavnim uranjanjem elektrode uređaja u ispitivane uzorke. Ispitivanje je izvedeno u triplikatu, rezultirajući srednjim vrednostima od tri pojedinačna merenja ( $\pm$  SD).

Iako su pojedini rezultati dobijeni prethodno opisanim tehnikama prve faze eksperimentalnog rada podvrgnuti odgovarajućoj statističkoj analizi, detaljan opis primenjenih statističkih metoda dat je u odeljku 3.2.14.



## Druga faza eksperimentalnog rada

### **3.2.4. Preliminarna procena *in vivo* iritacionog potencijala i supstantivnosti film-formirajućih sistema na bazi polimetakrilatnih kopolimera i/ili hidrokispropil celuloze**

Istraživačka studija preliminarne procene bezbednosnog profila, odnosno iritacionog potencijala, razvijenih placebo film-formirajućih sistema sprovedena je *in vivo*, primenom neinvazivnih biofizičkih merenja na koži u tzv. studiji pod okluzijom i ocenom efekata ovih uzoraka na koži nakon 24-časovne okluzije. Praćeni su sledeći parametri kože: 1) eritema indeks (EI) primenom uređaja Mexameter<sup>®</sup> MX18, 2) transepidermalni gubitak vode (TEGV) primenom uređaja Tewameter<sup>®</sup> TM210, 3) stepen hidratisanosti *stratum corneum*-a (SCH) primenom uređaja Corneometer<sup>®</sup> CM825, 4) pH kože (Cutometer<sup>®</sup> MPA 580) i 5) frikcija primenom sonde uređaja Frictionmeter<sup>®</sup> FR700 opremljene sa ravnim, glatkim Teflonskim (PTFE) diskom (slika 3.2.5.) (svi proizvođača Courage+Khazaka, Keln, Nemačka).

Celokupna studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, primenom protokola odobrenog od strane Etičkog komiteta za biomedicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta u Beogradu (odluka broj 2073/2, izdata 28.11.2019. godine). Ispitivanje je uključivalo 16 dobrovoljaca (ženskog pola), a sprovedeno je u 3 faze:

U prvoj fazi studije učestvovalo je osam zdravih dobrovoljaca (žena prosečne starosti  $33 \pm 8$  godina) bez istorije ili kliničkih znakova bilo kojih dermatoloških bolesti, fizičkih oštećenja kože ili alergijskih reakcija. Merenja navedenih parametara sprovedena su pre i 1 h nakon 24-časovne okluzije kože tretirane ispitivanim uzorcima.



**Slika 3.2.5.** Uređaj Cutometer<sup>®</sup> MPA 580 (levo) opremljen između ostalog i sondom Frictionmeter<sup>®</sup> FR700 za različita tribološka ispitivanja (desno).

Svi ispitanici su prvo bili detaljno upoznati sa ciljevima i protokolom studije, a zatim su potpisivanjem odgovarajućeg informisanog pristanka bili uključeni u ispitivanje. Mesto aplikacije

uzoraka je bila koža unutrašnje (volarne) strane podlaktica, a metode sprovedenih ispitivanja su bile neinvazivne<sup>1</sup> tehnike bioinženjeringa kože.

Studija je izvedena u skladu sa validnim vodičima i smernicama. Najmanje dva dana pre početka studije, kao i tokom njenog trajanja, ispitanici su bili u obavezi da na definisana test mesta ne nanose kozmetičke proizvode (za negu i čišćenje). 24 h pre početka studije kao i tokom njenog trajanja, nije bilo dozvoljeno pranje tretiranih područja. Takođe, ispitanici nisu smeli da konzumiraju nikotin i pića sa kofeinom najmanje 3 sata pre početka ispitivanja. U cilju eliminisanja uticaja sredinskih faktora, pre početka eksperimenta, ispitanici su proveli najmanje 30 min u prostoriji u kojoj je vršeno merenje, kako bi se aklimatizovali na kontrolisane laboratorijske uslove (temperatura  $22 \pm 1$  °C, relativna vlažnost  $40 \pm 5$  %). Temperatura i relativna vlažnost prostorije su praćeni tokom merenja.

Nakon merenja bazalnih vrednosti, svaki od ispitivanih uzoraka je aplikovan u količini od  $5,5 \mu\text{L}/\text{cm}^2$  (pomoću automatske pipete) na unapred definisane površine ( $9 \text{ cm}^2$ ,  $3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$ , pomoću kartonskog šablona), na unutrašnje strane obe podlaktice dobrovoljaca. Nakon kompletnog sušenja nanetih uzoraka, formirajući *in situ* polimerni film na koži, na prethodno određene tretirane površine je opciono postavljena okluzija. Površina na koju nije nanet uzorak, a okludirana je na isti način, služila je kao netretirana kontrola pod okluzijom (NKO), dok je površina bez aplikacije uzorka i okluzije služila kao netretirana kontrola bez okluzije (NK). Na svakoj podlaktici ostavljeno je po jedno test-mesto za NKO i NK. Okluzija je izvršena prekrivanjem definisane površine kože pomoću poliolefinskog filma ( $9 \text{ cm}^2$ , Parafilm® M, Brand GmbH, Nemačka) koji je zatim fiksiran hipoalergijskim adhezivnim flasterom Vivafix® (Tosama, Slovenija). Nakon 24 h, okluzija je skinuta, a nakon 1 h od skidanja okluzije ponovo je izvršeno merenje navedenih parametara.

Merenja navedenih parametara sprovedena su u skladu sa relevantnim vodičima i smernicama (du Plessis i sar., 2013; Fullerton i sar., 1996). U ovoj fazi studije ocenjen je bezbedonosni profil 5 izabranih placebo film-formirajućih sistema (označenih kao F1, F2, F4, F5, F6) zajedno sa jednim poredbenim film-formirajućim sistemom (poredbena formulacija, označena sa PF) na bazi PVA (10% vodena disperzija sa dodatkom 0,5 % propilenglikola), i poređenjem sa dvema kontrolama (NKO i NK) (slika 3.2.6.a). Dobijeni rezultati su grupisani u dve grupe kao bazalne, „primarne“ vrednosti (pre nanošenja FFS, svojstvene inherentnim karakteristikama kože ispitanika) i rezultirajuće „sekundarne“ vrednosti (25 h nakon primene film-formirajućih polimernih sistema pod okluzijom).

*U drugoj fazi studije*, nakon najmanje mesec dana od izvođenja prvog dela studije (čime je osigurana kompletna deskvamacija površinskih slojeva kože ispitanika), u evaluaciji petog biofizičkog parametra - frikcije kože učestvovalo je osam zdravih dobrovoljaca (žena  $33 \pm 8$  godina) bez istorije ili kliničkih znakova bilo kojih dermatoloških bolesti, fizičkih oštećenja kože ili alergijskih reakcija. Najmanje dva dana pre početka studije, kao i tokom njenog trajanja, ispitanici su bili u obavezi da ne nanose kozmetičke proizvode za negu kože na definisanim test mestima, ali je bilo dozvoljeno normalno čišćenje kože pre početka studije. U cilju eliminisanja potencijalnih greški izazvanih faktorima okruženja, pre početka eksperimenta, ispitanici su proveli 30 min u prostoriji u kojoj je vršeno merenje, kako bi se aklimatizovali na kontrolisane laboratorijske uslove (temperatura  $22 \pm 1$  °C, relativna vlažnost  $40 \pm 5$  %).

Frikcija je merena, na volarnim stranama podlaktica, uz primenu kartonskog šablona sa kružnim otvorima prečnika 5 cm, ali bez okluzije test-mesta. Merenje frikcije koje pripada domenu tribologije (neimenovani broj koji između ostalog ukazuje na lakoću razmazivanja, supstantivnost formulacije i interakcije koje se odigravaju na površini kože i obrazovanog filma) vršeno je prislanjanjem sonde čiji se vrh okretao konstantnom rotacionom brzinom od 90 obrt/min (raspon mogućih brzina uređaja je 0-250 obrt/min) u trajanju od 100 s, pri prethodno definisanim vremenskim tačkama niže navedenim. Frikcioni parametar izražen u arbitrarnim jedinicama (A.U.)

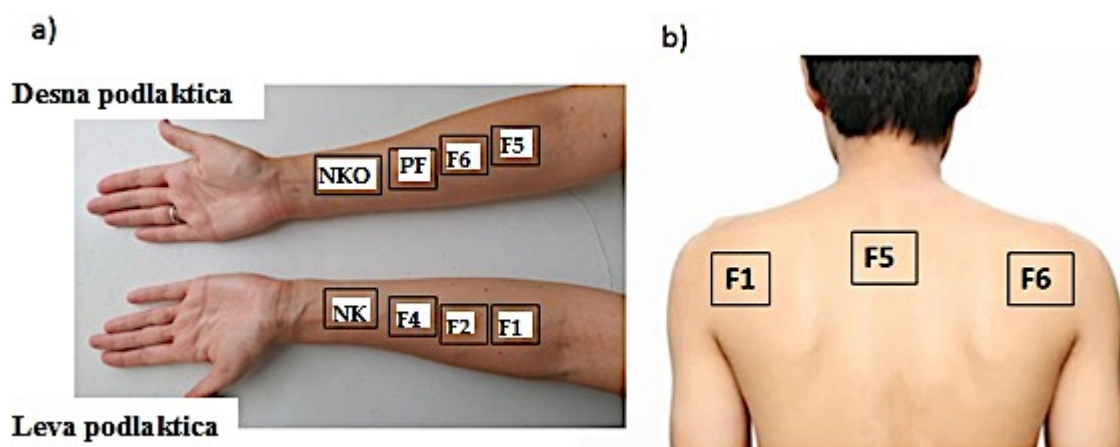
---

<sup>1</sup> Termin je preuzet iz vodiča i smernica koji se odnose na ovu vrstu ispitivanja. Merenja navedenih parametara se vrše blagim pritiskom sonde odgovarajućih uređaja na kožu.



meri otpor kože (odnosno, u ovom slučaju otpor rezidualnog filma FFS) koji se širi prema frikcionoj sondi koja kontinuirano uvrće kožu (tj. obrazovani film na površini kože) i predstavlja elastičnost i njeno deformaciono ponašanje (Savary i sar., 2019). Pre aktuelnih merenja na koži, izvršena su kontinuirana merenja u vazduhu tokom najmanje 15 minuta kako bi se zagrejala sonda uređaja i da bi se dobili reproduktivni rezultati. Naknadno, izvršena su kontinuirana merenja u trajanju od 100 s na netretiranoj površini kože. Potom je u centar kružnih otvora šablona (svaki 12,56 cm<sup>2</sup>) naneto 5,5 μL/cm<sup>2</sup> svakog od ispitivanog uzorka pomoću automatske pipete na unutrašnje strane obe podlaktice dobrovoljaca. Aplikovano je 5 uzoraka odabranih „placebo” film-formirajućih sistema (tj. FFS uzoraka bez inkorporirane model lekovite supstance), zajedno sa jednim uzorkom poredbenog film-formirajućeg sistema i poređeno sa netretiranom kontrolom bez okluzije. Merenja su sprovedena u sledećim vremenskim tačkama: nakon 5 min, nakon 30 min, nakon 1 h, nakon 6 h i nakon 24 h od nanošenja uzorka. MPA softver uređaja je simultano obrađivao i konvertovao dobijene podatke u arbitrarne jedinice (A.U.).

U trećoj fazi studije, izveden je test supstantivnosti na koži prema modifikaciji protokola predloženog od strane Schmidberger i sar., 2019. U studiji je učestvovalo sedam dobrovoljaca (žena 33 ± 8 godina) bez istorije kožnih bolesti. Kao i u prethodnim fazama *in vivo* studije, svi ispitanici su prvo detaljno upoznati sa protokolom studije, a zatim su potpisivanjem odgovarajućeg informisanog pristanka bili uključeni u ispitivanje. Ipak, u ovom slučaju, mesto aplikacije uzoraka bila je koža u predelu leđa i mišica (slika 3.2.6.b).



**Slika 3.2.6.** Stvaran raspored uzoraka i kontrolnih mesta (netretirana kontrola pod okluzijom (NKO) i bez okluzije (NK) u okviru: a) *in vivo* studije pod okluzijom i b) *in vivo* studije supstantivnosti.

Najmanje dva dana pre početka studije, kao i tokom njenog trajanja, ispitanici su bili u obavezi da ne nanose kozmetičke proizvode (za negu i čišćenje) na definisanim test mestima. Takođe, nisu smeli da konzumiraju nikotin i pića sa kofeinom najmanje 3 sata pre početka ispitivanja. U cilju eliminisanja uticaja sredinskih faktora, pre početka eksperimenta, ispitanici su proveli najmanje 30 min u prostoriji u kojoj je vršeno merenje, kako bi se aklimatizovali na podešene uslove (22 ± 1 °C, 40 ± 5 % RH). Temperatura i relativna vlažnost prostorije su kontinuirano praćeni tokom merenja. Sve formulacije FFS u ovom delu studije su sadržale 0,9 % avobenzona (INCI: Butyl Methoxydibenzoylmethane) kao model supstancu. Navedeni UV filter (kozmetička sirovina koja se u proizvodima za zaštitu od sunca koristi u koncentraciji do 5 %) ostaje na površini kože, odnosno količina koja penetrira smatra se zanemarljivom (Chatelain i sar., 2003). Površina od 9 cm<sup>2</sup> je označena na leđima i gornjem delu leve i desne ruke dobrovoljaca,

nakon čega je uzorak nanet u količini od  $5,5 \mu\text{L}/\text{cm}^2$  pomoću automatske pipete. Nakon potpunog sušenja filмова na koži, komad bele tkanine (dimenzija  $6 \times 6 \text{ cm}$ ) je krojačkim špenadloma pričvršćen za unutrašnju stranu odeće ispitanika, tako da je obrazovani film uzorka na koži u potpunosti prekriven. Ispitanici su potom imali 3 sata na raspolaganju za uobičajene aktivnosti. Po isteku zadatog vremena, formulacija je uklonjena sa kože pomoću dva komada vate, od kojih je svaki natopljen sa po 2 mL izopropil alkohola. Zatim su oba komada vate preneti u kivetu i dodato je 10 mL izopropil alkohola za ekstrakciju avobenzona. Upotrebljeni komad tkanine dimenzija  $6 \times 6 \text{ cm}$  na koji je potencijalno prenet avobenzon je ekstrahovan u drugoj kiveti sa 14 mL izopropil alkohola. Obe kivete su izložene mešanju, najpre na laboratorijskom šejkeru (1 min), a zatim u ultrazvučnom kupatilu (kumulativno 50 min), održavajući temperaturu ispod  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  da bi se izbegla termalna degradacija avobenzona. Količina avobenzona u oba eluata je određena spektrofotometrijski na uređaju UV/Vis Spectrophotometer Evolution 300 (Thermo Scientific, SAD), na talasnoj dužini od 360 nm. Tokom postupka ekstrakcije i naknadne analize alikvoti su bili zaštićeni od direktnog uticaja svetlosti oblaganjem vijala aluminijumskim folijama. „Recovery“ vrednost avobenzona je bila u opsegu od 72-123 % aplikovane količine.

Iako su pojedini rezultati dobijeni prethodno opisanim tehnikama druge faze eksperimentalnog rada podvrgnuti odgovarajućoj statističkoj analizi, detaljan opis primenjenih statističkih metoda dat je u odeljku 3.2.14.

## **Treća faza eksperimentalnog rada**

### **3.2.5. Izrada polimernih film-formirajućih sistema sa betametazondipropionatom**

U okviru treće faze eksperimentalnog rada izvršena je optimizacija postupka izrade različitih FFS sa lekovitom supstancom. Nakon prve dve faze rada, utvrđeno je da način izrade, preciznije način inkorporiranja aktivne supstance ima neposredan uticaj na dalje karakteristike sistema i time predstavlja jedan od kritičnih procesnih parametara.

Korišćena koncentracija betametazondipropionata u izabranim formulacijama je bila u terapijskom opsegu od 0,05-0,064%, što odgovara sadržaju od 0,04-0,05% betametazona.

Proces pripreme se odvijao u 2 odvojene faze:

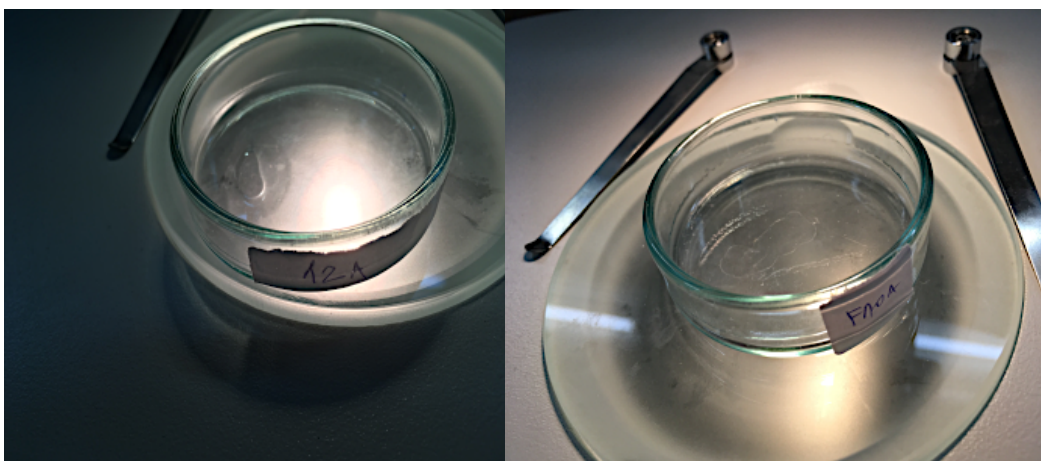
- I. Betametazondipropionat prethodno izmeren na analitičkoj vagi (BP-301 S, Sartorius, Nemačka) je rastvoren u delu izabranog rastvarača (etanol 96% *V/V* ili izopropil alkohol) u zatvorenom sudu, a zatim je u zavisnosti od izabranog tipa polimera (Eudragit<sup>®</sup> RS PO, Klucel<sup>®</sup> GF ili njihova kombinacija) dodat odgovarajući plastifikator, i opciono površinski aktivna materija (polisorbat 80) uz neprekidno mešanje staklenim štapićem do potpunog rastvaranja lekovite supstance.
- II. Izabrani polimer je rastvoren ili dispergovan u ostatku izabranog/izabranih rastvarača i manjoj količini prečišćene vode, uz neprekidno mešanje na magnetnoj mešalici (IKA magnetna mešalica RCT basic, IKA<sup>®</sup>, Nemačka). Mešanje je trajalo 2,5 - 3 h nakon čega je dodata rastvorena lekovita supstanca (faza I). Mešanje je zatim nastavljeno na magnetnoj mešalici do potpune homogenizacije uzoraka, u trajanju od 24 h.

### **3.2.6. Optička mikroskopija**

Uzorci suvih filmova dobijeni nakon sušenja na sobnoj temperaturi ( $25 \pm 2$  °C) i na  $32 \pm 0,1$  °C (temperirani u uređaju Orbital Shaker inkubator), posmatrani su na optičkom mikroskopu (Motic digital DMB3-22ASC mikroskop; Motic GmbH, Nemačka) kako bi se stekao dodatni uvid u fizičko stanje BD, tj. eventualno naknadno obrazovanje kristala lekovite supstance tokom i nakon transformacije FFS, do potpunog sušenja filma. Uzorci su posmatrani pod uveličanjem objektiva  $10\times$  i  $20\times$ .

Ispitivanje obrazovanja kristala nakon sušenja filma na sobnoj temperaturi i na temperaturi kože izvršeno je nanošenjem 20  $\mu$ L uzorka na mikroskopsku pločicu i tokom sušenja filma praćeno je obrazovanje kristala pod mikroskopom. Da bi se olakšala vizuelizacija kristala, u narednom koraku naneta je i veća količina uzorka (500  $\mu$ L uzorka) (slika 3.2.7.).

Eventualna pojava kristalizacije lekovite supstance je procenjena 24 h nakon izrade uzoraka, pri čemu je detektovano prisustvo ili odsustvo kristala betametazondipropionata i njihova distribucija.



Slika 3.2.7. Detekcija kristala BD tokom i nakon transformacije FFS u dermalni film.

### 3.2.7. Reološka karakterizacija

Za inovativne nosače lekova poput FFS, analiza reoloških svojstava pruža uvid u ponašanje ispitivanih uzoraka prilikom izrade/proizvodnje, pakovanja, primene, ali takođe i aplikacije na koži. Reološke performanse ispitivanih FFS sa lekovitom supstancom betametazondipropionatom i odgovarajućih „placebo” uzoraka analizirane su korišćenjem rotacionog reometra tipa MCR 302 (Anton Paar GmbH, Austrija) sa mogućim opsegom primene torzije od 0,5 nNm do 230 mNm, podržanog sa RheoCompass softverom (takođe Anton Paar GmbH, Austrija).

Za merenje viskoelastičnih i tečnosti niskog viskoziteta korišćen je merni alat tipa koncentričnog cilindra (CC27). Merenja su sprovedena na temperaturi od  $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ , u rasponu primenjene torzije od 0,0001 mNm do 0,03 mNm, pri kontrolisanoj brzini smicanja od 0 do  $100 \text{ s}^{-1}$  i obrnuto. Viskozitet izmeren na definisanim brzinama smicanja korišćen je za dalju karakterizaciju uzoraka, kao i ocenu njihove stabilnosti (odjeljak 3.2.11.). Dodatno, sprovedena je analiza krivih tečenja primenom *steady-state* (kontinualnih) reoloških merenja.

### 3.2.8. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR spektroskopija)

FT-IR spektroskopija je metoda od posebnog značaja u ranom formulacionom razvoju FFS, upravo zbog detekcija interakcija koje se potencijalno odigravaju između lekovite supstance i polimera, ali i moguće pojave rekristalizacije lekovite supstance u nastalom rezidualnom filmu na koži. Koristi se da bi se ispitali i uporedili spektri individualnih komponentata sa spektrima uzoraka (smeša prethodno ispitanih supstanci). Pojava, gubitak, redukcija ili pomeranje prominentnih signala koji pripadaju pojedinim molekulskim grupama u spektru ukazuje na interakcije između lekovite supstance i jednog ili više prisutnih ekscipijenasa (Tran i Tran, 2020).

FT-IR spektri optimalnih FFS sa i bez inkorporiranog BD (analizirani u oba fizička stanja, tečnom i suvom stanju), čistog BD i ostalih ekscipijenasa korišćenih za izradu FFS, snimljeni su korišćenjem Nicolet iS10 FT-IR spektrofotometra (Thermo Fischer Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo), u opsegu talasnih dužina od  $4000$  do  $600 \text{ cm}^{-1}$ , sa rezolucijom od  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Pre analize,  $10 \mu\text{L}$  ispitivanih FFS naneto je na KRS-5 pločicu, dok je u slučaju čiste lekovite supstance - betametazondipropionata, za pripremu uzoraka korišćena metoda sa kalijum-bromidom (tehnika KBr pastile). Uparivanje pikova je urađeno za detektovanje mogućih interakcija komponentata.

### **3.2.9. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)**

Kako bi se dobio detaljniji uvid u fizičko stanje BD u ispitivanim FFS, kao i u eventualno prisutne interakcije BD sa ostalim komponentama FFS izvršena je procena termalnog ponašanja čistog BD, optimalnih FFS sa betametazondipropionatom i odgovarajućih filmova primenom DSC metode, uz korišćenje uređaja DSC 1 (Mettler Toledo GmbH, Švajcarska).

U zavisnosti od prirode uzoraka, ispitivani uzorci (približno 2-10 mg) su precizno izmereni u standardnim aluminijumskim lončićima, koji su dalje, odmah nakon merenja, hermetički zatvoreni. Uzorci su potom zagrevani u opsegu od 25 °C do 220 °C, brzinom od 10 °C/min, pri konstantnom protoku azota (50 mL/min), sa praznim ili zatvorenim aluminijumskim lončićem kao referentnim. Dodatno, kako bi se sprečio uticaj isparavanja rastvarača na tačnost dobijenih rezultata, DSC termogrami odabranih optimalnih formulacija FFS snimljeni su i nakon sušenja uzoraka (10 µL) u aluminijumskim lončićima, tokom 24 h na sobnoj temperaturi. Nakon sušenja, precizno je odmerena masa uzoraka u aluminijumskim lončićima, koji su potom hermetički zatvoreni i podvrgnuti prethodno opisanoj eksperimentalnoj proceduri. Odgovarajući termoanalitički parametri (početna (onset) temperatura, temperatura topljenja, maksimum na krivi topljenja ( $T_{\text{pik}}$ ) i entalpija) određeni su korišćenjem Mettler Toledo STARe softvera.

### **3.2.10. Mikroskopija atomskih sila (engl. AFM)**

Da bi se dobio uvid u topografiju filmova kao i za potvrdu nalaza o očekivanom razlikovanju kvaliteta površine nastalih filmova (morfologija, hrapavost) izvedena je mikroskopija atomskih sila na uređaju NTEGRA Prima mikroskopa atomskih sila (NT-MDT, Rusija). Primenjen je metod naizmeničnog kontakta (engl. „*Tapping mode*“). Uzorci su naneti na mica pločice i ostavljeni da se potpuno osuše preko noći na 30 °C, da bi se imitirala temperatura kože. Nakon toga, izrađene su AFM slike nano i mikro razmera topografije filmova, određen je signal greške i primenjena softverska obrada za dobijanje finalnih rezultata, korišćenjem softvera Image Analysis 2.2.0 (NT-MDT) i Gwyddion 2.60 (Free and Open Source software, Department of Nanometrology, Czech Metrology Institute, Češka). Mikroskopijom atomskih sila analizirane su topografije formiranih filmova i dobijen je uporedni uvid u specifičnu mikrostrukturu različitih uzoraka.

### **3.2.11. Preliminarna procena stabilnosti uzoraka**

Kako bi se ispitala dugoročna stabilnost odabranih film-formirajućih uzoraka kao potencijalnih nosača za model lekovitu supstancu betametazondipropionat, izrađeni uzorci su čuvani dobro zatvoreni u tamnim staklenim bočicama sa polipropilenskim čepom, na sobnoj temperaturi ( $25 \pm 2$  °C) i zaštićeno od svetlosti, tokom godinu dana. Nakon 3 meseca, 6 meseci i 12 meseci, ponovljena su ispitivanja sledećih parametara: organoleptički izgled i pH vrednost, dok je prividni viskozitet uzoraka praćen u okviru reološke studije: nakon 7 dana, nakon 90 dana i nakon 180 dana od pripreme uzoraka.

Iako su pojedini rezultati dobijeni prethodno opisanim tehnikama treće faze eksperimentalnog rada podvrgnuti odgovarajućoj statističkoj analizi, detaljan opis primenjenih statističkih metoda dat je u odeljku 3.2.14.

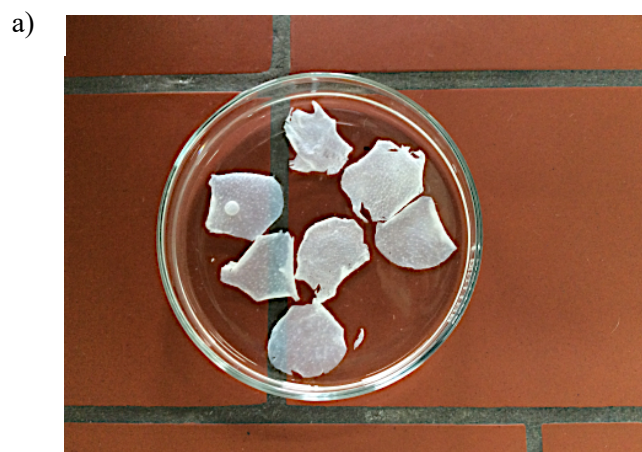
## Četvrta faza eksperimentalnog rada

### 3.2.12. *In vitro* ispitivanje permeacije model lekovite supstance betametazondipropionata

*In vitro* ispitivanje permeacije izabrane model lekovite supstance betametazondipropionata iz FFS sprovedeno je na modifikovanim, vertikalnim *Franz*-ovim difuzionim ćelijama. Kao membrana smeštena između akceptorskog i donorskog dela korišćen je toplotom izolovani epidermis kože uha svinje (slika 3.2.8.a), kao biološki supstrat koji se smatra histološki najbližijim ljudskoj koži, dok je kao akceptorski medijum (odabran nakon preliminarnog ispitivanja rastvorljivosti BD) korišćen fosfatni pufer pH 7,4 pomešan sa 96 % *V/V* etanolom (u odnosu 50:50 vol. %). Izbor akceptorskog medijuma je bio u skladu sa preporukama regulatornih smernica koje se odnose na dermalnu resorpciju, gde se kao pogodan akceptorski medijum za lipofilna jedinjenja predlaže korišćenje smeše rastvarača kao što su etanol i voda (OECD, 2019). Prema vodičima (OECD 2003; OECD 2004), mogu se koristiti različite tehnike pripreme kože, uključujući *split/dermatomed* kožu (debljine 200–400/500  $\mu\text{m}$ ) kao adekvatni model, ali i (toplotno ili enzimski) izolovani epidermis (sa *stratum corneum*-om). Na početku ispitivanja, 300  $\mu\text{L}$  svakog od ispitivanih FFS je naneto automatskom pipetom i ravnomerno distribuirano po primenjenoj membrani. Kao referentni lek korišćen je betametazon mast 0,5 mg/g (Beloderm<sup>®</sup>, Belupo, lijekovi i kozmetika d.d, Hrvatska).

Koncentracija betametazondipropionata koja je permeirala kroz membranu u toku ispitivanja je analizirana *in house* razvijenom UHPLC-MS/MS metodom. Ispitivanje permeacije praćeno je u vremenskom periodu tokom 26 h, uz održavanje konstantne temperature akceptorskog medijuma od  $32,0 \pm 0,1$  °C i brzine mešanja od 500 obrt/min (slika 3.2.8.b). U prethodno definisanim vremenskim intervalima (nakon 2 h, 4 h, 6 h, 20 h, 22 h, 24 h i 26 h), uzorkovani su eluati zapremine 600  $\mu\text{L}$  korišćenjem igle i šprica. Nakon uzorkovanja, u sistem je dodata ista zapremina, prethodno zagrejanog i degasiranog medijuma da bi se do kraja ispitivanja održavali *sink* uslovi.





**3.2.8.** Ilustracija a) posebno pripremljenog, toplotom izolovanog epidermisa kože uha svinje; i b) postavke *Franz*-ovih difuzionih ćelija u vodenom kupatilu temperiranom na 32 °C.

Kako bi se u potpunosti okarakterisao proces permeacije betametazondipropionata kroz membranu (tj. izolovani epidermis kože uha svinje) u vremenskom periodu tokom 26 h, za izabrane formulacije su pored dobijenih permeacionih profila, izračunate sledeće vrednosti: ukupna količina lekovite supstance koja je permeirala kroz membranu na kraju eksperimenta ( $Q_{26h}$ ), stacionarni/ravnotežni fluks ( $J_{ss}$ ) i koeficijent permeacije ( $K_p$ ).

*Izračunavanje permeacionih profila betametazondipropionata:* Rezultati dobijeni primenom odgovarajuće analitičke metode predstavljaju koncentraciju betametazondipropionata (ng/mL), te dalje moraju biti korigovani tačnom zapreminom medijuma koji se nalazi u akceptorskom delu *Franz*-ove ćelije i zapreminom medijuma koja je pažljivo uzorkovana u definisanim vremenskim tačkama tokom eksperimenta, a zatim podeljeni površinom raspoloživom za difuziju. Tek nakon navedene korekcije, rezultati se konačno mogu izraziti u obliku kumulativne količine betametazondipropionata koja je permeirala po jedinici površine  $Q$  (ng/cm<sup>2</sup>) (Ilić, 2019):

$$Q_a = \frac{C_a \cdot V_c}{P} \quad (1)$$

$$Q_b = \frac{C_b \cdot V_c + C_a \cdot V_u}{P} \quad (2)$$

$$Q_c = \frac{C_c \cdot V_c + C_a \cdot V_u + C_b \cdot V_u}{P} \quad (3)$$

Pri čemu je  $Q_a$ ,  $Q_b$ ,  $Q_c$ , itd. količina betametazondipropionata koja je permeirala po jedinici površine membrane u vremenu  $t_a$ ,  $t_b$ ,  $t_c$ , itd.;

$c_a$ ,  $c_b$ ,  $c_c$ , itd. – koncentracija betametazondipropionata (ng/mL) u eluatima uzorkovanim u odgovarajućim vremenskim tačkama ( $t_a$ ,  $t_b$ ,  $t_c$ , itd.);

$V_c$  – zapremina akceptorskog dela *Franz*-ove difuzione ćelije (12 mL);

$V_u$  – zapremina akceptorskog medijuma koja je uzorkovana u vremenu  $t_a$ ,  $t_b$ ,  $t_c$ , itd. (600  $\mu$ L);

$P$  – površina *Franz*-ove difuzione ćelije dostupna za difuziju (2,01 cm<sup>2</sup>).

Stacionarni fluks ( $J_{ss}$ ) betametazondipropionata kroz kožu određen je iz nagiba linearnog dela grafika koji pokazuje zavisnost kumulativne količine betametazondipropionata koja je permeirala kroz jedinicu površine membrane od vremena uzorkovanja za svaku ispitivanu formulaciju, odnosno svaku korišćenu difuzionu ćeliju (Ilić, 2019).  $K_p$  je izražen u (mg/cm<sup>2</sup>h) i uobičajeno se izračunava na sledeći način (Selzer i sar., 2013):

$$K_p = \frac{J_{ss}}{C_0} \quad (4)$$

pri čemu je  $J_{ss}$  stacionarni fluks betametazondipropionata kroz kožu (izražen u jedinicama ng/cm<sup>2</sup>h), a  $C_0$  je inicijalna koncentracija betametazondipropionata u formulaciji (ng/mg).

### 3.2.13. UHPLC-MS/MS

Određivanje koncentracije betametazondipropionata u eluatima dobijenim tokom *in vitro* ispitivanja permeacije, ispitivanja saturacione rastvorljivosti u receptorskom medijumu (fosfatni pufer pH 7,4/etanol 96% *V/V* u zapreminskom odnosu 70:30 i 50:50), kao i tokom praćenja hemijske stabilnosti betametazondipropionata u razvijenim FFS, sprovedeno je korišćenjem UHPLC sistema sa MS detektorom – UHPLC Accela 1000 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, Kalifornija, SAD) koji čine sistem za automatsko uzorkovanje, termostat kolone i kvaternerna pumpa. Hromatografsko razdvajanje je izvedeno na ZORBAX Eclipse Plus C8 koloni (150 mm  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu$ m; Agilent Technologies, SAD) na 40 °C. Kao mobilna faza korišćena je smeša acetonitrila i 0,1 % vodenog rastvora mravlje kiseline (80:20, *V/V*), pri brzini protoka od 500  $\mu$ L/min. Ukupno vreme trajanja analize bilo je 6,5 min. Masena analiza je sprovedena na TSQ Quantum Access MAX trostrukom kvadropolskom masenom analizatoru opremljenom sa elektrosprej izvorom jonizacije (ESI) radeći sa azotom visoke čistoće kao nebulizatorom (Thermo



Fisher Scientific, SAD). Parametri ESI izvora optimizovani su injektovanjem (20  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) standardnog rastvora betametazondipropionata u odgovarajućem rastvaraču korišćenom za svaku od studija, pri protoku mobilne faze od 500  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Hromatogrami betametazondipropionata snimani su praćenjem odabrane jonske tranzicije (engl., *selected-reaction monitoring* – SRM) u pozitivnom modu. Optimizovani parametri ESI izvora i masenog spektrometra su bili sledeći: napon spreja 5000 V; temperatura grejača jonske probe 350 °C; direktan (linearni) protok azota kroz jonsku probu 30 jedinica; pomoćni (kružni) protok azota kroz jonsku probu 10 jedinica; temperatura kapilare 250 °C; kapilarni offset 35 jedinica; offset cevnog sočiva 136 jedinica; offset skupljača 36 jedinica; širina pika koja se odnosi na rezoluciju 0,7 na prvom kvadropolu; širina jonskog snopa ( $m/z$ ) 0,02; vreme skeniranja 200 ms. Xcalibur softver v 2.1.0.1139 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, SAD) korišćen je za prikupljanje i obradu podataka.

Masena spektrometrija je korišćena za detekciju specifičnih jona radi identifikacije analita. Skeniranjem celog MS spektra utvrđeno je da je u ESI izvoru dominantni jon  $[M + H]^+$  za betametazondipropionat ( $m/z$  527,3). Postavkom SRM tranzicionog kanala za praćenje BD, cepanjem na manje fragmente, utvrđeno je da je dominantni jon  $[M + H]^+$  za betametazondipropionat na  $m/z$  453,2. Za praćenje betametazondipropionata odabrane su optimalne jonske tranzicije  $m/z \rightarrow$  (pri kolizionoj energiji 20 V).

### 3.2.14. Statistička analiza

Statistička analiza rezultata fizičko-mehaničke i hemijske karakterizacije i studija stabilnosti svih ispitivanih uzoraka, prikazanih kao srednja vrednost parametra  $\pm$  SD, izvršena je primenom Student t-testa (za dve grupe podataka) ili jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) (za više od dve grupe podataka) uz *post hoc* analizu primenom Tukey's HSD testa. Takođe, rezultati biofarmaceutске karakterizacije, *in vivo* studije preliminarne procene iritacionog potencijala i ponašanja na koži su analizirani, kada je to bilo moguće, primenom Student t-testa (za dve grupe podataka), odnosno, primenom jednofaktorske ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test (za više od dve grupe podataka).

Kada preduslovi za parametarsku statističku analizu nisu bili ispunjeni, tj. kada varijanse nisu bile homogene i podaci nisu pratili normalnu distribuciju (nisu mogli ni da se transformišu u normalno distribuirane podatke), korišćen je neparametarski Kruskal-Wallis test, u kombinaciji sa Wilcoxon Signed-Rank ili Mann-Whitney U testom za međusobna poređenja između grupa. Procena normalnosti dobijenih podataka je izvedena korišćenjem Shapiro-Wilk testa.

Statistička analiza dobijenih podataka je izvršena korišćenjem komercijalnog kompjuterskog programa PASW Statistics verzija 18.0 (SPSS Inc., Čikago, SAD). Statistička značajnost u svim testovima je postavljena na  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1. Rezultati i diskusija prve faze eksperimentalnog rada

#### 4.1.1. Razvoj formulacija film-formirajućih sistema u okviru preformulacione studije

Preformulacionom eksperimentalnom studijom je obuhvaćeno ukupno 55 različitih formulacija (preliminarno označene sa A1-A55, sastav najznačajnijih uzoraka prikazan u tabelama 4.1.1.1.-4.1.1.4.), od kojih je na osnovu definisanih kriterijuma dalje opisanih u nastavku, odabrano ukupno 20 formulacija (prikazanih u tabelama 4.1.1 i 4.1.2), a koje su u svom sastavu uključivale sledeće film-formirajuće polimere: jedan hidrofilni (HPC) ili jedan hidrofobni polimer (Eudragit® NE 30 D (u daljem tekstu NE) ili Eudragit® RS PO (u daljem tekstu RS)) ili kombinaciju hidrofилnog (HPC) i hidrofobnog polimera (RS). Hidrofobni polimeri su izabrani da uključuju jedan neutralni (NE) ili jedan katjonski (RS) polimer iz grupe akrilata i metil metakrilatnih kopolimera.

Iako su svi uzorci FFS ispitani na relevantna senzorna, fizičko-hemijska i mehanička svojstva, sledeći ključni parametri su prihvaćeni kao prvi presek za dalju procenu:

- ✓ vreme sušenja na sobnoj temperaturi < 60 min,
- ✓ vreme sušenja na temperaturi kože < 15 min,
- ✓ debljina filma < 0,1 mm,
- ✓ fleksibilnost filma < 5 puta (uvijanja) i
- ✓ pH u opsegu od 5,5 do 8,5.

Ovo je omogućilo racionalno smanjenje broja prospektivnih formulacija na ukupno 20. U drugom delu preseka, ključni parametar za finalnu procenu i krajnji odabir formulacija je bio: fleksibilnost filma < 15 puta (uvijanja). To je poslužilo za dalju selekciju obećavajućih formulacija (konačno nazvanih F1-F6, tabela 4.1.1.) i za naknadnu *in vivo* studiju procene ponašanja na koži. Kao što je prikazano u tabeli 4.1.3. izabrane optimalne formulacije su u svom sastavu sadržale sledeće polimere: RS u koncentraciji od 8,5%, 10%, i 17,5%, NE u koncentraciji od 6,0%, i HPC u koncentraciji od 3,5%, što je bilo u skladu sa prethodnim istraživanjima u ovoj oblasti (Frederiksen i sar., 2015; Schroeder i sar., 2007a; Umar i sar., 2020). Takođe, formulacija F6 uključena je sa ciljem procene kombinovanja hidrofobnog (4% RS) i hidrofилnog polimera (1% HPC). Činjenica da polimer RS dominira u izabranim uzorcima povezana je sa njegovom katjonskom prirodom i očekivanom poželjnom supstantivnošću na koži.

Kao optimalni plastifikatori za disperzije RS (u koncentraciji 20% u odnosu na masu suvog polimera, kao što je predloženo od strane Garvie-Cook i sar., 2015), razlikovali su se propilenglikol i TEC. Preformulaciona studija je ukazala da upotreba glicerola ili MCT kao plastifikatora u ovom slučaju nije obezbedila filmove dovoljne fleksibilnosti.

Korišćenje izopropil alkohola kao rastvarača za polimere RS u koncentraciji 10% ili NE u koncentraciji 5% nije dalo zadovoljavajuće rezultate u pogledu lepljivosti filmova, nezavisno od uslova sušenja. Kada je isti rastvarač kombinovan sa NE (konkretno 6% ili 8,5%), obezbedio je filmove niske lepljivosti kako na 32 °C tako i na sobnoj temperaturi, ali je zauzvrat smanjio njihovu fleksibilnost. Što se tiče formulacija na bazi HPC, uzorke koji su sadržali 4-5% m/m ovog polimera, karakterisalo je primetno povećanje viskoziteta nakon čuvanja 3,5 meseci, te stoga nisu bili pogodni za dalju analizu i isključeni su iz studije.

**Tabela 4.1.1.1.** Sastav odabranih formulacija (%) razvijenih tokom preformulacione studije: odabrani uzorci grupe A1-A15.

<b>Preliminarne oznake formulacija/ Sastojci</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A4</b>	<b>A5</b>	<b>A7</b>	<b>A8</b>	<b>A9</b>	<b>A10</b>	<b>A12</b>	<b>A13</b>	<b>A15</b>
Eudragit® RS	15,0	15,0	-	18,0	-	12,5	15,0	17,5	-	-	19,0
Eudragit® NE 30 D	-	-	7,5	-	10,0	-	-	-	8,5	6,5	-
Klucel® GF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TEC	-	3,0	-	-	-	2,5	-	-	-	-	-
TBC	3,0	-	-	3,6	-	-	-	-	-	-	3,8
MCT	-	-	-	-	-	-	3,0	3,5	-	-	-
Etanol (96%)	77,0	77,0	81,3	74,0	80,0	80,8	77,00	75,0	78,8	83,8	-
Izopropil alkohol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	73,1
Prečišćena voda	5,0	5,0	11,2	4,4	10,0	4,1	5,0	4,1	12,7	9,7	4,1

**Tabela 4.1.1.2.** Sastav odabranih formulacija (%) razvijenih tokom preformulacione studije: odabrani uzorci grupe A16-A30.

<b>Preliminarne oznake formulacija/ Sastojci</b>	<b>A16</b>	<b>A17</b>	<b>A19</b>	<b>A20</b>	<b>A21</b>	<b>A22</b>	<b>A23</b>	<b>A26</b>	<b>A27</b>	<b>A29</b>	<b>A30</b>
Eudragit® RS	-	10,0	10,0	-	12,5	10,0	10,0	-	-	12,0	12,0
Eudragit® NE 30 D	5,5	-	-	8,5	-	-	-	-	-	-	-
Klucel® GF	-	-	-	-	-	-	-	2,5	3,5	-	-
TEC	-	2,0	2,0	-	2,5	-	-	-	-	-	-
TBC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MCT	-	-	-	-	-	-	2,0	0,5	0,7	2,4	-
Glicerol	-	-	-	-	-	2,0	-	-	-	-	2,4
Etanol (96%)	86,3	84,7	-	-	75,9	84,7	79,7	97,0	95,8	81,6	81,6
Izopropil alkohol	-	-	84,7	78,8	-	-	-	-	-	-	-
Propilenglikol	-	-	-	-	5,0	-	5,0	-	-	-	-
Prečišćena voda	8,2	3,3	3,3	12,7	4,1	3,3	3,3	-	-	3,96	3,96

**Tabela 4.1.1.3.** Sastav odabranih formulacija (%) razvijenih tokom preformulacione studije: uzorci A31-A41.

<b>Preliminarne oznake formulacija/ Sastojci</b>	<b>A31</b>	<b>A32</b>	<b>A33</b>	<b>A34</b>	<b>A35</b>	<b>A36</b>	<b>A37</b>	<b>A38</b>	<b>A39</b>	<b>A40</b>	<b>A41</b>
Eudragit® RS	12,0	12,0	17,5	10,0	10,0	10,0	17,5	12,0	-	12,5	10,0
Eudragit® NE 30 D	-	-	-	-	-	-	-	-	6,0	-	-
Klucel® GF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TEC	-	2,4	-	-	-	2,0	-	-	-	-	-
TBC	2,4	-	-	-	2,0	-	-	2,4	-	-	2,0
MCT	-	-	3,5	2,0	-	-	3,5	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol (96%)	-	76,6	73,4	84,7	-	79,7	70,7	74,0	-	82,0	84,7
Izopropil alkohol	81,6	-	-	-	84,7	-	-	-	85,0	-	-
Propilenglikol	-	5,0	-	-	-	5,0	5,0	-	-	2,5	-
Polisorbat 80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-
Etil acetat	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-	-	-
Prečišćena voda	3,96	4,0	5,6	3,3	3,3	3,3	3,3	10,6	9,0	2,5	3,3

**Tabela 4.1.1.4.** Sastav odabranih formulacija (%) razvijenih tokom preformulacione studije: odabrani uzorci grupe A42-A55.

<b>Preliminarne oznake formulacija/ Sastojci</b>	<b>A42</b>	<b>A43</b>	<b>A45</b>	<b>A46</b>	<b>A48</b>	<b>A49</b>	<b>A50</b>	<b>A51</b>	<b>A53</b>	<b>A54</b>	<b>A55</b>
Eudragit® RS	-	-	17,5	9,0	-	8,5	17,5	4,0	8,5	8,5	4,0
Eudragit® NE 30 D	5,0	8,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Klucel® GF	-	-	-	-	3,5	-	-	1,0	-	-	1,0
TEC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TBC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MCT	-	-	-	1,8	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	-	3,5	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol (96%)	-	78,8	73,4	86,2	92,5	74,8	73,4	88,7	87,4	86,7	92,4
Izopropil alkohol	87,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Propilenglikol	-	-	-	-	1,0	1,0	3,5	5,0	1,0	1,0	1,0
Etil acetat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polisorbat 80	-	-	-	-	3,0	3,0	-	-	0,3	1,0	0,3
Prečišćena voda	7,5	12,7	5,6	3,0	-	12,7	5,6	1,3	2,8	2,8	1,3

**Tabela 4.1.1.** Sastav FF formulacija (F1-F10) odabranih za dalja fizičko-hemijska i mehanička ispitivanja.

Ekscipijensi	Sastav (% m/m)									
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
Eudragit® RS PO	8,5	10,0	17,5	-	-	4,0	-	-	12,5	12,0
Eudragit® NE 30 D	-	-	-	-	6,0	-	-	-	-	-
Klucel® GF	-	-	-	3,5	-	1,0	2,5	2,5	-	-
PVA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TEC	-	2,0	-	-	-	-	-	-	2,5	-
MCT	-	-	-	0,7	-	-	0,7	-	-	2,4
Propilenglikol	1,0	-	3,5	-	-	0,5	-	0,7	5,0	-
EtOH	86,7	84,7	73,4	95,8	-	92,9	96,8	96,8	75,9	81,6
Izopropil alkohol	-	-	-	-	85,0	-	-	-	-	-
Polisorbat 80	1,0	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-
Voda do	100	100	100	-	100	100	-	-	100	100

PVA= polivinilalkohol; TEC= trietil-citrat; MCT= srednje-lančani trigliceridi; EtOH= etanol 96%,  
Voda = prečišćena voda.

**Tabela 4.1.2.** Sastav FF formulacija (F11-F20) odabranih za dalja fizičko-hemijska i mehanička ispitivanja.

Ekscipijensi	Sastav (% m/m)									
	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20
Eudragit® RS PO	12,5	12,5	-	-	8,5	15,0	4,0	8,5	17,5	-
Eudragit® NE 30 D	-	-	8,5	-	-	-	-	-	-	5,5
Klucel® GF	-	-	-	3,5	-	-	1,0	-	-	-
PVA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TEC	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MCT	-	-	-	-	-	3,0	-	-	3,5	-
Propilenglikol	-	2,5	-	1,0	1,0	-	5,0	1,0	-	-
EtOH	80,8	82,0	78,8	92,5	74,8	77,0	88,7	87,4	75,0	86,3
Izopropil alkohol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polisorbat 80	-	0,5	-	3,0	3,0	-	-	0,3	-	-
Voda do	100	100	100	-	100	100	100	100	100	100

**Tabela 4.1.3.** Sastav optimalnih „placebo” film-formirajućih formulacija, odabranih za dalja *in vitro* i *in vivo* istraživanja.

Ekscipijensi	Sastav (% m/m)						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	PF*
Eudragit® RS PO	8,5	10,0	17,5	-	-	4,0	-
Eudragit® NE 30 D	-	-	-	-	6,0	-	-
Klucel® GF	-	-	-	3,5	-	1,0	-
PVA	-	-	-	-	-	-	10,0
TEC	-	2,0	-	-	-	-	-
MCT	-	-	-	0,7	-	-	-
Propilenglikol	1,0	-	3,5	-	-	0,5	0,5
EtOH	86,7	84,7	73,4	95,8	-	92,9	-
Izopropil alkohol	-	-	-	-	85,0	-	-
Polisorbat 80	1,0	-	-	-	-	0,3	-
Voda do	100	100	100	-	100	100	100

\*PF = poredbena formulacija na bazi PVA kao referentnog film-formirajućeg polimera, uključena u *in vivo* fazu eksperimentalnog rada

#### 4.1.2. Fizičko-hemijska, senzorna i mehanička karakterizacija optimalnih film-formirajućih sistema

Poredbeni prikaz dobijenih vremena sušenja (tabela 4.1.4.) ukazuje na prednost korišćenja inkubatorske komore koja značajno skraćuje test, obezbeđujući rezultate koji se relevantnije odnose na realno vreme sušenja uzoraka filmova na temperaturi kože. Među ispitivanim FFS, formulacija F2 (izrađena sa 10 % m/m katjonskog polimera RS) je okarakterisana sa značajno kraćim vremenom sušenja u poređenju sa formulacijama koje sadrže nižu koncentraciju istog polimera (uzorak F1 sa 8,5 % RS), neutralnog polimera NE ili pak hidrofilnog polimera HPC. Interesantno je da ispitivana kombinacija polimera u uzorku F6 rezultira istim vremenom sušenja kao i u slučaju F2, sugerišući da dodatak hidrofilnog polimera u niskoj koncentraciji od 1 % (u ovom slučaju HPC) omogućava značajno smanjenje udela hidrofobnog polimera (konkretno, smanjenje sa 10 % na 4 % polimera RS). Sledstveno, na osnovu izmerenih vremena sušenja na temperaturi kože izabrane formulacije mogu biti klasifikovane u tri grupe:

1. Grupa sa vremenom sušenja  $\leq 5$  min (kojoj pripadaju uzorci F2 i F6),
2. Grupa sa vremenom sušenja unutar opsega 5-7 min (uzorci F1, F3 i F5), i
3. Grupa sa vremenom sušenja  $> 7$  min (samo uzorak F4).

Interesantno je istaći da povećanje koncentracije polimera RS od 10 % (u uzorku F2) na 17,5 % (uzorak F3) ne utiče linearno na vreme sušenja filma na 32 °C. Sa druge strane, dodatak polisorbata 80 u koncentraciji od 1 % (uzorak F1) očigledno igra značajnu ulogu u produženju vremena sušenja filma na 32 °C, i to na 6 min 40 s. Stoga bi količina ovog nejonskog surfaktanta mogla biti smanjena, uzimajući u obzir pogodno vreme sušenja uzorka F6 koji sadrži 0,3 % polisorbata 80. Može se reći da je koncentracija polisorbata 80 od 0,3 % sasvim dovoljna za većinu

uloga koju jedna površinski aktivna materija može imati u sastavu FFS (npr. solubilizacija ili poboljšanje penetracije inkorporirane lekovite supstance).

Povećanje koncentracije HPC od 2,5 % do 3,5 % (u uzorku F4) dovodi do značajnog povećanja vremena sušenja filma na 32 °C. Imajući u vidu produženo vreme dispergovanja HPC tokom izrade FFS uzoraka, duže vreme sušenja filma je drugo nepoželjno svojstvo koje se može pripisati ovom hidrofilnom polimeru. Ovi nalazi izvesno su povezani sa molekulskom masom i polarnom površinom datog polimera (Produtturi i sar., 2004), a pokazaće se da utiču i na topografiju nastalog filma .

**Tabela 4.1.4.** Deskriptivni i numerički parametri dobijeni tokom evaluacije odabranih *in situ* film-formirajućih formulacija (srednja vrednost  $\pm$  SD,  $n=3$ ).

Formulacija	Organoleptički izgled i lepljivost filma nakon sušenja (32 °)	Vreme sušenja filma (32,0 $\pm$ 0,1°C) (min)	Vreme sušenja filma (25,0 $\pm$ 2,0°C) (min)	Površina filma (mm <sup>2</sup> )
F1	Bezbojan, bistar, sjajan, strukturiran, homogen, niske lepljivosti	6,6 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	24,0 $\pm$ 0,6 <sup>e</sup>	223,0 $\pm$ 21,2 <sup>d</sup>
F2	Bezbojan, blago zamućen, strukturiran, homogen, niske lepljivosti	4,6 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	32,0 $\pm$ 2,5 <sup>f</sup>	121,0 $\pm$ 2,0 <sup>d</sup>
F3	Kristalno-transparentan, bezbojan, fino strukturiran, homogen, niske lepljivosti	5,3 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>	22,0 $\pm$ 2,0 <sup>e</sup>	79,0 $\pm$ 1,5 <sup>g</sup>
F4	Bele boje, zamućen, uniformno strukturiran, homogen, niske lepljivosti	13,5 $\pm$ 0,9 <sup>d</sup>	40,0 $\pm$ 0,6 <sup>d</sup>	24,0 $\pm$ 1,2 <sup>d</sup>
F5	Bistar do blago zamućen, bezbojan, fino strukturiran, homogen, niske lepljivosti	6,3 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	48,0 $\pm$ 1,5 <sup>d</sup>	72,0 $\pm$ 5,2 <sup>g</sup>
F6	Beličast, blago zamućen, homogen, niske lepljivosti	4,6 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	32,0 $\pm$ 2,0 <sup>f</sup>	83,0 $\pm$ 1,5 <sup>g</sup>

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa formulacijama F2, F4 i F6

<sup>b</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa formulacijama F1, F4 i F5

<sup>c</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa formulacijom F4

<sup>d</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa svim ispitivanim formulacijama

<sup>e</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa formulacijama F2, F4, F5 i F6

<sup>f</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa formulacijama F1, F3, F4 i F5

<sup>g</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa formulacijama F1, F2 i F4

Posebno je važno napomenuti da je najduže vreme sušenja filma na sobnoj temperaturi (48,0  $\pm$  1,5 min) (tabela 4.1.4.) pokazala formulacija F5 sa polimerom NE. S obzirom da je u pitanju

formulacija sa najvećim sadržajem prečišćene vode, ovaj fenomen se može objasniti transformacijom ovakvih sistema, odnosno evaporacijom prisutne frakcije vode. Naime, kod vodenih disperzija polimera, u kompleksnom procesu formiranja filma, evaporacija vode se odvija različitim brzinama u nekoliko (obično 3) faza (Vanderhoff i sar., 2007; Yang i Craig, 2020; slika 1.5.). U procesu sušenja filma koji se odvija *in situ*, primetna je postepena transformacija sistema F5 od mlečno-koloidne disperzije do transparentnog ili blago zamućenog kontinuiranog filma. Takođe, u poređenju sa ostalim ispitivanim FF formulacijama samo prisustvo vode kao polarnog rastvarača u povećanom sadržaju (9 %), očekivano produžava vreme sušenja filma na sobnoj temperaturi. Potrebno je naglasiti da ostale ispitivane FF formulacije sadrže između 0 i 5,6% prečišćene vode u svom sastavu. Ovi nalazi su potvrdili potrebu za detaljnijom procenom fenomena transformacije/metamorfoze uzoraka, što je i jedan od zahteva već spomenutog EMA Nacrta vodiča za kvalitet i ekvivalentnost topikalnih proizvoda. U nedostatku regulatorno preporučene/preporučenih metode/metoda za ispitivanje transformacije uzoraka, odgovarajući protokol je razvijen i sproveden u okviru druge faze eksperimentalnog rada.



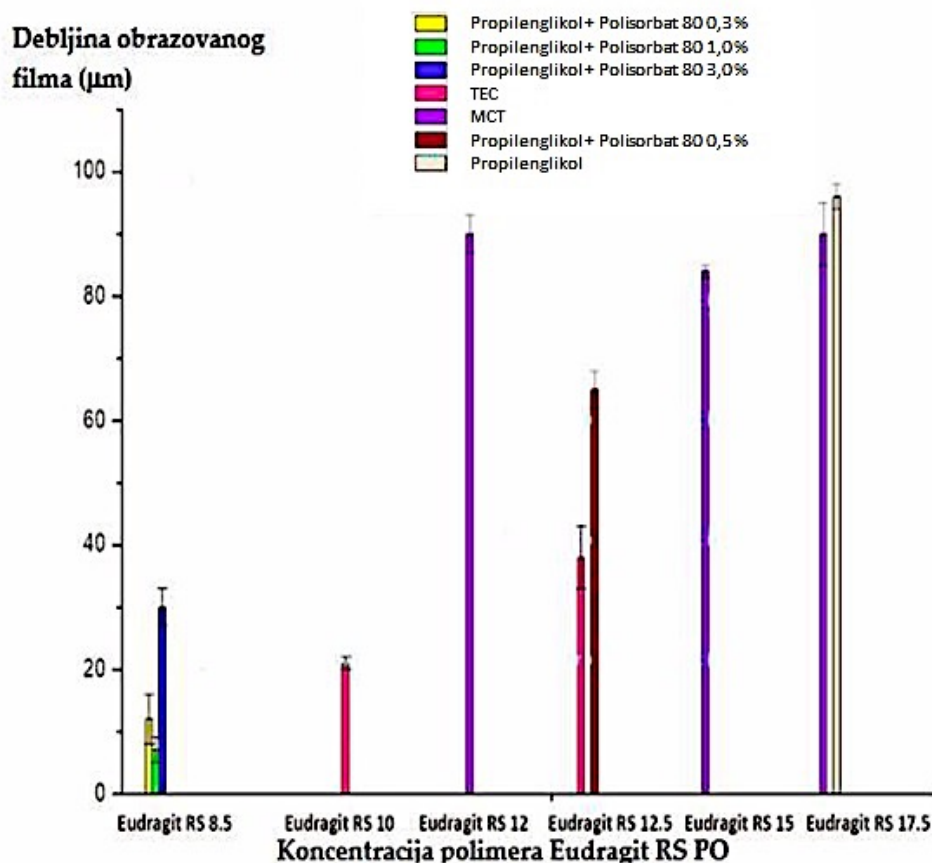
**Slika 4.1.** Ilustracija finalne transformacije FFS u procesu sušenja.

Film-formirajuće formulacije su među nekoliko sistema za dermalnu isporuku koje zahtevaju istovremeno razmatranje senzornih i mehaničkih svojstava. U pogledu kozmetičkih (estetskih) svojstava, formulacija F3 se pokazala formulacijom izbora, obrazujući kristalno-transparentne, homogene filmove sa niskom lepljivošću nakon sušenja na 32 °C, kao i nakon sušenja na sobnoj temperaturi. Zapravo, samo uzorak koji sadrži HPC kao glavni i jedini polimer u obrazovanju filma je ocenjen kao intenzivno zamućen. Stoga, ova karakteristika može biti negativno ocenjena od strane pacijenta i uticati na komplijansu.

Razmatrajući primarno i lateralno širenje FFS na mikroskopskoj pločici kao odabranom supstratu u ovoj fazi ispitivanja, povećanje sadržaja polimera RS očekivano vodi ka smanjenju obrazovane površine filma (tabela 4.1.4.). Međutim, najmanja površina je ipak izmerena za uzorak na bazi HPC, sa najmanjim potencijalom širenja na mikroskopskoj pločici, ali i činjenicom da je uzorak okarakterisan sa dužim vremenom sušenja pod ambijentalnim uslovima (čak  $40,0 \pm 0,6$  min). Zaključuje se da je difuziona površina filma kao parametar u direktnoj vezi sa samim viskozitetom FFS, što je kasnije i bilo potvrđeno u okviru reološke studije. Takođe, izmerena površina difuzije film-formirajućih formulacija može biti smernica tokom odabira optimalne ambalaže (npr. bočica sa kapaljkom, mehaničkim raspršivačem ili ventilom drugačijeg dizajna).

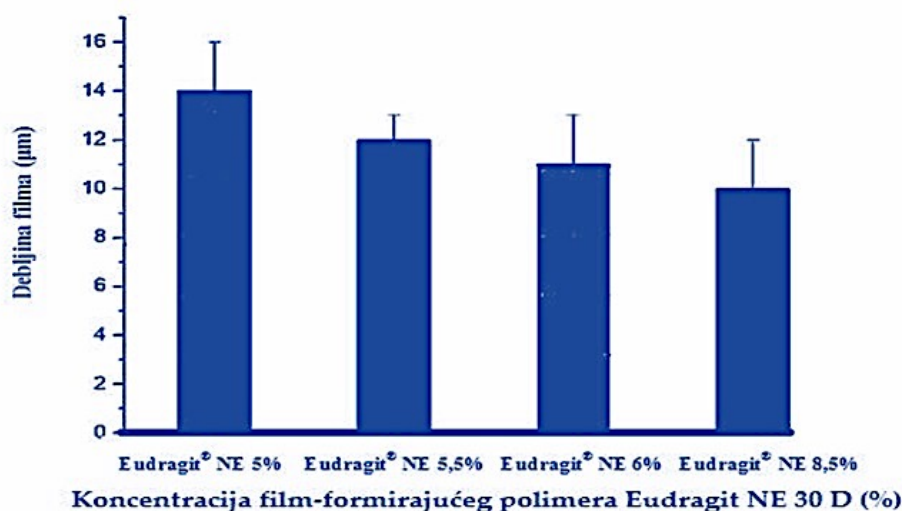


Rezultati karakterizacije FFS u pogledu vrednosti rolovanja (uvijanja) filma i debljine filma su prikazani u tabeli 4.1.5. Formirani filmovi su okarakterisani sa sveukupno prihvatljivom debljinom, u opsegu od 0,007 do 0,096 mm, poboljšavajući na taj način njihovu prihvatljivost od strane pacijenta, koji date filmove na koži ili ne osećaju ili ih ne doživljavaju kao opterećenje. Kao što je očekivano, povećanje sadržaja RS polimera dovodi do postepenog povećanja debljine generisanih filmova. Najdeblji film je formiran sa najvećom upotrebljenom koncentracijom polimera RS od 17,5 % (0,096 mm), dok je formulacija F1 (8,5 % m/m polimera RS ) obrazovala veoma tanki film sa najmanjom debljinom (0,007 mm) (tabela 4.1.5. i slika 4.1.1.). Formulacija sa RS polimerom u koncentraciji od 15% je imala debljinu filma 0,084 mm (slika 4.1.1). Očekivano, formulacija zasnovana na polimeru HPC u koncentraciji od 3,5 % je obezbedila film veće debljine (0,046 mm) u poređenju sa formulacijom sa 2,5 % HPC (0,032 mm).



**Slika 4.1.1.** Promena debljine filma u funkciji koncentracije Eudragit® RS PO kao film-formirajućeg polimera i primenjenog plastifikatora; srednja vrednost  $\pm$  SD,  $n=3$ .

Zaključuje se da je u slučaju polimera HPC i RS debljina *in-situ* formiranih filmova u FFS u direktnoj zavisnosti i korelaciji sa izabranim tipom polimera i njegovom koncentracijom, ukazujući time da sa povećanjem koncentracije navedenih polimera dolazi do značajnog povećanja debljine filma. Nasuprot tome, u slučaju polimera NE kao samostalnog u sastavu FFS, samo povećanje koncentracije polimera od 5,0 % do 8,5 % dovodi do blagog smanjenja debljine filma (slika 4.1.2.).



**Slika 4.1.2.** Smanjenje debljine filma sa povećanjem koncentracije Eudragit<sup>®</sup> NE 30 D polimera u opsegu 5,0 - 8,5%; srednja vrednost  $\pm$  SD,  $n=3$ .

Međutim, debljina filma sama po sebi ne može da služi kao mera sveobuhvatnih mehaničkih svojstava filma, s obzirom da je uzorak F1 sa najmanjom debljinom rezidualnog filma zapravo okarakterisan kao uzorak sa najpoželjnijom fleksibilnošću. Zapažanja koja se odnose na uzorke F1-F3, bazirane na istom film-formirajućem polimeru (8,5 – 17,5 % m/m hidrofobnog Eudragit<sup>®</sup> RS PO), ilustruju značaj optimizacije FFS, gde se poželjna svojstva filma mogu postići čak i pri nižim koncentracijama FF polimera. Dodatno, kombinacija ovog polimera sa 1 % m/m hidrofilnog polimera HPC se pokazala optimalnom opcijom, koju uz to karakteriše i visoka otpornost na mehaničke stimuluse. Ovakvi zaključci bi mogli dovesti do bržeg razvoja efikasnih terapijskih pristupa koji su uz to kozmetički prihvatljiviji za savremenog pacijenta, ali i ekonomičniji u pogledu sirovinskih troškova.

**Tabela 4.1.5.** Vrednosti rolovanja (uvijanja) filma, debljine filma i pH vrednosti odgovarajućih film-formirajućih rastvora/disperzija (srednja vrednost  $\pm$  SD,  $n=3$ ).

Formulacija	Vrednost uvijanja filma	Debljina filma (mm)	pH vrednost
<b>F1</b>	112,0 $\pm$ 2,9 <sup>a</sup>	0,007 $\pm$ 0,002 <sup>f</sup>	6,9 $\pm$ 0,1 <sup>g</sup>
<b>F2</b>	54,0 $\pm$ 3,2 <sup>b</sup>	0,021 $\pm$ 0,001 <sup>d</sup>	6,1 $\pm$ 0,1 <sup>d</sup>
<b>F3</b>	95,0 $\pm$ 1,5 <sup>c</sup>	0,096 $\pm$ 0,002 <sup>d</sup>	6,7 $\pm$ 0,1 <sup>e</sup>
<b>F4</b>	78,0 $\pm$ 1,5 <sup>c</sup>	0,046 $\pm$ 0,001 <sup>d</sup>	8,3 $\pm$ 0,1 <sup>d</sup>
<b>F5</b>	56,0 $\pm$ 3,5 <sup>b</sup>	0,011 $\pm$ 0,002 <sup>d</sup>	7,5 $\pm$ 0,1 <sup>d</sup>
<b>F6</b>	105,0 $\pm$ 9,0 <sup>e</sup>	0,033 $\pm$ 0,003 <sup>f</sup>	6,6 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa formulacijama F2, F3, F4 i F5

<sup>b</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa formulacijama F1, F3, F4 i F6

<sup>c</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa formulacijama F1, F2, F4 i F5

<sup>d</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa svim ispitivanim formulacijama

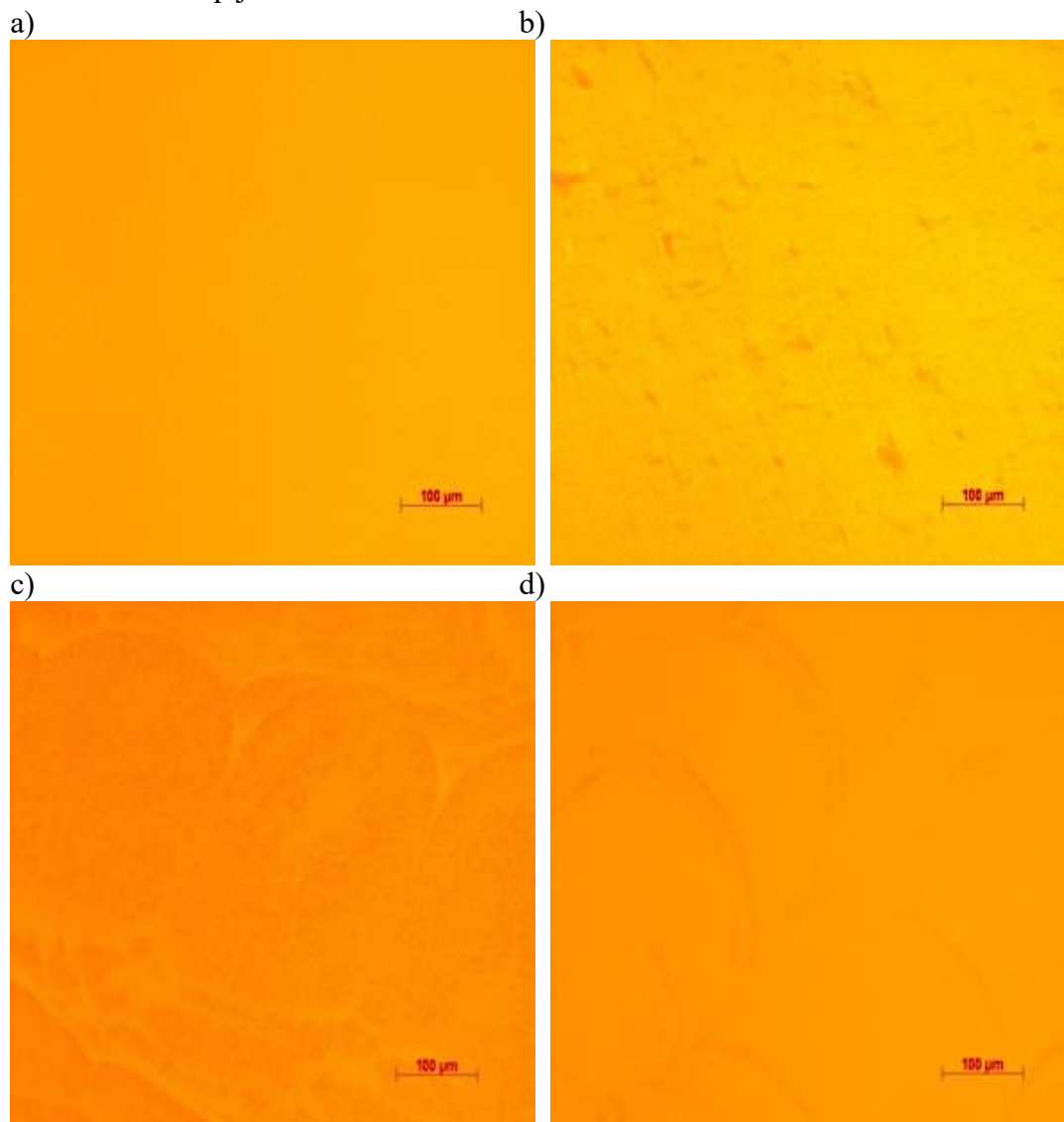
<sup>e</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa formulacijama F2, F4 i F5

<sup>f</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa formulacijama F2, F3, F4 i F6

<sup>g</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa formulacijama F2, F4, F5 i F6

### 4.1.3. Procena mikrostrukture formiranog filma primenom polarizacione mikroskopije

Kako bi se detektovalo prisustvo eventualno nerastvornih/nedispergovanih agregata polimera predlaže se primena dodatnih metoda za karakterizaciju, kao što su svetlosna ili poželjno polarizaciona mikroskopija.



**Slika 4.1.3.** Uticaj izabranog tipa polimera i njegove koncentracije na mikrostrukturu filma: (a) formulacija sa 17,5 % polimera Eudragit® RS PO; b) formulacija sa 3,5 % polimera Klucel® GF; c) formulacija sa 8,5 % polimera Eudragit® NE 30 D; d) formulacija sa 8,5 % polimera Eudragit® NE 30 D i izopropil alkoholom.

Na slici 4.1.3. predstavljen je mikroskopski izgled filmova obrazovanih na predmetnom staklu, a nakon potpunog sušenja na sobnoj temperaturi. Za neke od polimernih film-formirajućih nosača dobijene mikrografije ukazuju na odsustvo nedispergovanih agregata polimera. Interesantno, mikrografije formulacije sa najvećom koncentracijom RS polimera (čak 17,5 % u formulaciji F3) ne ukazuju na vidljive agregate (slika 4.1.3.a), dok formulacija sa polimerom Klucel® GF (HPC, uzorak F4) pokazuje vidljive agregate sa veličinom u mikrometarskom opsegu (slika 4.1.3.b). Njihovo prisustvo se objašnjava otežanim dispergovanjem polimera Klucel® GF na sobnoj temperaturi, i potrebom za njegovim produženim mešanjem. Takođe, utvrđeno je da izopropil

alkohol kao glavni rastvarač u formulaciji sa polimerom Eudragit® NE 30 D (8,5 %) poboljšava njegovu rastvorljivost i obrazovanje homogene mikrostrukture filma (slika 4.1.3.d) u odnosu na mikrostrukturu filma kada izopropil alkohol nije prisutan u formulaciji (slika 4.1.3.c).

Uočene razlike u mikrostrukturi formiranih filmova između ispitivanih formulacija FFS ukazuju na značaj ove metode u preliminarnom izboru određenog tipa polimera i njegove koncentracije kod polimernih sistema nosača, ali i značaj prisustva određenog tipa rastvarača ili njihove međusobne kombinacije.

#### **4.1.4. pH vrednosti razvijenih film-formirajućih sistema**

Formulacione studije u novijim pristupima orijentisanim prema mikrobiomu kože (Byrd i sar., 2018) posvećuju više pažnje pH vrednosti kože, ali isto tako i pH vrednosti samih uzoraka namenjenih za primenu na koži (Kuo i sar., 2020). Ovo je posebno od značaja kod prospektivnih film-formirajućih sistema koji su dizajnirani za ciljanu i poboljšanu isporuku lekovite supstance i produženo zadržavanje na koži.

Zahvaljujući prilično heterogenim sastojcima, pH vrednost ispitivanih FFS se kretala u širem opsegu, od 6,1 - 8,3 pH jedinica (tabela 4.1.5). Dok su formulacije F1, F2, F3 i F5 imale gotovo neutralne pH vrednosti opšte prihvatljive i za zdravu i za bolesnu kožu, uzorak F4 je pokazao veću pH vrednost od  $8,3 \pm 0,1$ . Iako bazni pH topikalnih uzoraka nije *a priori* poželjan, prema specifikaciji datog film-formirajućeg polimera, HPC, proizvođač navodi da se u gornjoj polovini pH skale očekuje bolja stabilnost formulacija tokom čuvanja.

Sa aspekta racionalnijeg korišćenja polimernih sastojaka, te prospektivne racionalnije terapije, konstatovano je da uzorak F3 sa najvećom koncentracijom polimera RS (17,5 % m/m) može biti izostavljen iz daljih eksperimenata, dok je u daljim ispitivanjima uključena dodatna kontrolna (poredbena) formulacija (označena kao PF) na bazi PVA (10 % vodena disperzija sa propilenglikolom). PVA je izabran u svojstvu referentnog hidrofilnog polimera, koji se do skora smatrao „zlatnim standardom” među film-formirajućim polimerima (Ghoshal i sar., 2012).

## 4.2 Rezultati i diskusija druge faze eksperimentalnog rada

### 4.2.1. *In vivo* procena iritacionog potencijala razvijenih film-formirajućih sistema

Tokom razvoja novih preparata za topikalnu primenu, već u ranoj fazi neophodna je procena njihovog iritacionog potencijala na koži, kao jednog od najčešćih neželjenih efekata takvih formulacija (Pantelić, 2013). Ovaj segment ispitivanja je posebno značajan kod formulacija sa visokim sadržajem organskih rastvarača, kao što je većina film-formirajućih sistema.

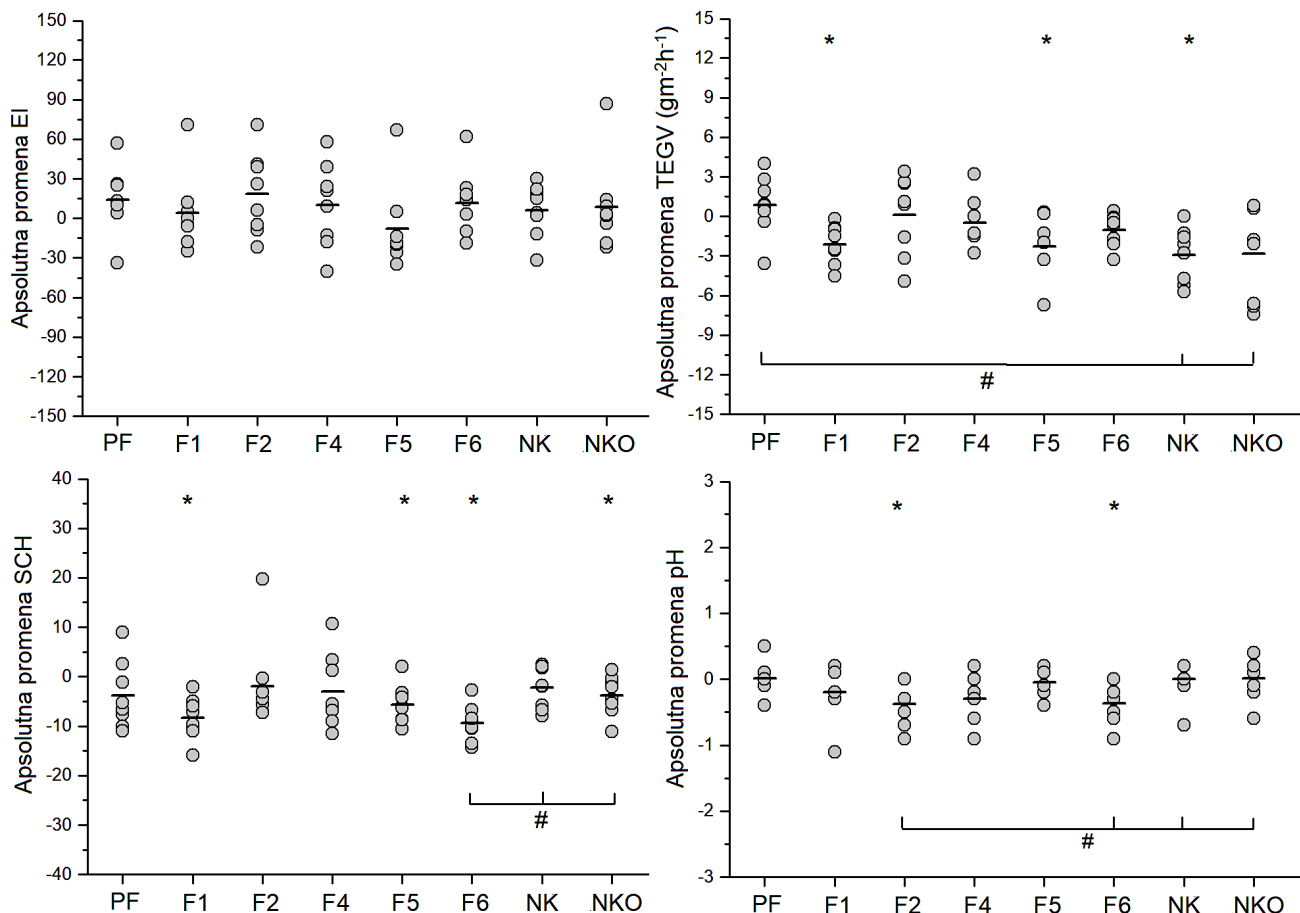
U prvoj fazi studije ocenjen je *in vivo* iritacioni potencijal prethodno odabranih „placebo” film-formirajućih formulacija (F1, F2, F4, F5, F6 i PF) merenjem EI nakon 24 h okluzije. Dodatno, kako bi se stekao dublji uvid u potencijalne efekte na koži, kao dodatni biofizički parametri od interesa praćeni su TEGV, SCH i pH kože. Sva četiri biofizička parametra mogu ukazati na (ne)kompatibilnost ispitivanih formulacija sa kožom. Takođe, promene vrednosti navedenih parametara mogu pružiti i detaljniji uvid u mehanizme interakcija ispitivanih uzoraka (ili pojedinih sastojaka) sa kožom.

Jedan sat nakon uklanjanja okluzije, vizuelnim pregledom kože tretirane ispitivanim formulacijama FFS, nisu bile vidljive bilo kakve neželjene manifestacije na koži. Takođe, ni ispitanici nisu osećali potrebu da prijave neprijatne senzacije povezane sa primenom ispitivanih FFS (npr. toplota, peckanje ili svrab na mestu primene).

Kao što je i bilo očekivano, a tokom studije instrumentalno potvrđeno, nisu uočene statistički značajne promene u vrednostima EI u odnosu na bazalne vrednosti test-mesta, niti obe netretirane kontrole (slika 4.2.1.a). Takođe, nisu detektovane ni statistički značajne razlike u vrednostima promena ovog parametra između ispitivanih formulacija, što ukazuje na dobru podnošljivost na koži svih ispitivanih FFS.

Suprotno parametru EI, tip polimera koji je korišćen u izradi ispitivanih formulacija pokazao je značajan uticaj na vrednosti TEGV tokom studije. TEGV je biofizički parametar koji ukazuje na integritet kožne barijere. Uzorci F1 i F5, pripremljeni korišćenjem Eudragit® RS PO i Eudragit® NE 30 D polimera respektivno, dovode do značajnog smanjenja ovog parametra u odnosu na bazalne vrednosti (t-test,  $p < 0,05$ ) (slika 4.2.1.b). Tačnije, smanjenje TEGV je iznosilo između 40-50%, sugerišući da formirani filmovi delimično blokiraju isparavanje vode na površini ispoljavajući time polu-okluzivni efekat na koži (Casiraghi i sar., 2002; Zhai i sar., 2007).

Međutim, treba napomenuti da svi testirani uzorci dovode do smanjenja SCH u poređenju sa bazalnim vrednostima, pri čemu statistički značajno smanjenje vlažnosti *stratum corneum*-a pokazuju F1, F5, i posebno uzorak F6 (t-test ili Wilcoxon test, u zavisnosti od prirode podataka  $p < 0,05$ ) (slika 4.2.1.c).



**Slika 4.2.1.** Efekat ispitivanih polimernih film-formirajućih sistema (F1, F2, F4, F5, F6), kao i referentnog uzorka sa PVA (PF) na promenu vrednosti (a) eritema indeksa (EI), (b) transepidermalnog gubitka vode (TEGV), (c) stepena hidratisanosti *stratum corneum*-a (SCH) i (d) pH kože. Parametri su izraženi kao apsolutne promene vrednosti dobijenih 1 h nakon uklanjanja okluzije u odnosu na bazalne (inicijalno izmerene) vrednosti za svaku od ispitivanih polimernih formulacija, netretiranu kontrolu pod okluzijom (NKO) i netretiranu kontrolu bez okluzije (NK).  
 \*  $p < 0,05$  u odnosu na bazalne vrednosti; # statistički značajna razlika između NKO i svih ispitivanih formulacija FFS.

Na prvi pogled, ovo otkriće nije bilo u potpunosti u skladu sa rezultatima merenja TEGV, pošto se očekivalo izvesno povećanje SCH. Međutim, treba imati na umu da polu-okluzivni filmovi ipak omogućavaju veći transport vode u poređenju sa okluzivnim filmovima (Zhai i sar., 2007). Stoga, smanjenje vlažnosti kože može biti pripisano relativno visokom sadržaju isparljivih rastvarača (etanol, izopropil alkohol) prisutnih u razvijenim FFS uzorcima. Takođe, čini se da dodatak plastifikatora, poput TEC i MCT u odgovarajućim formulacijama (F2 i F4), rezultirajući filmovima veće debljine (poređenjem sa F1 i F5), uspeva da umanja efekat dehidracije korišćenih rastvarača (nisu primećene statistički značajne promene u SCH vrednostima, Wilcoxon test  $p > 0,05$ ).

Dodatno, poredeći dobijene rezultate TEGV i SCH kod ispitivanih formulacija sa obe netretirane kontrole (NK i NKO) nisu primećene statistički značajne razlike (ANOVA ili Kruskal-Wallis test,  $p > 0,05$ ) osim kod F6 (slike 4.2.1b i 4.2.1c). Međutim, treba napomenuti da su vrednosti izmerenih biofizičkih parametara bile neznatno smanjene na oba netretirana mesta, dok je okluzija sama po sebi ispoljila marginalni efekat na koži tokom studije. Ipak ovo nije iznenađujuće,

pošto na merenja TEGV i SCH mogu uticati i najmanje ambijentalne ili individualne (npr. emocionalne ili hormonalne) promene (Schroeder i sar., 2007a). S druge strane, interesantno je da referentni uzorak (PF) sa PVA kao film-formirajućim polimerom dovodi do značajnog povećanja TEGV u poređenju sa netretiranim kontrolama (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Pošto primenu uzorka PF nisu pratile značajne promene u nivoima SCH, primećeno povećanje TEGV bi moglo biti pripisano higroskopskim svojstvima PVA kao film-formirajućeg polimera, pre nego suštinskim promenama u integritetu kožne barijere.

Na kraju, analizirajući pH vrednosti kože (slika 4.2.1.d) primetno je da su samo uzorci F2 i F6 doveli do statistički značajne promene ovog parametra u odnosu na njihove bazalne vrednosti (t-test,  $p < 0,05$ ) kao i u odnosu na obe netretirane kontrole (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Međutim, ipak treba naglasiti da su ove dve formulacije indukovale, iako statistički značajan, blagi pad pH vrednosti kože nakon 24-časovne okluzije (od  $5,3 \pm 0,3$  do  $4,9 \pm 0,4$  za oba uzorka). Stoga je potpuno razumljivo da uočene male razlike u pH vrednostima (unutar 0,5 pH jedinica) neće značajno uticati na *in vivo* ponašanje potencijalnog proizvoda, tj. leka. Zanimljivo je da uzorak F4, uprkos nešto višoj pH vrednosti same formulacije, nije ispoljio statistički značajan efekat na promenu pH vrednosti kože.

Sveukupno, svi zaključci prve faze *in vivo* studije potvrđuju da ispitivani FFS, uprkos visokom sadržaju organskih rastvarača i supstantivnosti primenjenih film-formirajućih polimera, nemaju značajan potencijal za iritaciju kože. To je omogućilo osmišljavanje i sprovođenje preostalih faza *in vivo* studije.

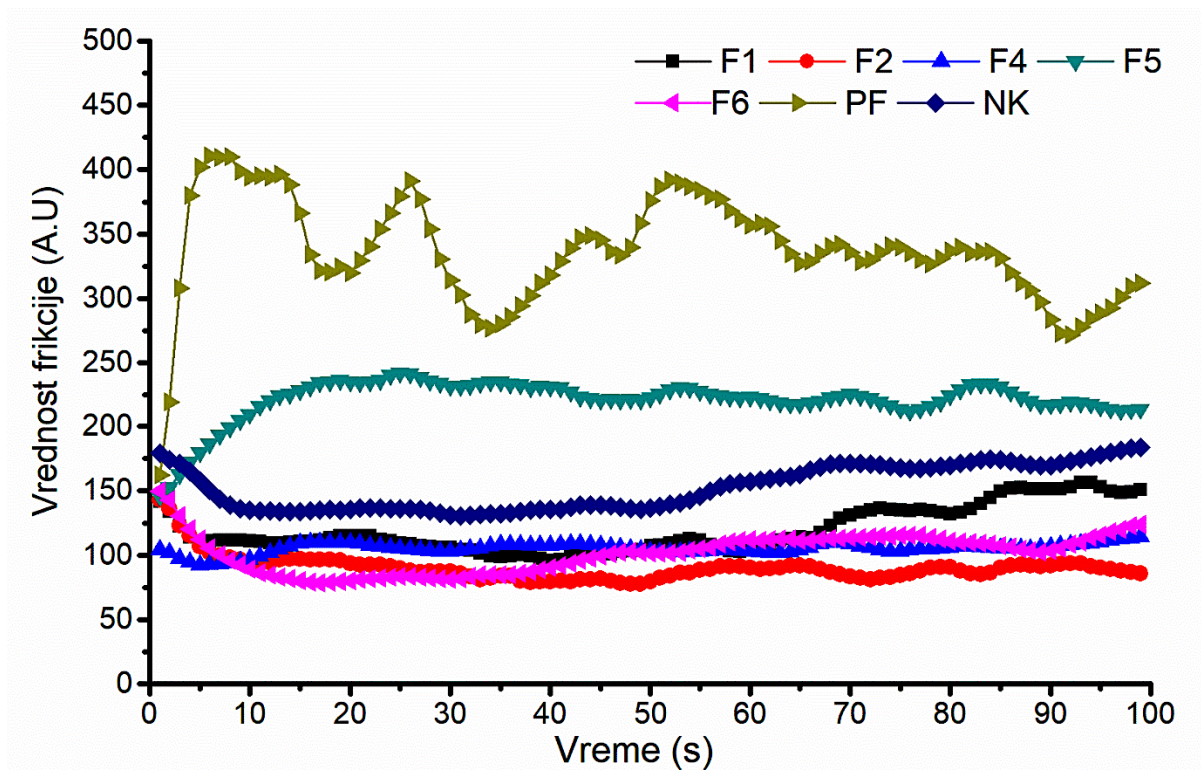
#### **4.2.2. *In vivo* procena supstantivnosti razvijenih film-formirajućih sistema**

Dinamična transformacija FFS koja se odigrava u veoma kratkom vremenskom periodu nakon primene na koži (tj. nakon rapidne evaporacije organskih rastvarača na temperaturi kože), zajedno sa potencijalom da smanjuju učestalost primene leka, zahteva potrebu za dodatnom *in vivo* procenom ovakvih sistema.

Kako bi se dobio dalji uvid u značajne interakcije koje se odvijaju između kože i generisanih filmova, reflektovanih kao odraz interakcija koje se odigravaju između generisanih filmova i sonde korišćenog uređaja, u drugoj fazi studije izvršena su merenja petog biofizičkog parametra kože – frikcije, koja pripadaju tribološkoj sferi. Generalno, otpor prema torziji koji najpre pokazuje FFS (u tečnom stanju), a zatim obrazovani film, ukazuje redom na: lakoću razmazivanja, metamorfozu FFS, supstantivnost formulacije, glatkoću filma, mehanička svojstva i integritet obrazovanog filma. Ove karakteristike su od presudnog značaja za potencijalni terapijski efekat inkorporiranih lekovitih supstanci, određujući vreme zadržavanja leka, kinetiku oslobađanja i efikasnost perkutane penetracije (Monica i sar., 2020).

Na slici 4.2.2. prikazani su rezultati frikcije izmereni 5 min nakon aplikacije ispitivanih FFS na volarnoj strani obe podlaktice dobrovoljaca, u poređenju sa netretiranom kontrolom (frikcija čiste kože). Za razliku od uzorka F5 i PF, uočeno je da su formulacije F1, F2, F4 i F6 ispoljile značajan lubrikantni efekat na koži, koji se ogledao u niskim vrednostima frikcionog parametra u poređenju sa netretiranom kontrolom. Međutim, detaljniji uvid u vreme koje je potrebno da frikciona kriva dostigne plato, njegova pozicija i dužina (slike 4.2.2 i 4.2.3), bili su u korelaciji sa izabranim tipom polimera i njegovom koncentracijom, odnosno sa rezultatima fizičko-hemijske i mehaničke karakterizacije koji su izloženi u prethodnom odeljku rada.





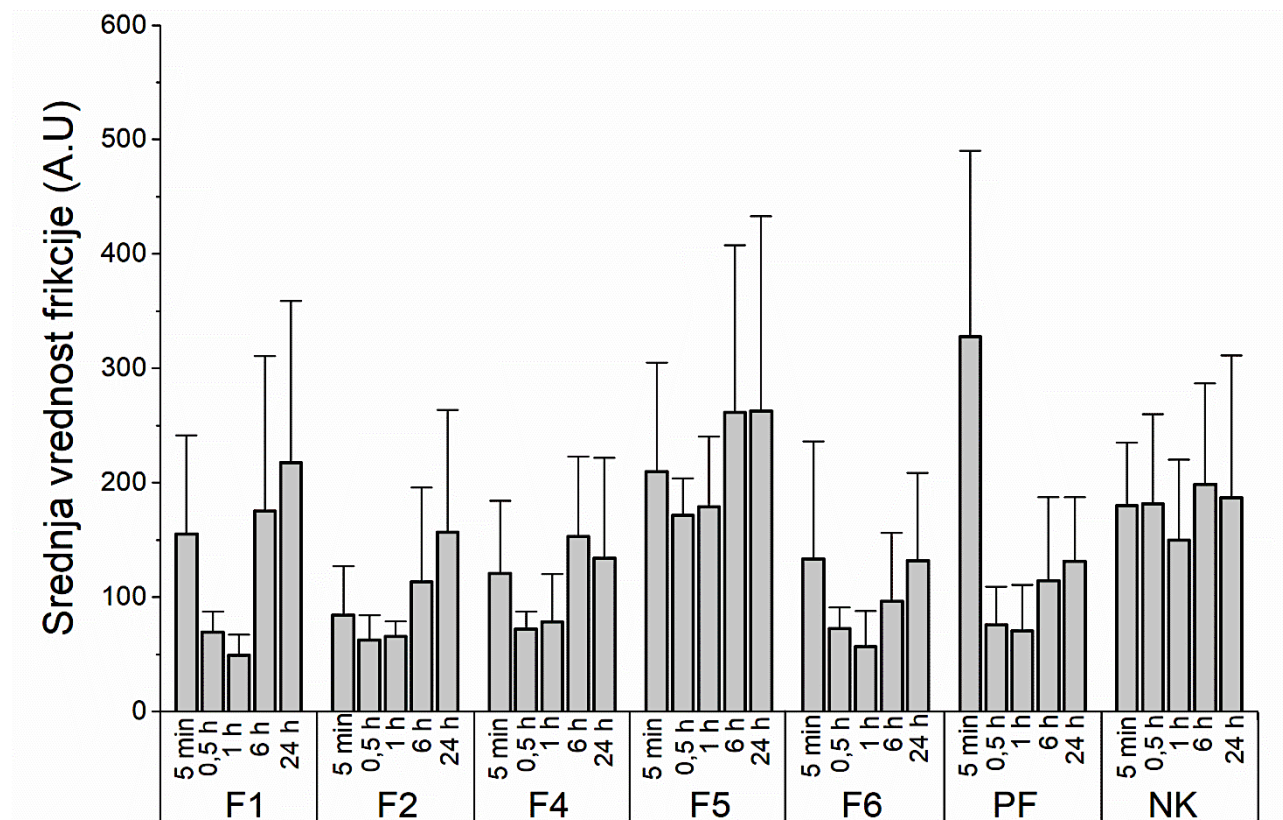
**Slika 4.2.2.** Uporedni prikaz dobijenih triboloških kriva (promena koeficijenta frikcije u funkciji vremena) ispitanih 5 min od inicijalnog nanošenja formulacija FFS, odnosno merenjem čiste kože (netretirana kontrola, NK).

U slučaju formulacije F1 pripremljene sa hidrofobnim polimerom RS (8,5 %), plato je dostignut već nakon približno 5 s sa trajanjem do približno 20 s merenja. Nakon 40 s primećeno je blago postepeno povećanje frikcionog koeficijenta. Ovaj površinski fenomen se može objasniti evaporacijom značajne frakcije prisutnih rastvarača tokom merenja, kao i izvesnim stepenom lepljivosti rezidualnog filma (Gore i sar., 2020). Interesantno je da uključivanje dodatnog polimera kao što je HPC (uzorak F6) produžava vreme potrebno za dostizanje platoa (približno 20 s) i njegovo trajanje (do približno 40 s), istovremeno uzrokujući niže vrednosti koeficijenta frikcije. Ovo bi se moglo pripisati većoj debljini filma nastalog od formulacije F6 u poređenju sa formulacijom F1, kao i poboljšanim lubrikantnim efektom.

Isto tako, treba imati u vidu da formirani glatki filmovi pružaju manji otpor prilikom uvrtnja kože od strane sonde, dajući niže vrednosti frikcije. Međutim, ova pretpostavka zahteva dodatnu potvrdu, pre svega detaljnim analiziranjem površinske topografije filmova uz pomoć odgovarajućih tehnika, kao što je AFM (treća faza eksperimentalnog rada). U slučaju uzorka F2 (pripremljenog sa 10 % polimera RS i 2 % TEC kao plastifikatora) i F4 (pripremljenog sa 3,5 % HPC i 0,7 % MCT), izraženi lubrikantni efekat omogućava zadržavanje relativno stabilnih i niskih koeficijenata frikcije tokom posmatranog vremenskog perioda, dajući krive sa neznatnim promenama tokom kontinuiranog merenja od 100 s. Interesantno je napomenuti da iako ove dve formulacije ispoljavaju različita vremena sušenja na 32 °C ( $F2 = 4,6 \pm 0,1$  min i  $F4 = 13,5 \pm 0,9$  min), nije primećena značajna razlika u pogledu dobijenih vrednosti koeficijenata frikcije. Sa druge strane, ispitivanje uzorka F5 koji sadrži: 6 % polimera NE u obliku vodene disperzije (ukupno 9% vode u finalnom uzorku) i 85% izopropanola, i kontrolne formulacije (PF) koja sadrži: 10 % PVA, 0,5 % propilenglikola i 89,5 % vode, praćeno je značajno višim vrednostima frikcionog parametra u



poređenju sa netretiranom kontrolom (slike 4.2.2. i 4.2.3.). Ovo se može objasniti procesom evaporacije vode iz navedenih formulacija, kako je već diskutovano u prvoj fazi eksperimentalnog rada za uzorak F5 sa nešto višim sadržajem vode u poređenju sa ostalim ispitivanim uzorcima. Na primeru ovog uzorka vidi se da iza samog procesa formiranja filma stoji kompleksan proces dinamičke transformacije sa evaporacijom vode koja se odigrava u svim fazama formiranja filma, ali perzistira i kasnije iz već obrazovanog filma (porast frikcionog parametra i nakon 6 h, kao i nakon 24 h). Nasuprot tome, kod poredbenog uzorka PF evaporacija vode se dešava isključivo u fazi obrazovanja filma, odnosno najveći rast frikcionog parametra registrovan je nakon 5 min.



**Slika 4.2.3.** Praćenje frikcionog parametra u vremenskim tačkama nakon 5 min, nakon 30 min, nakon 1 h, nakon 6 h i nakon 24 h od primene poredbene (PF) i ispitivanih formulacija FFS (F1, F2, F4, F5 i F6) uz netretiranu kontrolu (NK); srednja vrednost  $\pm$  SD.

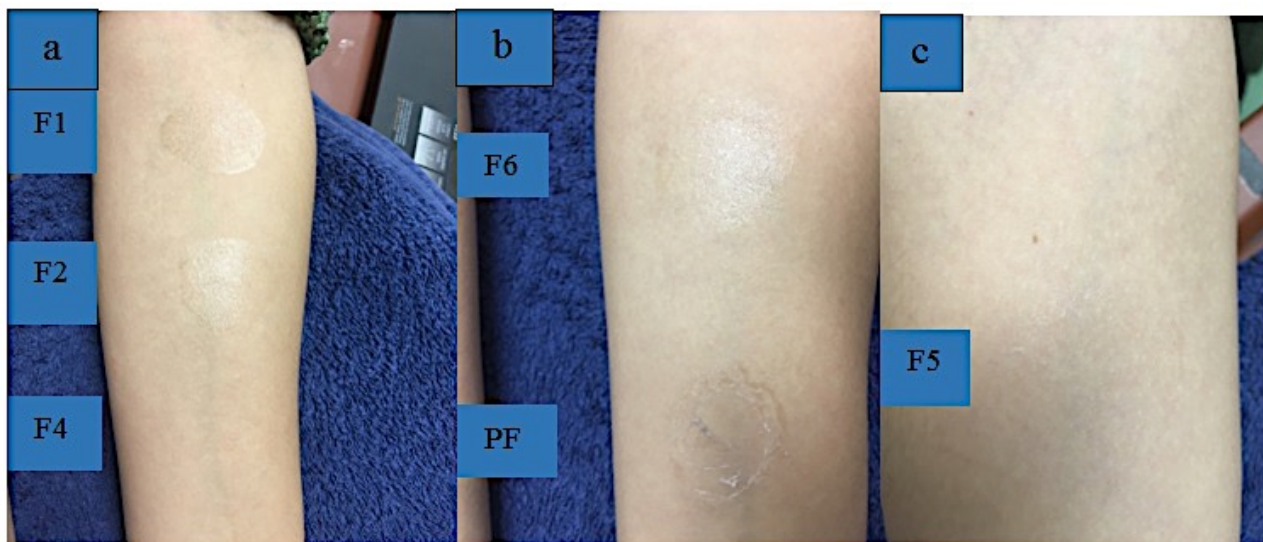
Činjenica da prisustvo vode povećava frikcionu otpor između sonde i kože je potvrđena i empirijski jer se na početku merenja oseća jako klizanje (šetanje) sonde po koži usled prisustva vode. Iz tog razloga je i vrednost frikcije bila naročito povećana u inicijalnoj fazi formiranja filma kada je brzina evaporacije vode najveća (slike 4.2.2. i 4.2.3).

Obično je vrednost frikcije veća na samom početku merenja, a zatim postepeno opada do vrednosti platoa (Gore i sar., 2018). S obzirom da nije otkrivena korelacija u vezi sa vremenima sušenja filmova na 32 °C i drugim fizičko-mehaničkim svojstvima ispitanih filmova, izrazito neravne krive (posebno za poredbeni uzorak PF) mogu biti pripisane povećanoj adhezivnoj sili između kontaktnog materijala (teflonske sonde uređaja Frictiometer® FR700) i nastalih filmova nakon dinamičnog procesa metamorfoze.

Ukoliko FFS u tečnom stanju nazovemo *primarnom formulacijom*, analiza dobijenih triboloških profila omogućava nam da pretpostavimo značaj momenta dostizanja platoa kao početka tzv. *sekundarne formulacije* u okviru kompleksne transformacije FFS, dok je *tercijarno stanje*

najbolje opisano kompletnim sušenjem filma. U nedostatku zvanično preporučenih metoda ispitivanja transformacije topikalnih uzoraka, ispitivanje frikcije nakon aplikovanja FFS i njihove rapidne dinamičke transformacije od tečnog stanja do suvog filma, može uspešno ukazati na ključne sličnosti i razlike ispitivanih uzoraka.

Promene srednjih vrednosti frikcije na test-mestima tretiranim sa ispitivanim film-formirajućim sistemima i netretiranom kontrolom nakon 24 h su prikazane na slici 4.2.3. Tokom 1 h, srednja vrednost frikcije postepeno opada kod svih ispitivanih formulacija (srednji frikcionni koeficijent je bio značajno niži u odnosu na netretiranu kontrolu, osim za formulaciju F5), usled evaporacije rastvarača i obrazovanja homogenih, fino-strukturiranih filmova na površini kože (slika 4.2.4.).



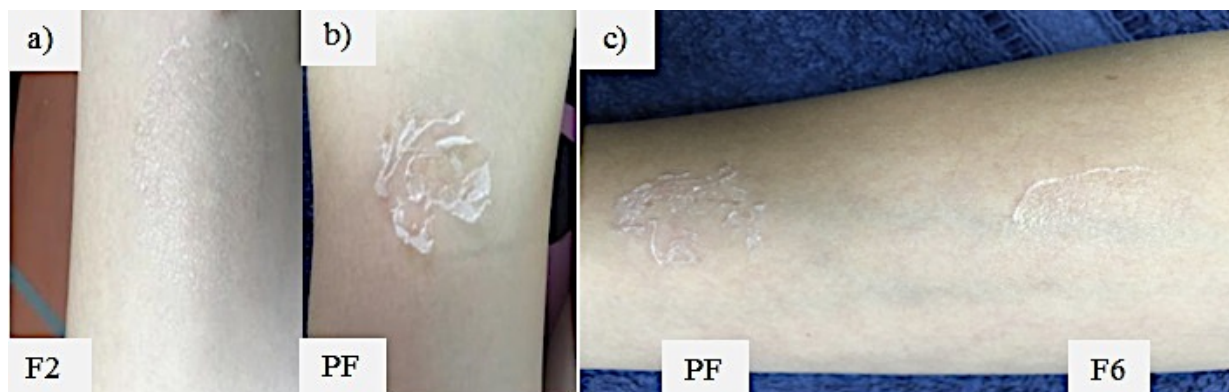
**Slika 4.2.4.** Izgled filmova obrazovanih na podlakticama ispitanika 1 h nakon aplikovanja: a) uzoraka F1, F2 i F4; b) uzoraka F6 i PF; c) uzorka F5.

Dodatno, treba napomenuti da je najizraženije smanjenje koeficijenta frikcije otkriveno za poredbeni uzorak, na bazi PVA kao polimera. Ovo otkriće je bilo očekivano, uzimajući u obzir studiju opisanu od strane Pailler-Mattei i sar. (2009). Naime, autori su uočili značajno povećanje frikcionog koeficijenta kože 5 min nakon primene destilovane vode usled prisustva kapilarne adhezivne sile između sonde i kože, sa vraćanjem u početno stanje nakon oko 30 min. Na osnovu navedenog, može se zaključiti da, pošto je poredbeni uzorak sadržao najveću količinu vode (89,5%), njeno prisustvo povećava frikcionni otpor između sonde i kože, što se manifestuje kratkotrajnim osećajem „klizanja” na koži, ne pružajući suštinsku lubrikaciju. Shodno tome, koeficijent frikcije za PF je značajno opao nakon 1 h, usled kompletne evaporacije vode iz odgovarajućeg filma na površini kože.

Nakon 6 h, srednja vrednost frikcije se postepeno povećala kod svih ispitivanih formulacija, jasno izražavajući promene u strukturi filmova i njihovoj supstantivnosti. Drugim rečima, kod uzoraka F1, F4 i PF čini se da sa vremenom vrednost frikcionog parametra polako dostiže vrednosti netretirane kontrole. Slično je uočeno tokom organoleptičkog posmatranja izgleda površine filmova na koži, gde je kod formulacija F4 i PF, baziranih isključivo na hidrofilnim film-formirajućim polimerima, došlo do postepenog odvajanja formiranih filmova sa površine kože i vidljivog ljuštenja, te stoga, ovakvi filmovi nisu mogli da se dugo zadrže na površini kože, kao što je i pokazano u sprovedenom ispitivanju nakon 24 h (slike 4.2.4.a, 4.2.4.b i 4.2.5.b.).

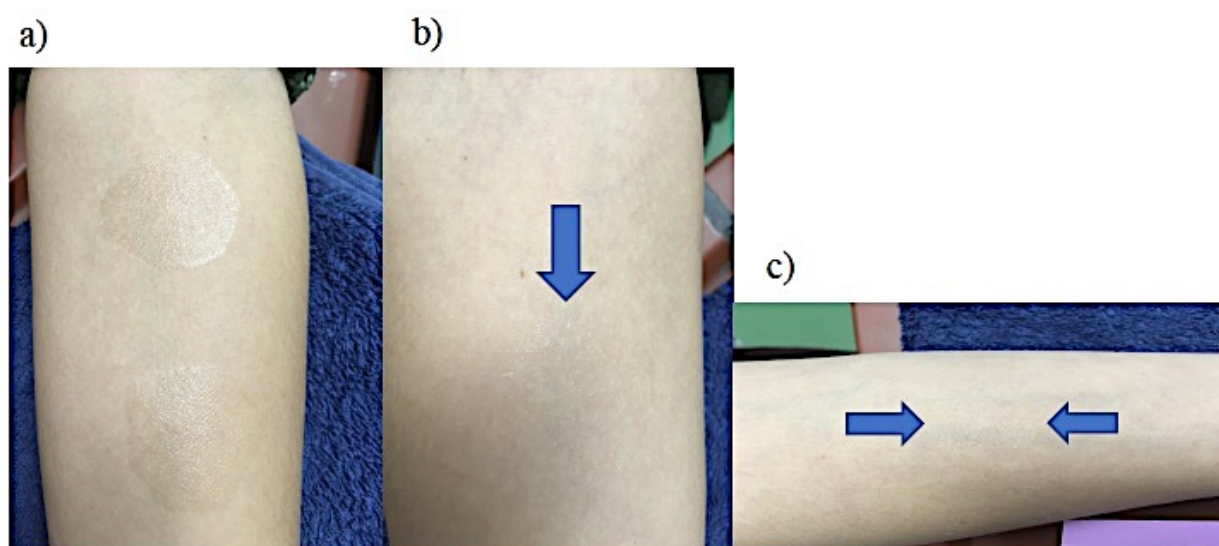
Za razliku od pomenutih, filmovi nastali od formulacija F1 i F2 su imali kompletno očuvanu strukturu i sjajan izgled na koži (slika 4.2.6.a), kao i primetnu postojanost nakon 6 h (slike 4.2.7.a,

4.2.7.b i 4.2.8.a), ali i nakon 24 h od nanošenja (slika 4.2.6.c), dok je film nastao od formulacije F5 bio jedva primetan već nakon 1 h od aplikacije na volarnoj strani podlaktice ispitanika (slike 4.2.4.c i 4.2.6.b).



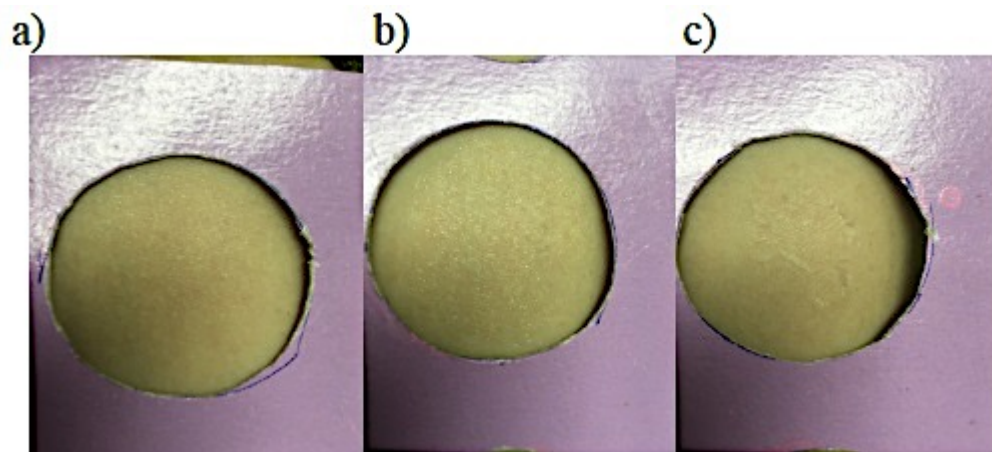
**Slika 4.2.5.** a) Vizuelni prikaz postojanosti filma na bazi hidrofobnog polimera RS (F2); b) odvajanje i ljuštenje filma poredbene formulacije (PF) na bazi hidrofilnog polimera PVA; c) prikaz filma poredbene formulacije i filma na bazi kombinacije hidrofobnog polimera RS i hidrofilnog polimera HPC (uzorak F6) 6 h nakon aplikovanja na podlaktici ispitanika.

Ova otkrića su bila u skladu sa onima publikovanim od strane Monica i sar. (2020) koji su pokazali da polimetakrilatni uzorci zahtevaju veću silu da bi se odvojili od kože u poređenju sa uzorcima na bazi HPC. Stoga, razumno je očekivati duže zadržavanje polimetakrilatnih filmova na površinama kože koje su izložene većoj frikciji (npr. intertriginozne regije). Međutim, treba naglasiti da nije uočena statistički značajna razlika između formulacije F2 (postojan i trajan film) i F4 (film koji nije postojan, odvađa se sa površine kože) u pogledu srednje vrednosti frikcije određene 24 h nakon primene uzoraka ( $156,5 \pm 107,1$  i  $133,9 \pm 87,8$ , respektivno).

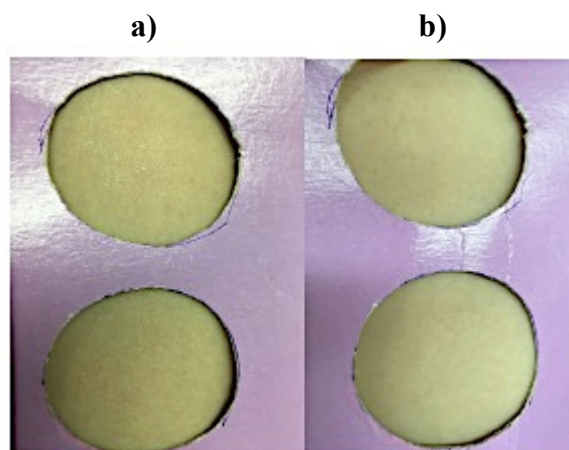


**Slika 4.2.6.** Izgled i celovitost filmova a) formiranih 1 h nakon primene formulacija F1 i F2; b) skoro neprimetan film 1 h nakon primene uzorka F5; c) prikaz postojanosti filma koji potiče od uzorka F2 nakon 24 h.





**Slika 4.2.7.** Izgled filmova formiranih nakon 6 h od inicijalnog aplikovanja na podlaktici ispitanika, koji potiču od uzoraka: a) F1; b) F2; i c) F4.



**Slika 4.2.8.** Komparativni prikaz izgleda i postojanosti filmova nakon 6 h od nanošenja na kožu 2 različita ispitanika (redosled uzoraka od gore prema dole): a) F1 i F2; b) F5 i F6.

Formulacija F5 na bazi hidrofobnog neutralnog polimera NE (dostupnog u obliku vodene disperzije) je pokazala potpuno drugačije i neočekivano tribološko ponašanje u odnosu na ostale ispitivane uzorke, održavajući relativno visoku vrednost frikcije tokom eksperimenta (slike 4.2.2 i 4.2.3). Pored prethodno navedenog, ovakvo ponašanje bi dodatno moglo da bude pripisano relativno nižim bioadhezivnim svojstvima NE polimera usled odsustva plastifikatora u nastalom filmu (prema proizvođačkoj specifikaciji za polimer NE nije potrebno dodatno prisustvo plastifikatora) (Ammar i sar., 2009; Evonik Industries, 2007), kao i delimično činjenici da generisani film značajno povećava SCH kao biofizički parametar kože koji je direktno odgovoran za promene u fizičkim i mehaničkim svojstvima *stratum corneum*-a (Mojumdar i sar., 2017). To je naknadno i registrovano osetljivom sondom uređaja Frictiometer® FR700. Sa druge strane, kao što je prethodno i objašnjeno, nastali film podleže kompleksnom procesu transformacije. Ovo je uočeno i organoleptički prilikom ispitivanja brzine sušenja filma (opisano u odeljku 4.1.2). Takođe, od svih ispitivanih uzoraka formirani film je bio najmanje uočljiv na koži (gotovo nevidljiv) (slike 4.2.8.b. gornja polovina; 4.2.9; i 4.2.10.). Ova otkrića su ukazala na potrebu za uključivanjem dodatnih tehnika karakterizacije, posebno AFM kojom bi se dublje sagledala postojanost filmova kod ovakvih sistema.



**Slika 4.2.9.** Izgled filma nastalog nakon primene uzorka F5, 24 h od aplikovanja na unutrašnjoj strani podlaktice ispitanice.



**Slika 4.2.10.** Izgled filma 6 h od aplikovanja uzorka F5.

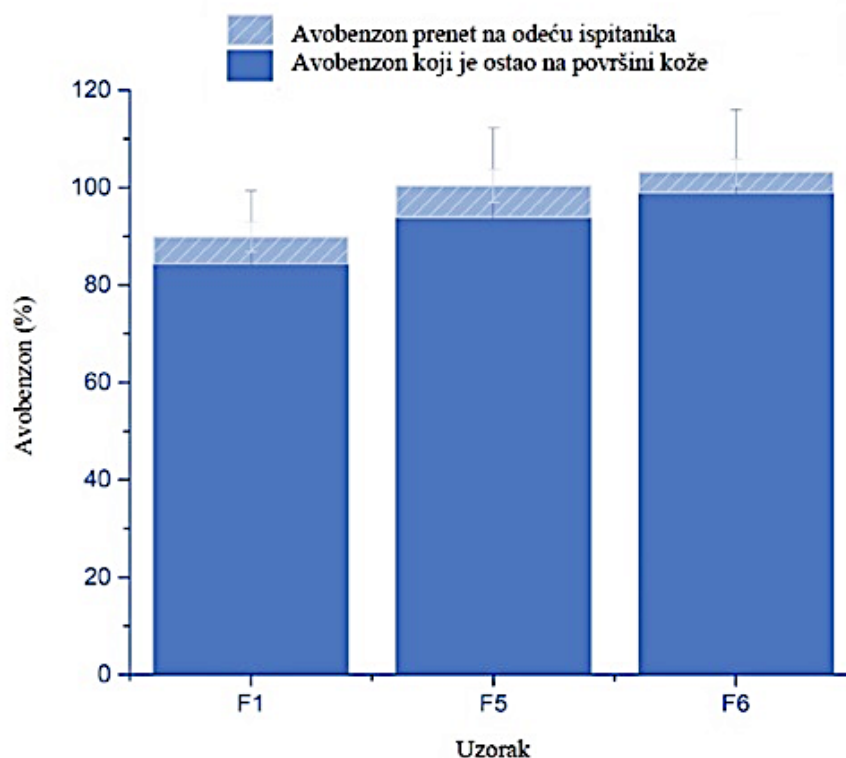
Produženo oslobađanje lekovitih supstanci može biti korisno u različitim indikacijama i terapijskim protokolima, uključujući gljivične infekcije, *pediculosis capitis*, psorijazu, *acne vulgaris*, *rosacea*, atopijski dermatitis, iritantni kontaktni dermatitis i druga kožna oboljenja i stanja. Stoga, metodologija korišćena u narednom segmentu *in vivo* studije imala je za cilj da supstantivnost ispitivanih FFS potvrdi u realnim uslovima primene, omogućavajući FFS kao potencijalnim nosačima lekovitih supstanci da obezbede produženu, ali kontrolisanu perkutanu penetraciju, pružajući na taj način više prednosti savremenim protokolima lečenja.

Razumevanje fenomena supstantivnosti i dizajniranje supstantivnih formulacija nije od interesa samo za farmaceutsku, već i kozmetičku industriju (primer kozmetičkih formulacija za zaštitu kože od sunca). Sa većom supstantivnošću, učestalost primene leka može biti značajno smanjena, povećavajući komplijansu (Li i sar., 2014). Za ovu svrhu u ovom delu *in vivo* studije, odabrana su tri uzorka: F1 na bazi hidrofobnog katjenskog polimera RS, F5 na bazi hidrofobnog neutralnog polimera NE i uzorak F6 sa kombinacijom hidrofobnog polimera RS i hidrofilnog polimera HPC.

Na slici 4.2.11. je prikazan procenat model aktivne supstance (avobenzona) koji je iz filma (sa kože) ipak prenet na tkaninu (imitacija odeće), kao i procenat avobenzona koji je zadržan u

filmu, odnosno na površini kože ispitanika. Može se reći da su sva tri ispitivana uzorka pokazala više nego zadovoljavajuću supstantivnost, s obzirom da su uspešno zadržali avobenzon na površini kože (preko 85%), odnosno dozvolili prenos manje frakcije avobenzona na odeću.

Uprkos činjenici da se bolja supstantivnost *a priori* pripisuje katjonskim materijalima, uzorak F5 se pokazao nešto boljim od uzorka F1 u ovoj studiji. Pa ipak, najveća supstantivnost je pripisana uzorku F6 ( $99,07 \pm 16,99$  % avobenzona zadržano na površini kože), potvrđujući optimalan odnos hidrofobnog RS i hidrofilnog HPC polimera (4:1) koji je već uočen ranije, tokom skrininga fizičko-mehaničkih svojstava. Kod 4 ispitanika procent zadržavanja na tkanini se kretao između 2-3%, što je u skladu i sa zapažanjima iznetim tokom 24-časovne studije frikcije. Prema tome, završni deo *in vivo* studije je dokazao visoku supstantivnost testiranih FFS, pri čemu je na odeću ispitanika preneto svega između 4,13 % i 6,50 % model aktivne supstance.



**Slika 4.2.11.** Procent avobenzona kao model aktivne supstance zanemarljive sposobnosti perkutane penetracije, koji je tokom studije supstantivnosti prenet sa primenjenog dermalnog filma na tkaninu koja je imitirala odeću ispitanika (glatki barovi), odnosno koji je zadržan na površini kože ispitanika (šrafirani barovi).

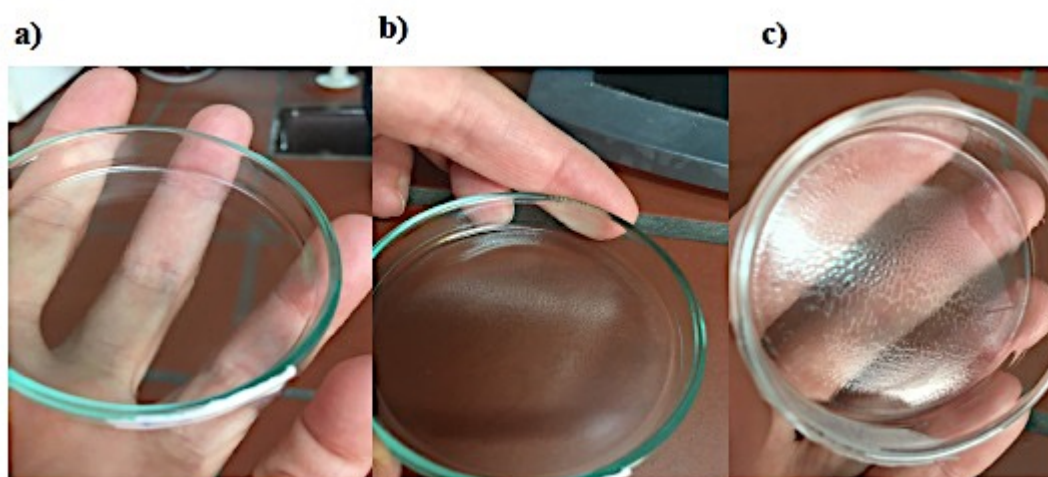
Ipak, važno je istaći da se relativno visoka standardna devijacija pokazala kao neizbežna karakteristika ovakvih studija, a posledica je varijacije u fizičkoj aktivnosti dobrovoljaca od trenutka nanošenja uzoraka do njihovog uklanjanja sa kože (Schmidberger i sar., 2019).

### 4.3. Rezultati i diskusija treće faze eksperimentalnog rada

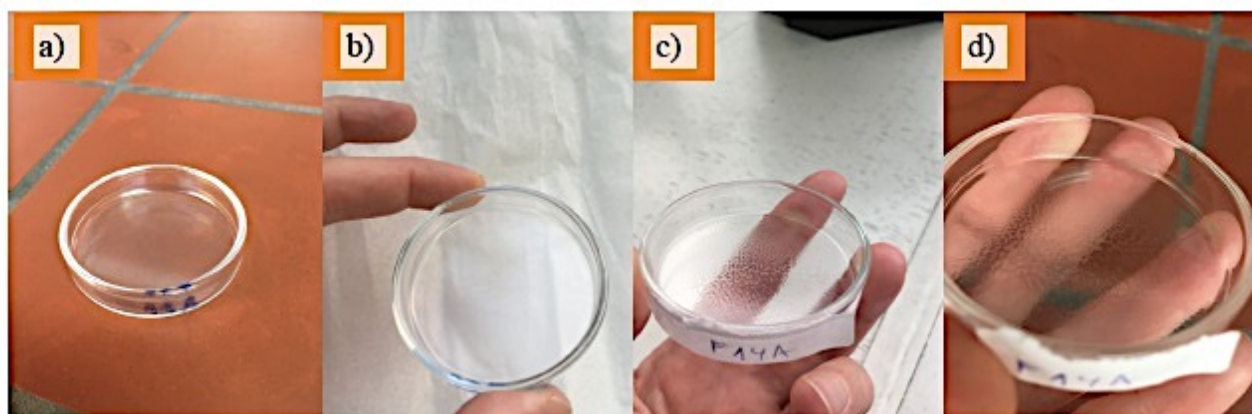
#### 4.3.1. Fizičko-hemijska, reološka i mikroskopska karakterizacija odabranih film-formirajućih sistema bez i sa betametazondipropionatom, praćena preliminarnom studijom stabilnosti

Nakon temeljne procene samih FFS, izvršeno je inkorporiranje izabrane model lekovite supstance, betametazondipropionata. Iako su sva fizičko-hemijska, mehanička i senzorna ispitivanja opisana u prvoj fazi eksperimentalnog rada sprovedena i za tzv. aktivne uzorke (označene sa F1A, F2A, F3A, F4A, F5A, odnosno F6A), rezultati pojedinih metoda karakterizacije sugerisali su isključivanje određenih formulacija iz daljeg istraživanja, odnosno ukazali na uzorke F1A, F5A i F6A kao prospektivne za potencijalne dalje faze tehnološkog razvoja.

Organoleptički izgled i karakteristična svojstva filmova sa betametazondipropionatom nakon završne transformacije odabranih film-formirajućih formulacija u procesu sušenja je prikazan u nastavku (slike 4.3.1.1 i 4.3.1.2; tabela 4.3.1.).



Slika 4.3.1.1. Organoleptički izgled različitih filmova nakon završne transformacije FFS sa betametazondipropionatom: a) F1A; b) F5A; c) F6A.



Slika 4.3.1.2. Izgled filmova na tamnoj i svetloj podlozi nakon sušenja na 32 °C: a) i b) za formulaciju F5A; c) i d) za formulaciju F6A.

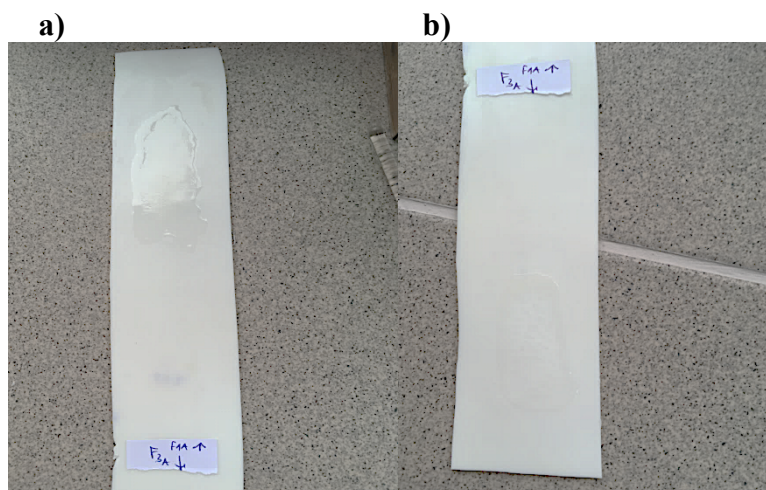
**Tabela 4.3.1.** Evaluacija odabranih *in-situ* film-formirajućih formulacija sa inkorporiranom model lekovitom supstancom, betametazondipropionatom (srednja vrednost  $\pm$  SD,  $n=3$ ).

Formulacija*	Organoleptički izgled i lepljivost filma nakon sušenja ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ )	Vreme sušenja filma ( $32 \pm 0,1^\circ\text{C}$ ) (min)	Vreme sušenja filma ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) (min)	Površina filma ( $\text{mm}^2$ )	Vrednost uvijanja filma	Debljina filma (mm)	pH vrednost
F1A	Bezbojan, transparentan, sjajan, strukturiran, homogen, niske lepljivosti	$6,6 \pm 0,1^a$	$24,0 \pm 0,6^c$	$210,0 \pm 14,2^c$	$111,0 \pm 2,0$	$0,007 \pm 0,001^c$	$7,10 \pm 0,07$
F5A	Bezbojan, blago zamućen, fino strukturiran u vidu sitnih brazda nalik na kožu, homogen, niske lepljivosti	$6,3 \pm 0,1$	$47,0 \pm 0,6^c$	$77,0 \pm 1,0^c$	$54,0 \pm 2,0^d$	$0,015 \pm 0,002^c$	$7,70 \pm 0,06^d$
F6A	Beličast, blago zamućen, strukturiran poput saća, homogen, mat, niske lepljivosti	$5,0 \pm 0,1^b$	$31,0 \pm 1,2^c$	$84,0 \pm 3,0^c$	$107,0 \pm 1,0$	$0,032 \pm 0,006^c$	$7,00 \pm 0,23$

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa F6A; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa F1A; <sup>c</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa svim ispitivanim formulacijama; <sup>d</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa F1A i F6A.

\* Numeričke oznake formulacija odgovaraju sastavu datom u tabeli 4.1.3. Dodatna oznaka A sugerise da formulacija sadrži aktivnu supstancu betametazondipropionat u terapijskoj koncentraciji od 0,064 %, što odgovara 0,05 % betametazona.





**Slika 4.3.1.3.** Izgled filmova nakon testa uvijanja: a) film sjajne i glatke površine obrazovan nakon primene uzorka F1A, i b) film površine koja nalikuje strukturi saća, nastao nakon primene i sušenja uzorka F6A.

Poređenjem rezultata dobijenih tokom fizičko-hemijske karakterizacije uzoraka bez model lekovite supstance (tabele 4.1.4. i 4.1.5.) sa onim prikazanim u tabeli 4.3.1. može se zaključiti da inkorporiranje betametazondipropionata nije uslovalo značajnu promenu u vrednostima praćenih parametara. Prisustvo betametazondipropionata se nije odrazilo na promenu organoleptičkih karakteristika kako tečnih uzoraka, tako i filmova obrazovanih nakon evaporacija prisutnih rastvarača. Nije registrovana ni značajna promena vremena potrebnog za potpuno sušenje filmova. Određene promene u površinama difuzije uzoraka su se mogle primetiti, ali bez jasne korelacije. Naime, prisustvo betametazondipropionata dovelo je do smanjenja površine filma sa  $223,0 \pm 21,2 \text{ mm}^2$  za uzorak F1, na  $210,0 \pm 14,2 \text{ mm}^2$  za uzorak F1A. U slučaju uzorka F5, odnosno F5A, promena je išla u smeru izvesnog povećanja površine, sa  $72,0 \pm 5,2 \text{ mm}^2$  na  $77,0 \pm 1,0 \text{ mm}^2$ , respektivno.

Što se tiče vrednosti uvijanja i debljine filmova, takođe su registrovane izvesne promene, bilo u kontekstu smanjenja ili povećanja vrednosti, ali bez statističke značajnosti.

Rezultati pH vrednosti izmereni inicijalno nakon izrade uzoraka ukazuju da nije bilo značajnih promena pH vrednosti u odnosu na iste uzorke bez prisustva BD, s tim da je kod uzoraka sa prisustvom BD izmeren neznatno veći pH (od 0,1 do 0,2 pH jedinice) u poređenju sa njihovim placebo uzorcima ( $6,9 \pm 0,1$ ,  $7,5 \pm 0,1$ ,  $6,6 \pm 0,1$  za F1, F5 i F6). Ovo je bilo i očekivano jer je BD neutralno jedinjenje. Kao što se može videti u tabeli 4.3.1. najveća pH vrednost je dobijena za formulaciju F5A. Ovakva pH vrednost koja je u baznom opsegu pH vrednosti ukazuje i na potencijal poželjnije anticipirane perkutane resorpcije (Parhi i Goli, 2020). Dobijene vrednosti takođe, ukazuju da FFS sa BD neće dovesti do iritacije kože ili bilo kojih drugih neželjenih reakcija kod pacijenta, što je prethodno i potvrđeno *in vivo* studijom na odgovarajućim uzorcima bez prisustva model lekovite supstance. Rezultati pH vrednosti praćeni tokom studije preliminarnе stabilnosti uzoraka biće prokomentarisani u poslednjem delu ovog odeljka koji se odnosi na ispitivanje stabilnosti.

Reološka ispitivanja su značajna za FFS jer, između ostalog, omogućavaju potpuniju analizu bioadhezivnih svojstava polimernih filmova, obezbeđujući informacije o ponašanju polimernih lanaca, posebno u pogledu rigidnosti i deformabilnosti tokom tranzicije iz tečnog u čvrsto stanje (Eouani i sar., 2001). Prema tome, da bi se u potpunosti okarakterisali polimerni FF sistemi sa i bez prisustva model lekovite supstance, betametazondipropionata, i da bi se pratila njihova stabilnost u nešto dužem vremenskom periodu, dodatno su sprovedena i određena reološka merenja. Izvršena je

procena viskoziteta odabranih „placebo” uzoraka FF formulacija (F1, F2, F4, F5 i F6, čiji je sastav prikazan u tabeli 4.1.3.), i u odnosu na analogne formulacije sa 0,064 % betametazondipropionata.

Vrednost viskoziteta za F1A, F2A i F5A formulacije se očekivano nije značajno menjala u čitavom rasponu brzina smicanja, što ukazuje na Njutnovski tip tečenja. Sa druge strane, kod F6A formulacije, sa porastom brzine smicanja, dolazi do smanjenja viskoziteta, što odgovara pseudoplastičnom tipu tečenja. (slika 4.3.1.4.d.). Ovaj nalaz nije iznenađujući, s obzirom da je u sastavu ove formulacije prisutan hidrofilni polimer HPC u koncentraciji od 1%, kao jedno od, između ostalog, vrlo često korišćenih sredstava za povećanje viskoziteta u topikalnim formulacijama.

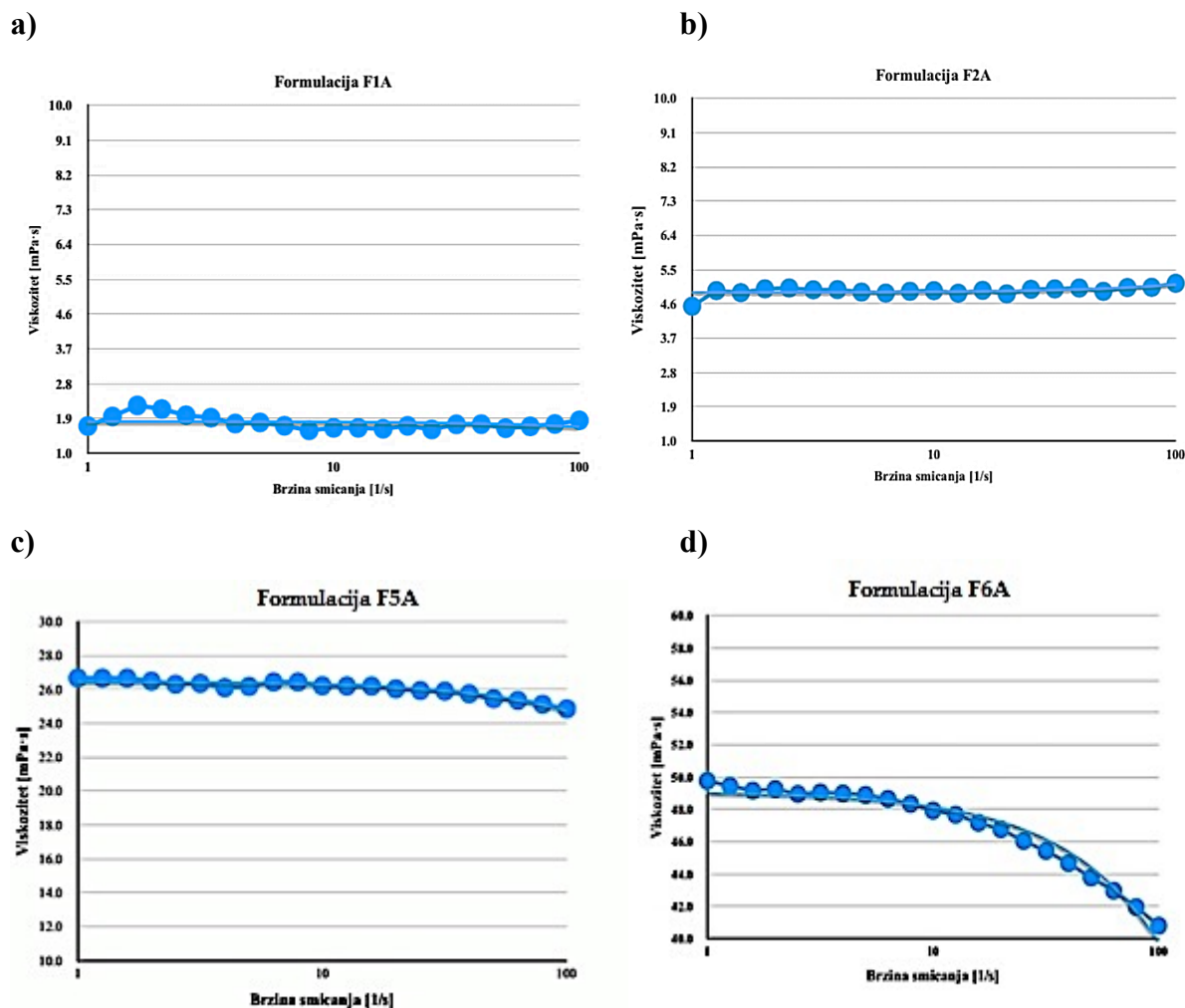
Poznato je da disperzije polimera iz Klucel® linije često karakteriše pseudoplastični tip proticanja, tj. da pod uslovima visokih brzina smicanja pokazuju samo prolazno smanjenje viskoziteta, dok se po prestanku sile, vrednost vraća na inicijalnu. Što je niža molekulska težina HPC i niža brzina smicanja, to će biti ispoljeno i manje smanjenje viskoziteta pod uticajem sile smicanja ([https://www.ashland.com/file\\_source/Ashland/Product/Documents/Pharmaceutical/PC\\_11229\\_Klucel\\_HPC.pdf](https://www.ashland.com/file_source/Ashland/Product/Documents/Pharmaceutical/PC_11229_Klucel_HPC.pdf)). Prema pojedinim specifikacijama HPC, viskozitet 10% vodene disperzije meren na 25 °C se kreće u rasponu od 250-800 cP. Takođe, poznato je da je vrednost viskoziteta kod HPC obrnuto srazmerna povećanju temperature (<https://www.sigmaaldrich.com/NL/en/product/aldrich/435007>). Stoga, kada je u pitanju FFS koji u sastavu sadrži HPC, na nižim temperaturama određivanja viskoziteta (ovde je merenje izvođeno na 20 °C) i vrednosti izmerenog viskoziteta biće očekivano veće u odnosu na deklarisanu vrednost na 25 °C. Takođe, uočene su određene razlike u vrednostima viskoziteta između optimizovanih FF formulacija sa i bez betametazondipropionata (tabela 4.3.2.). Vrednosti viskoziteta su se kretale u širokom rasponu vrednosti od 1,7 – 1450,2 mPa·s, ukazujući time da sastav formulacije (specifično tip film-formirajućeg polimera i njegova koncentracija) direktno utiču na dobijene vrednosti. Samostalno prisustvo gore pomenutog polimera HPC (F4, odnosno F4A), čak i pri nižoj odabranoj koncentraciji (3,5%) rezultiralo je višestruko većim vrednostima viskoziteta (1230,8 i 1450,2 mPa·s) u odnosu na sve ostale ispitivane film-formirajuće formulacije. Dobijeni rezultati time ukazuju da samostalno prisustvo polimera HPC u film-formirajućim formulacijama nije adekvatno u preparatima koji će biti pakovani u ambalažu sa mehaničkim raspršivačem ili sa ventilom, pod pritiskom, tj. u sprejevima za kožu.

**Tabela 4.3.2.** Viskozitet optimalnih film-formirajućih formulacija sa i bez betametazondipropionata nakon izrade, nakon 3 meseca i nakon 6 meseci čuvanja na sobnoj temperaturi (25 ± 2 °C) (srednja vrednost ± SD, n = 3).

Uzorci	Viskozitet (mPa·s)		
	Inicijalni	Nakon 3 meseca	Nakon 6 meseci
<b>F1A</b>	1,67 ± 0,03	1,77 ± 0,20	1,74 ± 0,16
<b>F2A</b>	4,81 ± 0,23	4,95 ± 0,04	5,02 ± 0,14
<b>F4A*</b>	1230,80 ± 567,00	1234,10 ± 588,60	1206,83 ± 573,13
<b>F5A</b>	26,10 ± 0,62	25,16 ± 0,63	24,54 ± 0,62
<b>F6A</b>	47,17 ± 3,06	49,07 ± 3,49	47,32 ± 3,16
<b>F1</b>	4,75 ± 0,03	4,66 ± 0,26	4,70 ± 0,03
<b>F2</b>	5,56 ± 0,25	5,76 ± 0,16	5,75 ± 0,12
<b>F4*</b>	1450,19 ± 702,10	1503,35 ± 764,93	1755,83 ± 802,52
<b>F5</b>	18,88 ± 0,51	18,12 ± 0,25	18,05 ± 0,29
<b>F6</b>	36,80 ± 2,28	36,59 ± 1,85	36,80 ± 1,88

\*tokom reološke studije nakon 3 meseca čuvanja, primećena je sklonost ka pojavi agregata polimera.

Takođe, već u toku rane preformulacione studije, primećeno je da formulacije sa 4-5% m/m HPC kao osnovnog FF polimera nakon 3,5 meseci čuvanja na sobnoj temperaturi otežano ističu iz bočice (odnosno da je dostignut maksimalni gelirajući potencijal HPC), zbog čega su dotične formulacije bile isključene iz dalje studije. Zbog viših vrednosti viskoziteta u odnosu na ostale ispitivane formulacije, formulacija sa 3,5% HPC je takođe isključena iz daljih ispitivanja (formulacija F4A).



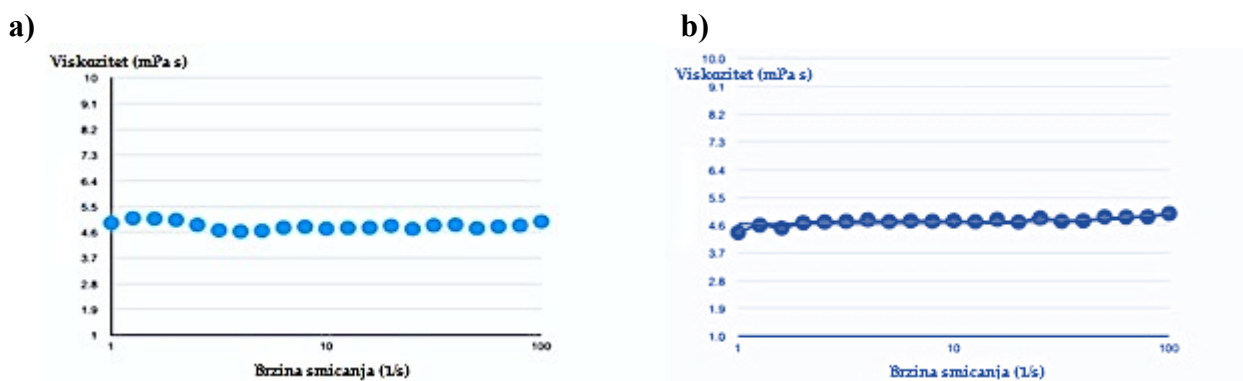
**Slika 4.3.1.4.** Prikaz inicijalnih reoloških profila (zavisnost viskoziteta od brzine smicanja) film-formirajućih formulacija sa inkorporiranim betametazondipropionatom: a) F1A; b) F2A; c) F5A; i d) F6A.

S druge strane, inicijalne vrednosti viskoziteta kod ostalih ispitivanih FFS su se kretale u rasponu od 1,7 – 47,2 mPa·s (tabela 4.3.2. i slika 4.3.1.4.), što ukazuje na mogućnost razvoja FFS tipa sprejova. Uprkos velikom udelu lako isparljivih rastvarača, nakon 3 meseca čuvanja vrednosti viskoziteta su bile gotovo nepromenjene, odnosno sa neznatno blagim porastom. Jedini izuzetak predstavlja uzorak F5, odnosno F5A (tabela 4.3.2; slika 4.3.1.6 pod e i g) kod kog je uočeno izvesno smanjenje vrednosti. Takođe, ni nakon 6 meseci nije bilo značajnih promena u vrednostima viskoziteta u poređenju sa inicijalnim vrednostima (tabela 4.3.2.; slika 4.3.1.4.; i slika 4.3.1.6. pod b, d, f i h).

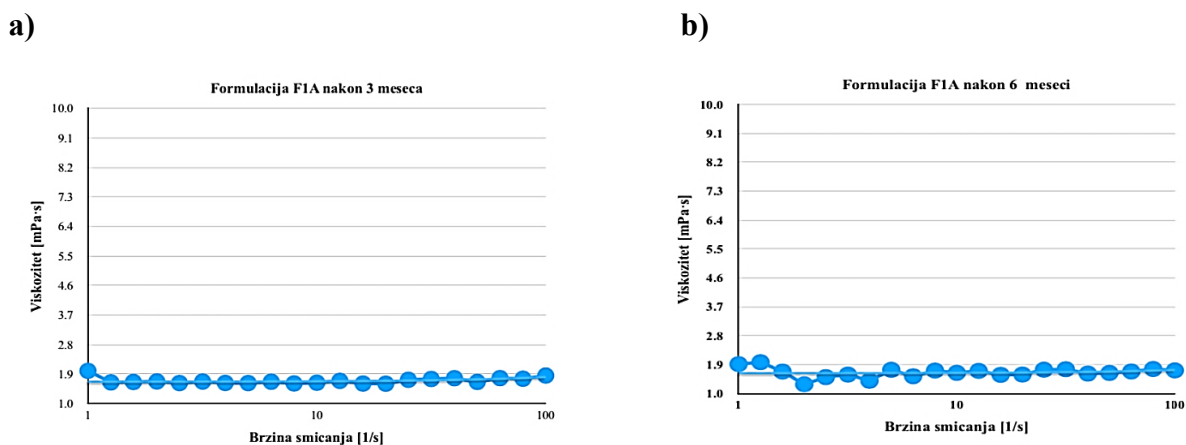
Dobijene vrednosti se mogu dovesti u korelaciju sa vrednostima difuzione površine filmova određenih tokom inicijalnih fizičko-mehaničkih ispitivanja (tabele 4.1.4 i 4.3.1), pri čemu je najmanju površinu filma (najmanje lateralno širenje na koži) ispoljila formulacija sa 3,5 % HPC (odnosno formulacija sa najvećim viskozitetom), dok su najveću difuzionu površinu ispoljile formulacije F1 i F1A sa 8,5 % RS (formulacije koje odlikuje najmanji viskozitet).

Zanimljivo je da su dobijene vrednosti viskoziteta u potpunosti u skladu sa *in vivo* testom supstantivnosti, pri čemu je stepen zadržavanja na koži bio sledećeg redosleda: F6 > F5 > F1 (vrednosti viskoziteta F6 = 36,8 mPa·s; F5 = 18,9 mPa·s; F1 = 4,8 mPa·s).

Stoga, može se reći da su dobijeni rezultati ukazali na povezanost reoloških svojstava topikalnih FF formulacija i očekivane bioadhezivnosti, te na ukupno vreme zadržavanja formulacija na koži.

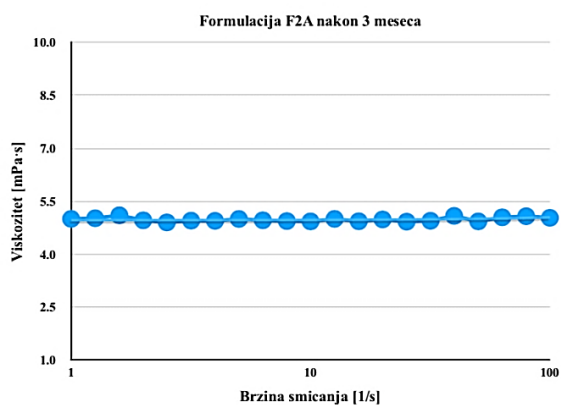


**Slika 4.3.1.5.** Uporedni prikaz zavisnosti viskoziteta od promene brzine smicanja za formulaciju F1 (bez prisustva betametazondipropionata): a) inicijalno, 7 dana od izrade; i b) nakon 3 meseca čuvanja na sobnoj temperaturi.

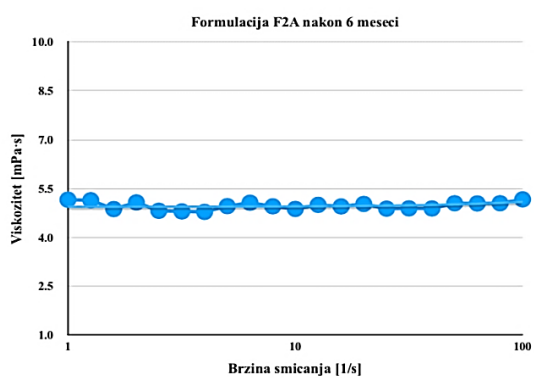


**Slika 4.3.1.6.** (nastavak na sledećoj strani)

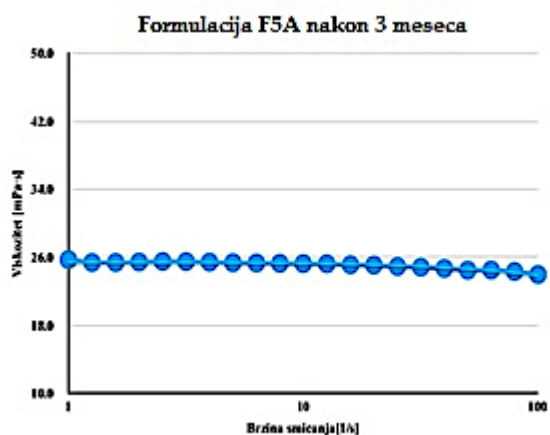
c)



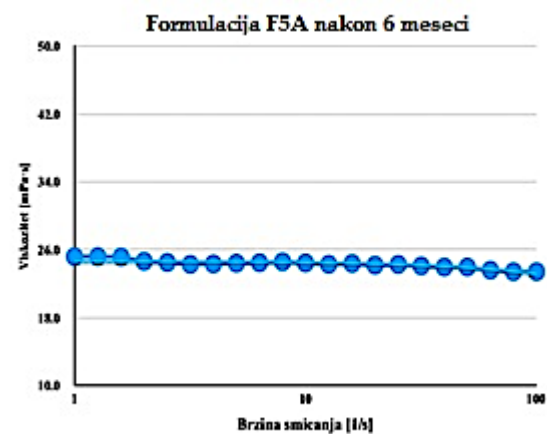
d)



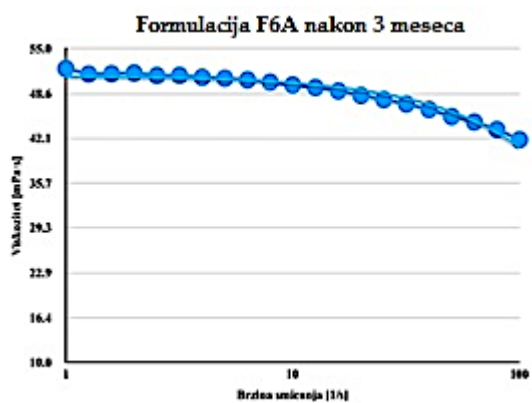
e)



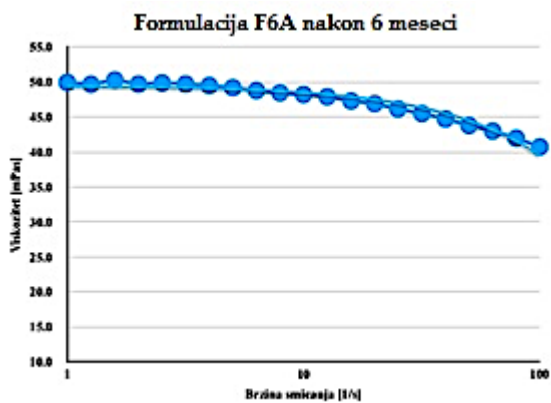
f)



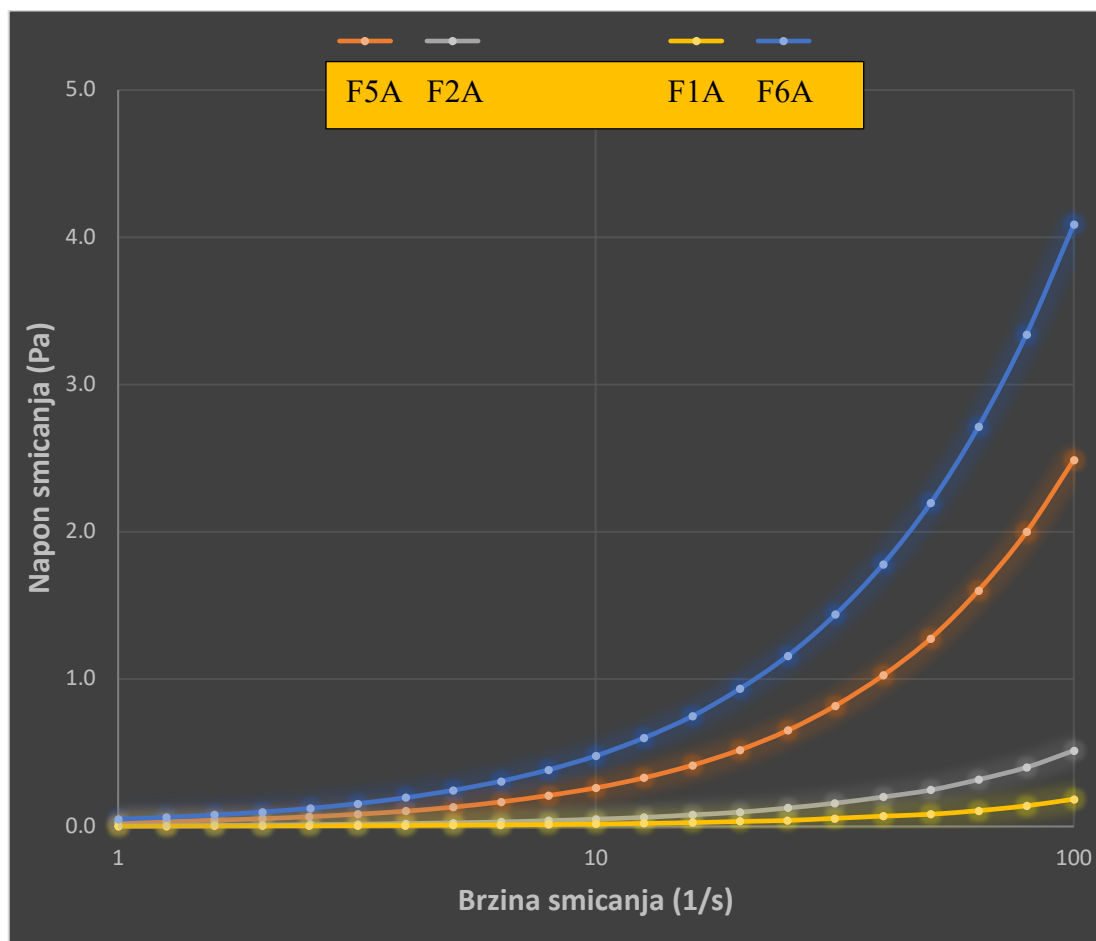
g)



h)



**Slika 4.3.1.6.** Preliminaran uvid u stabilnost FFS uzoraka posmatrano kroz prizmu promene viskoziteta nakon 3 vs. 6 meseci čuvanja na sobnoj temperaturi. Reološki profili uzoraka: a) F1A nakon 3 meseca; b) F1A nakon 6 meseci; c) F2A nakon 3 meseca; d) F2A nakon 6 meseci; e) F5A nakon 3 meseca; f) F5A nakon 6 meseci; g) F6A nakon 3 meseca; i) h) F6A nakon 6 meseci.

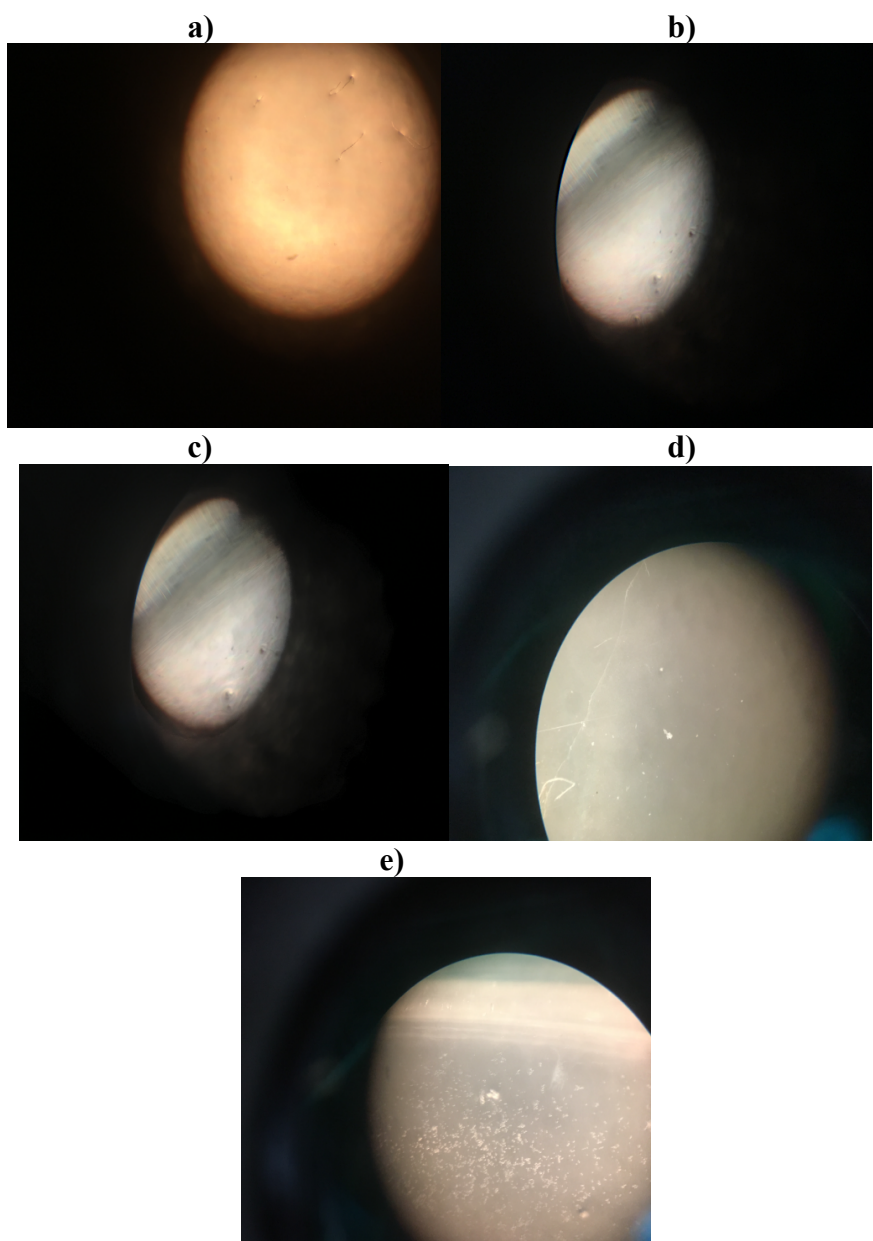


**Slika 4.3.1.7.** Krive proticanja izražene kao zavisnost napona smicanja od brzine smicanja za uzorke sa betametazondipropionatom (F1A, F2A, F5A, F6A), 7 dana nakon izrade.

Na slici 4.3.1.7. primetno je da kod uzorka F6A sa porastom brzine smicanja raste i otpor proticanju ovakvog sistema koji pokazuje i najveću vrednost viskoziteta u odnosu na ostale prikazane film-formirajuće sisteme (F1A, F2A, F5A). Ovo se takođe može objasniti prisustvom HPC kao hidrofilnog polimera koji pri definisanoj koncentraciji od 1 % bubrenjem započinje formiranje gelske mreže, te je i očekivano da ovako obrazovana struktura u odnosu na ostale FFS, pri većim brzinama smicanja pruži veći otpor proticanju.



Ispitivanjem formiranih *in situ* filmova metodom optičke mikroskopije, nakon 24 h od sušenja filma dobijena je potvrda formulacionih faktora koji idu u prilog saturaciji betametazondipropionata bez vidljive precipitacije (slika 4.3.1.8. pod a, b i c). Važno je istaći da ni kod jednog ispitivanog uzorka (F1A-F6A) nije došlo do značajne precipitacije lekovite supstance u osušenom filmu. Ipak, kod uzoraka F1A i F2A mogli su se uočiti sporadični pojedinačni kristali betametazondipropionata (ukupno 2-3 kristala).



**Slika. 4.3.1.8.** Prikaz filmova (a, b i c) bez pojave kristala; (d) sa pojedinačnim kristalima model lekovite supstance; e) sa izraženom kristalizacijom lekovite supstance kao posledica neadekvatnog postupka izrade (preformulaciona faza, uzorak F2A kao primer).

Na slici 4.3.1.8. pod e) prikazano je kako različita metoda izrade može dovesti do kristalizacije lekovite supstance, čime je potvrđeno da je postupak izrade FFS (a kasnije proces proizvodnje), uključujući pre svega način inkorporiranja aktivne supstance, značajan kritični

procesni parametar. Stabilnost istih formulacija praćenjem pH vrednosti i organoleptičkog izgleda prikazana je u nastavku.

Osim viskoziteta, na stabilnost datih formulacija ukazalo je i praćenje pH vrednosti i organoleptičkog izgleda ispitivanih uzoraka (tabele 4.3.3. i 4.3.4.).

**Tabela 4.3.3.** pH vrednosti odabranih FF formulacija sa betametazondipropionatom u funkciji procene stabilnosti (srednja vrednost  $\pm$  SD,  $n=3$ ).

pH vrednost uzorka	Nakon izrade	Nakon 3 meseca	Nakon 6 meseci	Nakon godinu dana
F1A	7,10 $\pm$ 0,07	6,80 $\pm$ 0,23	6,60 $\pm$ 0,10	6,40 $\pm$ 0,10
F2A	6,30 $\pm$ 0,06	6,20 $\pm$ 0,06	6,20 $\pm$ 0,10	6,20 $\pm$ 0,07
F3A	6,90 $\pm$ 0,06	6,70 $\pm$ 0,06	6,70 $\pm$ 0,07	6,80 $\pm$ 0,14
F5A	7,70 $\pm$ 0,06	7,50 $\pm$ 0,06	7,30 $\pm$ 0,06	6,90 $\pm$ 0,10
F6A	7,00 $\pm$ 0,23	6,80 $\pm$ 0,06	6,70 $\pm$ 0,10	6,60 $\pm$ 0,06

**Tabela 4.3.4.** Praćenje organoleptičkih karakteristika odabranih FF formulacija sa betametazondipropionatom tokom 12 meseci čuvanja na sobnoj temperaturi.

Formulacija	Organoleptički izgled uzoraka nakon čuvanja 3, 6, 12 meseci na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svetlosti
F1A	Rastvor je bistar, bezbojan, homogen, bez vidljivih promena
F2A	Rastvor je bistar, bezbojan, homogen, bez vidljivih promena
F3A	Rastvor je bistar, bezbojan, homogen bez vidljivih promena
F5A	Rastvor je bistar, bezbojan, homogen, bez vidljivih promena
F6A	Rastvor je blago opalescentan, homogen, bez vidljivih promena

Stabilnost pH vrednosti kod svih uzoraka je potvrđena u dužem vremenskom periodu nakon čuvanja uzoraka na sobnoj temperaturi od godinu dana. Kao što se uočava, promena pH vrednosti tokom čuvanja svih prikazanih uzoraka je bila u blagom padu i kretala se unutar 0,2 pH jedinice nakon 3 meseca i unutar 0,5 pH jedinica nakon 6 meseci čuvanja. Nakon godinu dana čuvanja kod uzoraka nije došlo do značajnih promena pH vrednosti, pri čemu su uzorci F2A, F3A i F6A u odnosu na inicijalno izmerene pH vrednosti nakon godinu dana čuvanja pokazali samo neznatnu promenu pH vrednosti koja se kretala u rasponu unutar 0,1 do 0,4 pH jedinica. Uzorci F1A i F5A su nakon godinu dana čuvanja pokazali promenu pH koja se kretala unutar 0,8 pH jedinica, što je takođe bilo prihvatljivo (tabela 4.3.3).

U pogledu organoleptičkih karakteristika ni nakon godinu dana čuvanja nije došlo do vidljivih promena uzoraka u odnosu na inicijalno pripremljene što ukazuje na preliminarnu stabilnost uzoraka (tabela 4.3.4).

Takođe, dodatna potvrda preliminarne stabilnosti dobijena je kroz sprovedenu termalnu analizu. Naime, na osnovu DSC termograma odabranih uzoraka (F1A, F5A i F6A) nakon dva meseca čuvanja na sobnoj temperaturi nije registrovan pik koji bi odgovarao temperaturi topljenja betametazondipropionata, što je potvrdilo odsustvo kristalizacije date lekovite supstance i stabilnost BD u odabranim sistemima (odeljak 4.3.3.).



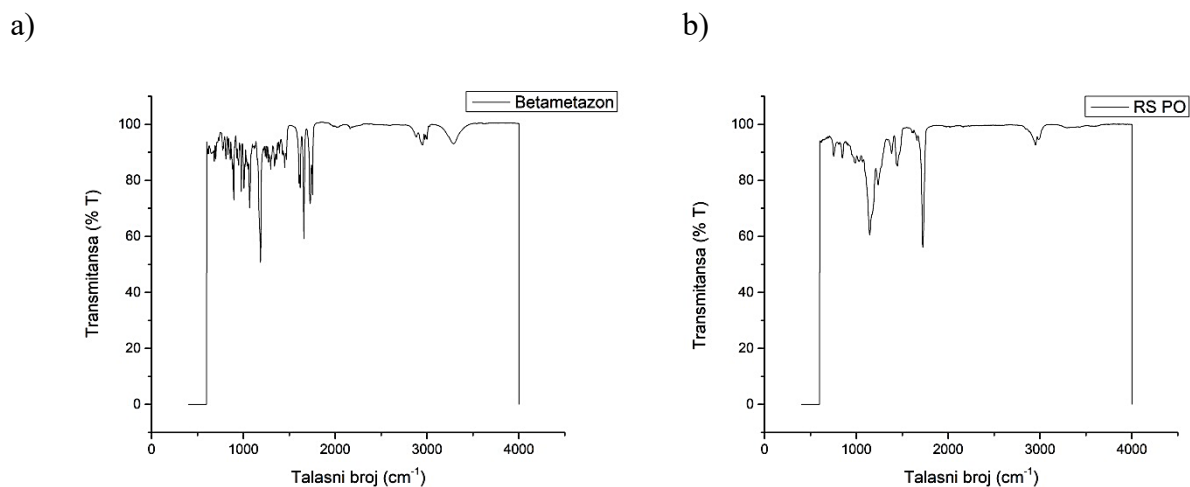
#### 4.3.2. FT-IR spektroskopija - uvid u eventualne interakcije između betametazondipropionata i ostalih sastojaka film-formirajućih sistema

Razumevanje interakcija koje se na molekularnom nivou dešavaju između lekovite supstance i film-formirajućeg polimera je presudna da bi se objasnio mehanizam oslobađanja lekovite supstance i njena stabilnost u obrazovanom filmu. Generalno, ako se na odgovarajući način iskoriste, ove interakcije mogu da održe lekovitu supstancu u amorfnom obliku tokom procesa rastvaranja (tj. izrade/proizvodnje film-formirajućeg sistema), evaporacije isparljive frakcije formulacije (obrazovanja filma na koži), kao i tokom čuvanja prospektivnog proizvoda (Al-Obaidi i sar., 2013; Al-Obaidi i Buckton, 2009, Tran i Tran, 2020). Slabe fizičke veze (formirane nekovalentnim interakcijama) poput vodoničnih veza, jonskih veza, van der Walsovih, dipol-dipol interakcija i kiselo-baznih interakcija su uobičajene interakcije koje se dešavaju između komponenata u ovakvim sistemima (Krstić i sar., 2020).

Kada je slabo rastvorljiva lekovita supstanca dispergovana sa polimerom, između njih dolazi do uspostavljanja veza koje se mogu iskoristiti za modulaciju kinetike kristalizacije lekovite supstance, te i njenog oslobađanja iz datog nosača. Posebno se vodonično vezivanje pokazalo kao važan faktor u poboljšanju aspekta stabilnosti lekovite supstance. Prema tome, kako interakcija između lekovite supstance i polimera utiče na rastvorljivost, brzinu rastvaranja i/ili fizičko stanje lekovite supstance u FFS, odnosno u obrazovanom filmu, od izuzetne je važnosti u ispitivanje uključiti odgovarajuće metode karakterizacije.

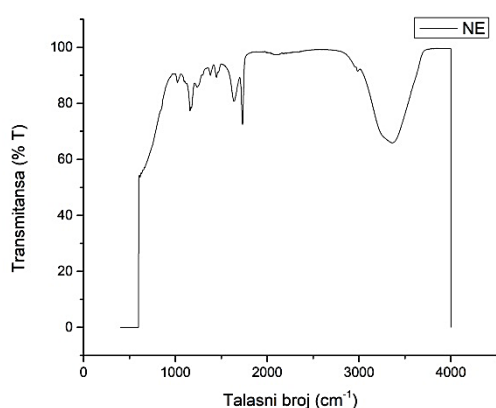
FT-IR spektroskopija se pokazala kao metoda od posebne važnosti da bi se utvrdila kompatibilnost lekovite supstance sa ostalim ekscipijensima u sastavu FFS, ali prevashodno sa izabranim film-formirajućim polimerom/polimerima. Razumevanje interakcija koje se dešavaju u FFS na molekularnom nivou je značajno za objašnjenje procesa transformacije do filma, mehanizma oslobađanja lekovite supstance, ali i njene stabilnosti unutar ovakvih nosača (Tran i Tran, 2020).

Tokom razvoja formulacije, važno je praćenje potencijalnih molekulskih interakcija, ali i sa aspekta potvrde termodinamičke aktivnosti lekovite supstance unutar dinamičnih sistema kao što su FFS, kao i radi praćenja same fizičke stabilnosti nastalih polimernih matrica iz kojih će se vršiti isporuka lekovite supstance. Na slici 4.3.2.1. prikazani su FT-IR spektri ključnih sastojaka ispitivanih formulacija.

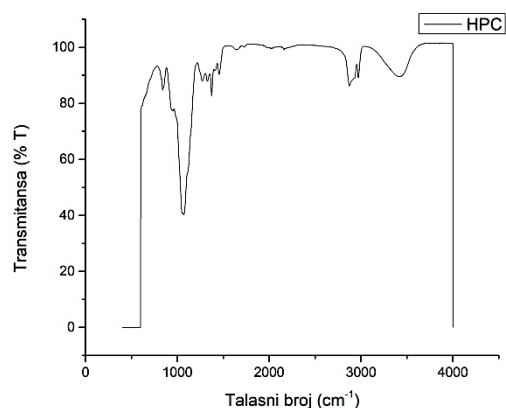


Slika 4.3.2.1. (nastavak na sledećoj strani)

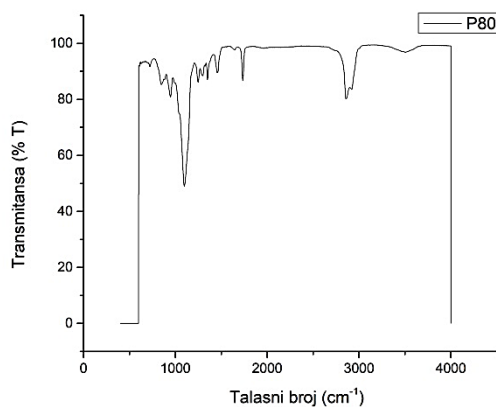
c)



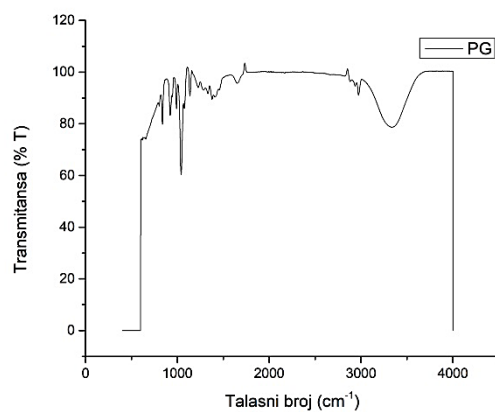
d)



e)



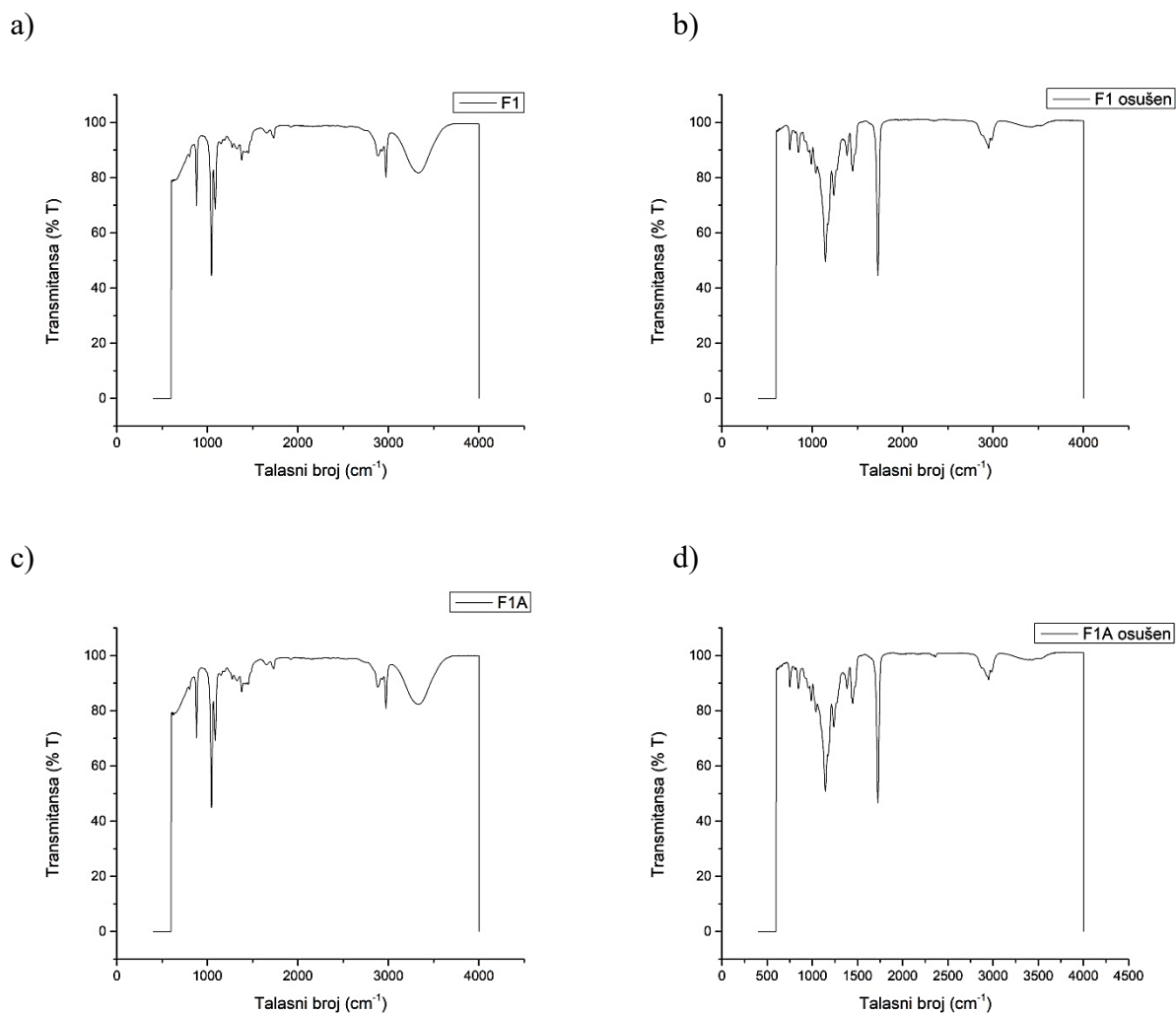
f)



**Slika 4.3.2.1.** FT-IR spektri ključnih sastojaka ispitivanih film-formirajućih sistema: a) betametazondipropionat, b) polimer Eudragit<sup>®</sup> RS PO, c) polimer Eudragit<sup>®</sup> NE 30 D, d) polimer Klucel<sup>®</sup> GF, e) polisorbat 80 i f) propilenglikol.

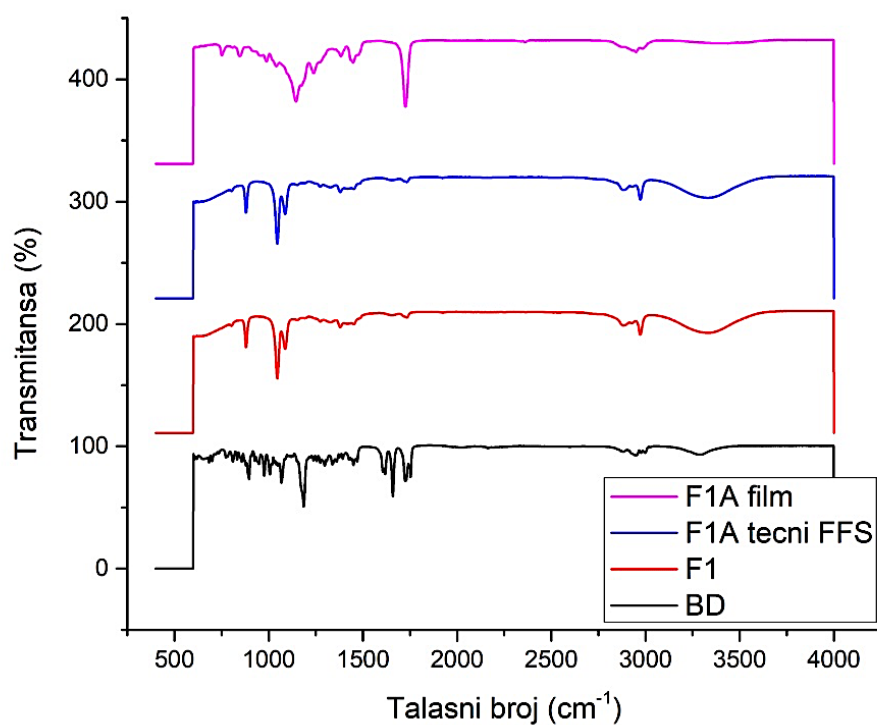
Kod svih ispitivanih formulacija promene su praćene na 4 nivoa i to kod: *i*) FFS sa prisutnom lekovitom supstancom; *ii*) analognih FFS bez prisustva lekovite supstance; odnosno *iii*) FFS u tečnom stanju; i *iv*) nakon formiranja filмова.

Snimljeni spektri su prikazani na slikama 4.3.2.2.-4.3.2.7. i grupisani tako da pruže komparativni prikaz spektara koji odražavaju promene tokom procesa dinamičke transformacije kod 3 odabrana sistema: označeni kao F1A, F5A i F6A vs. F1, F5 i F6, od tečnosti do suvog filma. Kao što je prethodno sugerisano od strane García-Couce i sar. (2021), za lekovitu supstancu BD, praćenje je usmereno na račvaste signale koji odgovaraju vibracijama C=O istezanja, što predstavlja doprinos karbonilne grupe lanca i ketonske grupe prvog prstena u karakterističnoj strukturi kortizola na 1727 i 1659  $\text{cm}^{-1}$ , respektivno. Dodatno, datoj grupaciji signala doprinose i asimetrične vibracije -C-O veza. Nešto slabiji signali pozicionirani od 976 do 607  $\text{cm}^{-1}$  koji pripadaju C-C vibracijama i P-O istezanju nisu uzeti u obzir, jer su u značajnoj meri maskirani signalima koji potiču od drugih sastojaka, odnosno ekscipijenasa prisutnih u ispitivanim uzorcima.

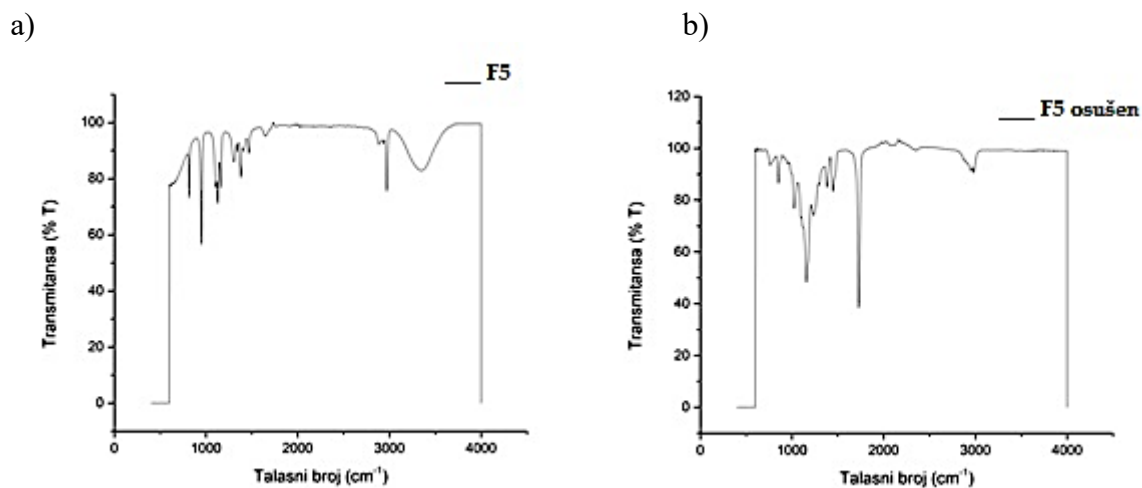


**Slika 4.3.2.2.** Komparativni prikaz snimljenih FT-IR spektara a) uzorka F1 u tečnom stanju, b) nakon sušenja filma bez prisustva lekovite supstance (F1), c) uzorka F1A u tečnom stanju, d) nakon sušenja filma sa inkorporiranom lekovitom supstancom (F1A).

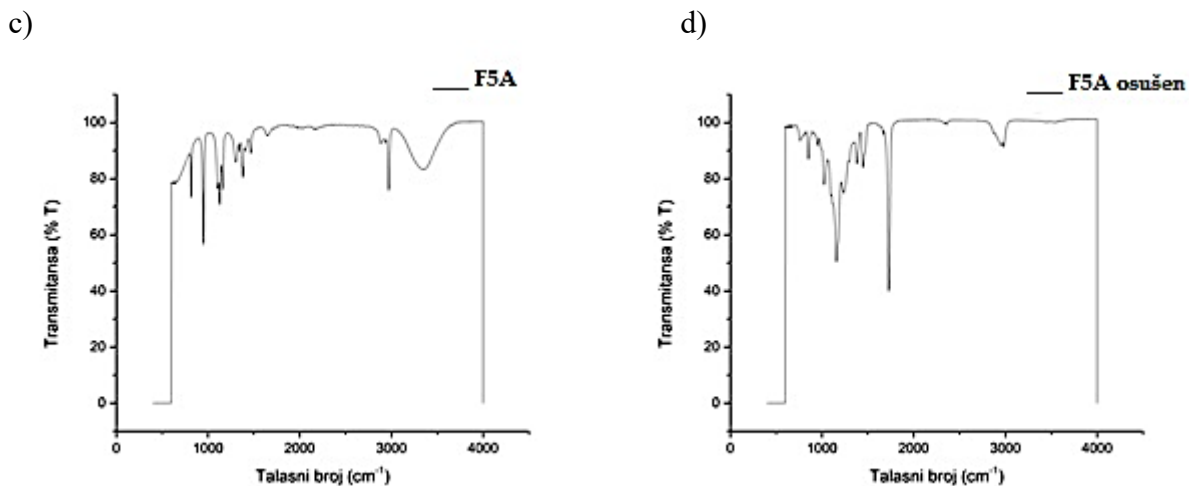
Kao što se vidi na prikazanim spektrima svih aktivnih uzoraka (F1A, F5A i F6A) zadržani su gore pomenuti signali od interesa za betametazondipropionat kao model lekovitu supstancu. Ipak, signal betametazondipropionata inicijalno smešten na  $1727\text{ cm}^{-1}$  je integrisan sa signalima nekoliko sastojaka (uglavnom, Eudragit® RS PO na  $1723\text{ cm}^{-1}$ , Eudragit® NE 30 D na  $1731\text{ cm}^{-1}$  i polisorbata 80 na  $1734\text{ cm}^{-1}$  u intenzivniji i širi pik koji se kreće u opsegu od  $1725$  to  $1728\text{ cm}^{-1}$ , u zavisnosti od samog aktivnog uzorka. Ovo je razumljivo iz razloga što aktivna supstanca BD poseduje brojne položaje sposobne za vodonično vezivanje. Na taj način, određene interakcije između BD i OH grupa prisutnih u strukturi korišćenih film-formirajućih polimera su neizbežne, što samim tim dovodi do pomeranja signala ka većim talasnim brojevima (Hifumi i sar., 2016). Ova otkrića su od posebne važnosti za karakterizaciju uzorka *in-situ*, ukazujući time da kod odabranog uzorka u procesu transformacije od tečnog stanja do suvog filma ne dolazi do precipitacije lekovite supstance, već se odigrava isključivo homogena, fizička imobilizacija lekovite supstance unutar obrazovanog filma (Edwards i sar., 2017).



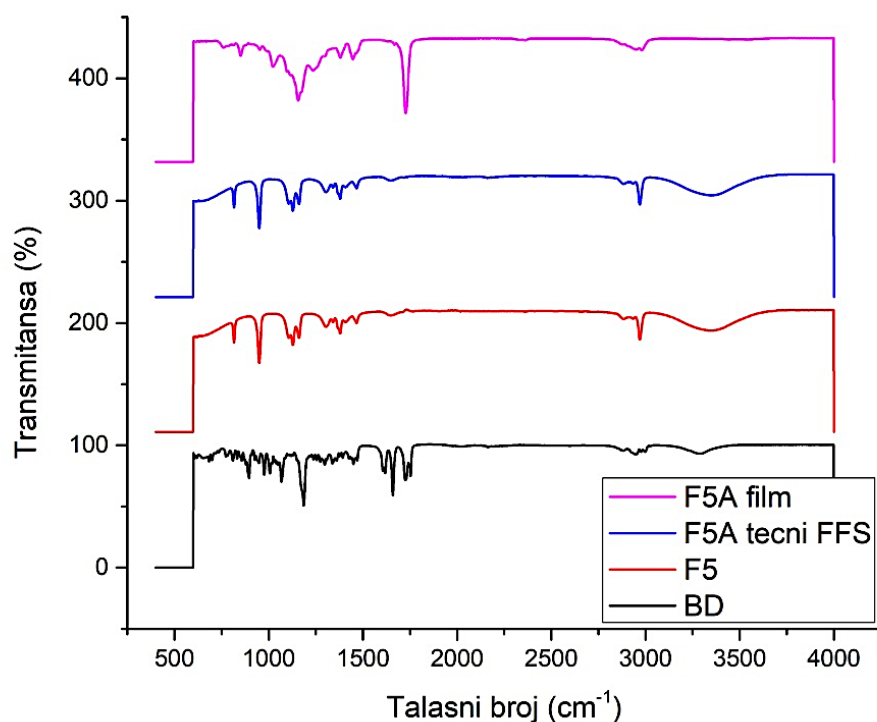
**Slika 4.3.2.3.** Uporedni prikaz snimljenih FT-IR spektara tokom tranzicionog prelaza iz tečnog stanja do suvog filma uzorka F1A i analognog „placebo” uzorka.



**Slika 4.3.2.4.** (nastavak na sledećoj strani)

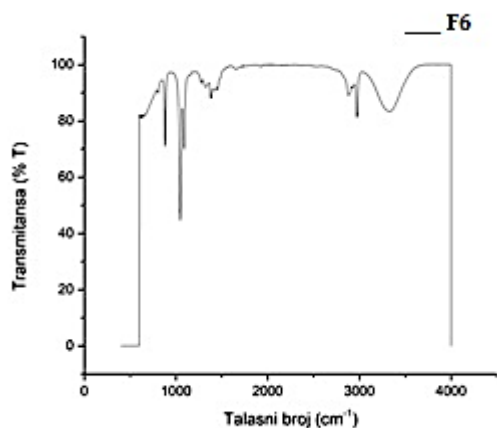


**Slika 4.3.2.4.** Komparativni prikaz snimljenih FT-IR spektara a) uzorka F5 u tečnom stanju, b) nakon sušenja filma bez prisustva lekovite supstance (F5), c) uzorka F5A u tečnom stanju, d) nakon sušenja filma sa inkorporiranom lekovitom supstancom (F5A).

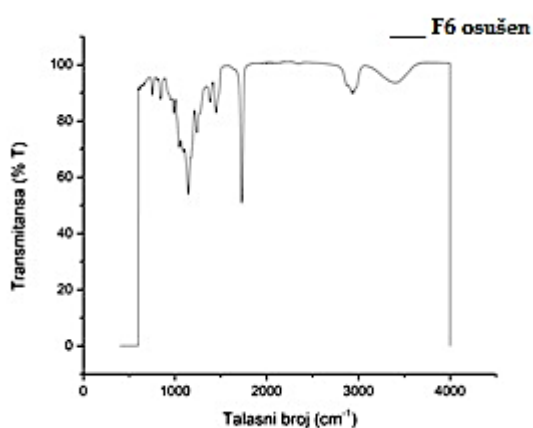


**Slika 4.3.2.5.** Uporedni prikaz snimljenih FT-IR spektara tokom tranzicionog prelaza iz tečnog stanja do suvog filma uzorka F5A i analognog „placebo” uzorka.

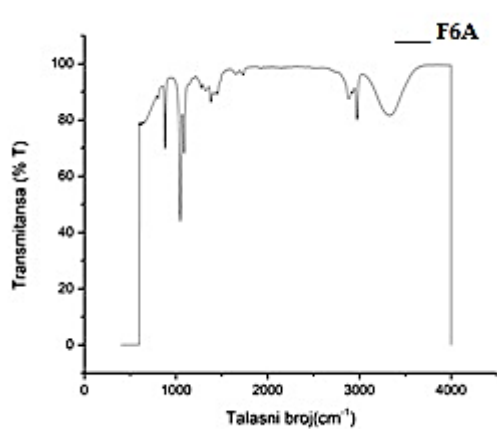
a)



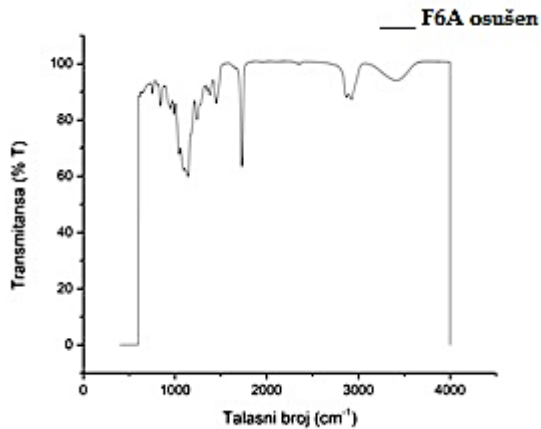
b)



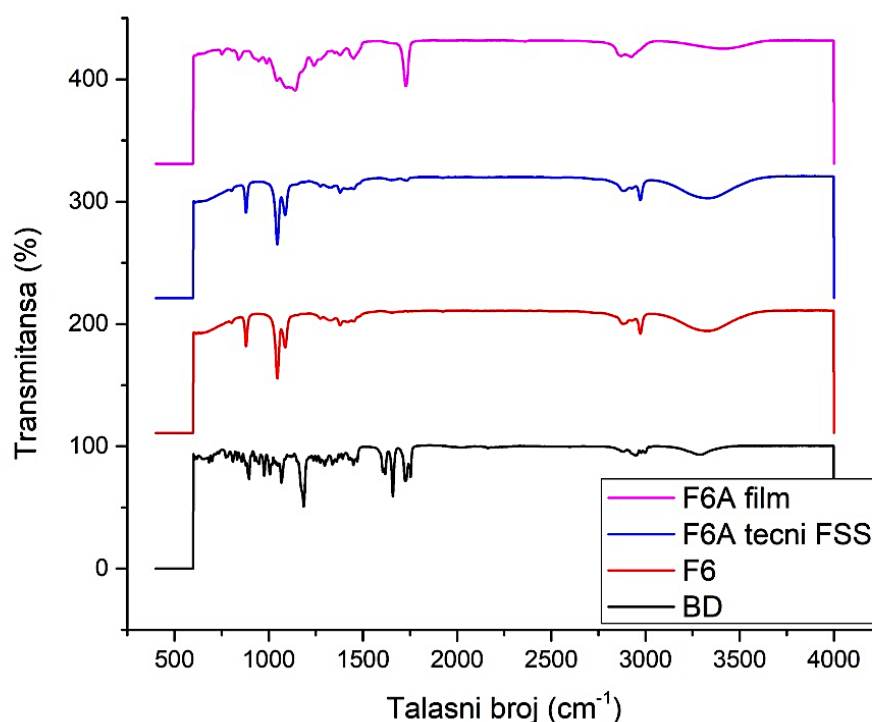
c)



d)



**Slika 4.3.2.6.** Komparativni prikaz snimljenih FT-IR spektara a) uzorka F6 u tečnom stanju, b) nakon sušenja filma bez prisustva lekovite supstance (F6), c) uzorka F6A u tečnom stanju, d) nakon sušenja filma sa inkorporiranom lekovitom supstancom (F6A).

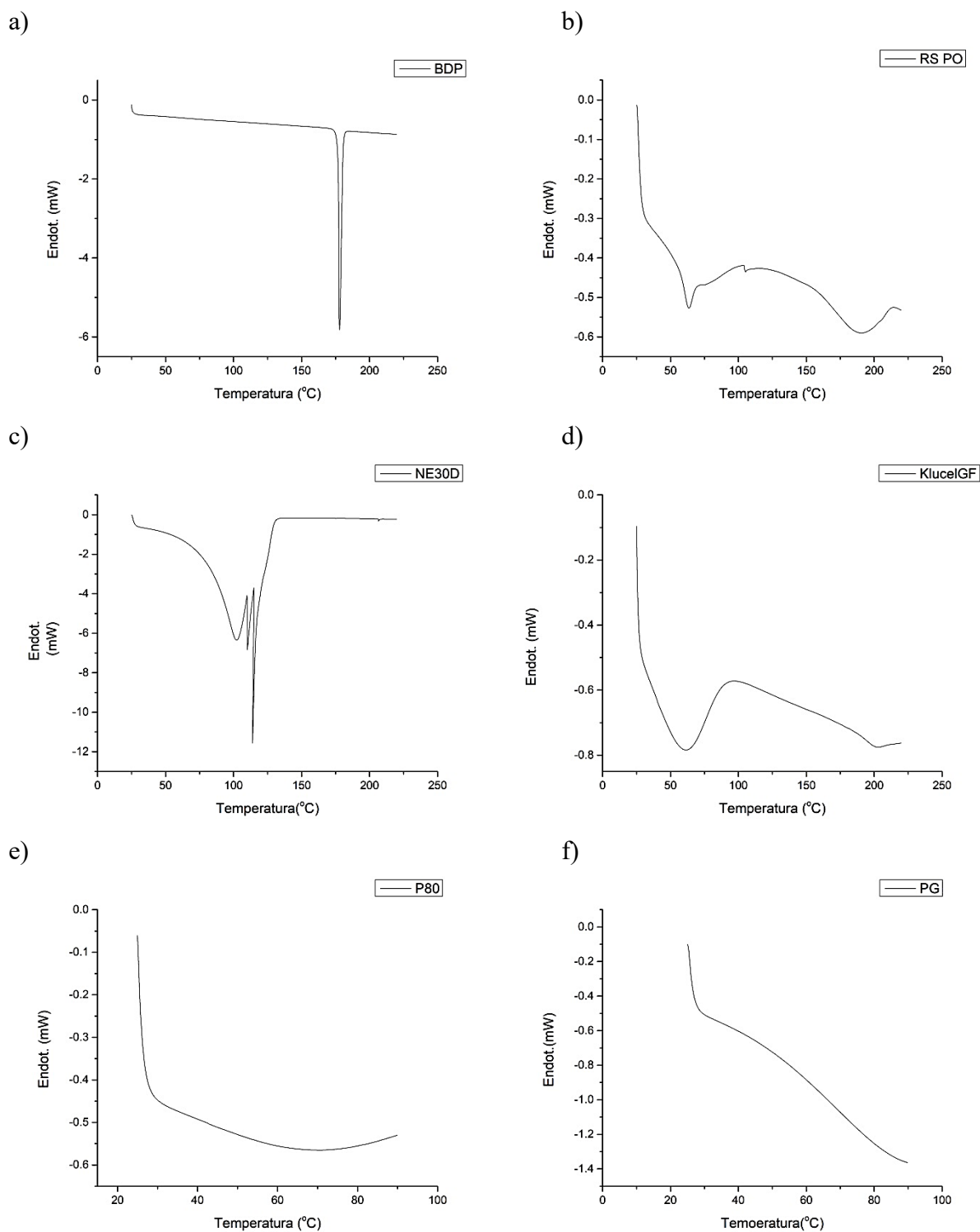


**Slika 4.3.2.7.** Uporedni prikaz snimljenih FT-IR spektara tokom tranzicionog prelaza iz tečnog stanja do suvog filma uzorka F6A i analognog „placebo” uzorka.

Može se zaključiti, a kao što je navedeno i od strane pojedinih autora (Zayed i sar., 2020), da u ispitivanim uzorcima FFS dolazi dominantno do fizičkih interakcija između lekovite supstance i prisutnih ekscipijenasa, održavajući time stabilnost uzoraka sa betametazondipropionatom, koja se reflektuje u svim snimljenim signalima.

### 4.3.3. DSC analiza

Diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom ispitivane su strukturne promene materijala (model lekovite supstance i primenjenih ekscipijenasa) koje su praćene toplotnim promenama, tj. preuzimanjem toplote tokom topljenja ili emisijom toplote koja se dešava tokom eventualne kristalizacije. Termalne metode su važne za analizu i praćenje potencijalnih interakcija koje se dešavaju unutar FF sistema sa inkorporiranom lekovitom supstancom, ali isto tako i za praćenje fizičke stabilnosti ovih sistema. Analogno protokolu primenjenom tokom FT-IR analize, promene su praćene na 4 nivoa kod: *i*) FFS sa inkorporiranim BD; *ii*) analognih FFS bez prisustva BD; *iii*) uzoraka u tečnom stanju; i *iv*) nakon kompletnog formiranja filma.



**Slika 4.3.3.1.** DSC termogrami ključnih sastojaka ispitivanih FFS: a) model lekovita supstanca betametazondipropionat, b) polimer Eudragit<sup>®</sup> RS PO, c) polimer Eudragit<sup>®</sup> NE 30 D, d) polimer Klucel<sup>®</sup> GF, e) polisorbat 80 i f) propilenglikol.

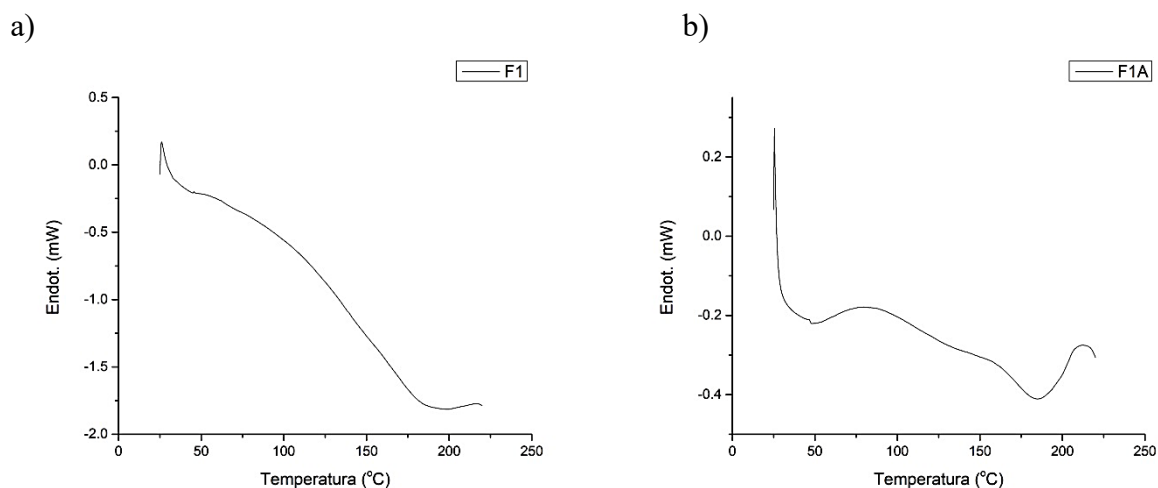
Čista model lekovita supstanca BD daje oštar i jasan pik na 178 °C (slika 4.3.3.1), okarakterisan promenom energije od -162,35 mJ (slika 4.3.3.1.a). Razumno je očekivati da i primenjeni film-formirajući polimeri takođe daju značajan doprinos registrovanim termalnim promenama. Naime, polimer Eudragit<sup>®</sup> RS PO karakterišu tri odvojena pika, iako su samo prvi



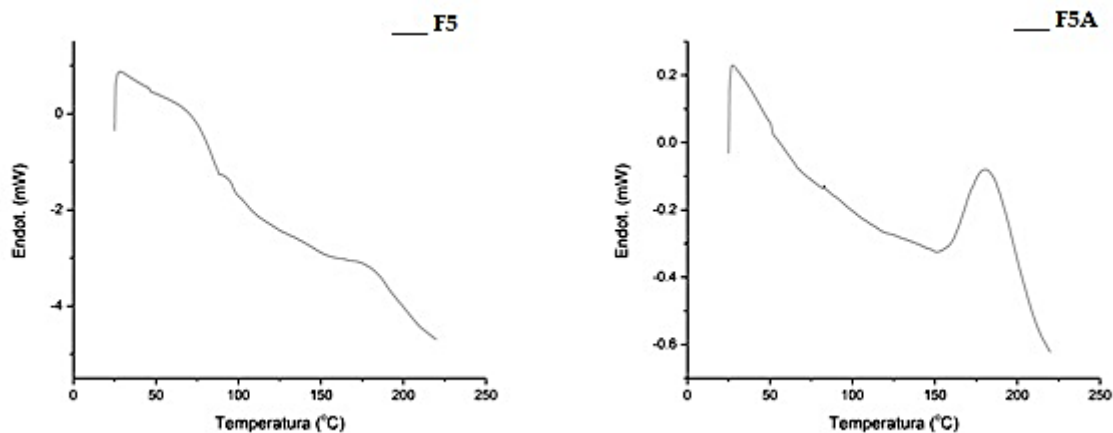
(energije -32,82 mJ na 63,24 °C) i treći (-119,42 mJ na 187,67 °C) prominentni (slika 4.3.3.1.b). Što se polimera Eudragit® NE 30 D tiče (slika 4.3.3.1.c), iako se u radovima obično predstavlja kao jedan, složeni endotermni prelaz, integracijom pika moguća je dalja diferencijacija na tri pika, što je od značaja jer je ipak u pitanju vodena disperzija hidrofobnog polimera. Stoga, razumno je pretpostaviti da prvi, širi pik potiče od same prisutne vode (-1199,83 mJ, 101,63 °C), dok drugi i treći oslikavaju sam polimer u različitim stanjima (parametri drugog pika su -193,65 mJ i 109,99 °C, a trećeg -637,47 mJ i 114,02 °C). Konačno, hidrofilni polimer HPC pokazuje dva endotermna prelaza (slika 4.3.3.1.d), prvi od -228,45 mJ na 59,59 °C, a drugi od -10,20 mJ na 201,20 °C. Slično primenjenim lako isparljivim rastvaračima, ni od polisorbata 80 ni propilenglikola ne treba očekivati značajan doprinos termalnom ponašanju ispitivanih FFS (slika 4.3.3.1.e i f).

U nastavku (slike 4.3.3.2.-4.3.3.4.) su prikazani termogrami osušenih filmova uzoraka sa i bez inkorporiranog BD. Kod uzoraka F1 i F1A uočljiva su 2 karakteristična pika koja potiču od samog polimera Eudragit® RS PO koji se nalazi u sastavu formulacija, naročito u slučaju filma koji potiče od aktivnog uzorka F1A.

Generalno, izostanak jasnog pika na oko 178 °C koji bi poticao od BD ukazuje da je lekovita supstanca rastvorena, odnosno homogeno dispergovana unutar generisanog polimernog matriksa, odnosno da je prisutna u svom molekularnom obliku. Ovo se može povezati i sa suptilnim promenama u entalpijama topljenja, kao što je i objašnjeno od strane Edwards i sar. (2017).

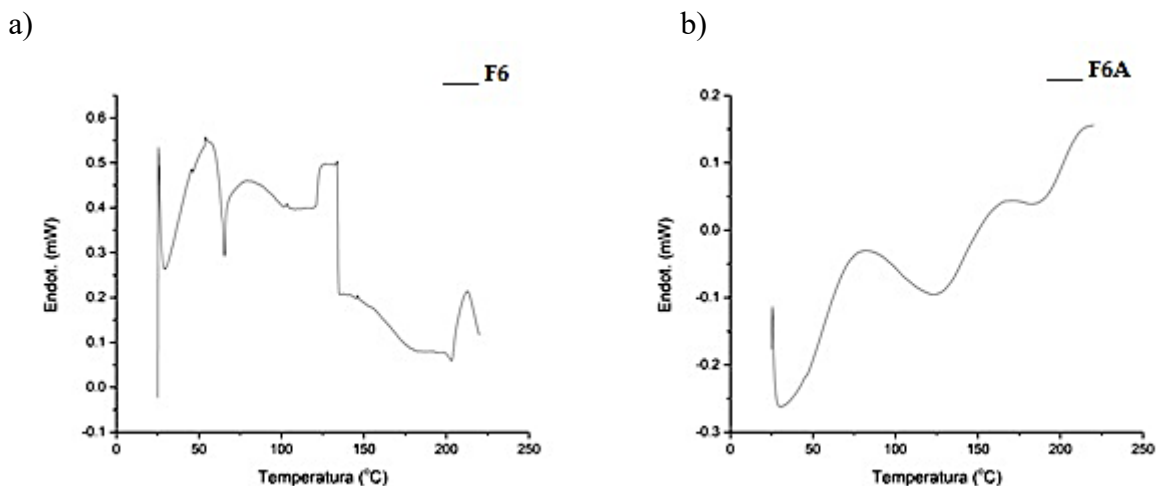


**Slika 4.3.3.2.** DSC termogrami filmova koji potiču od: a) uzorka F1 i b) uzorka F1A.

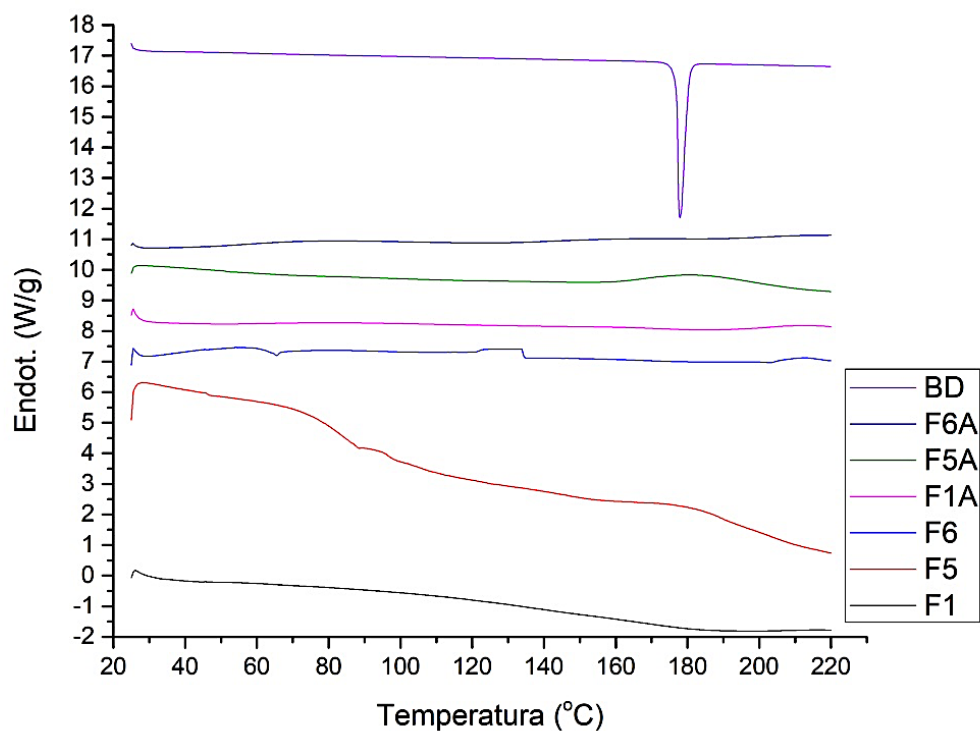


**Slika 4.3.3.3.** DSC termogrami filmova koji potiču od: a) uzorka F5 i b) uzorka F5A.

Interesantno je da kod oba filma posredovana isključivo hidrofobnim polimerima dolazi do postepenog smanjenja energije toplotnih prelaza od 25 ka 225 °C. Nasuprot tome, dodatak BD u FFS baziran na kombinaciji hidrofobnog RS i hidrofilnog polimera HPC dovodi do značajne promene termograma (slika 4.3.3.4.), verovatno usled kompleksne distribucije BD u hidrofilnim i hidrofobnim domenima obrazovanog filma.



Slika 4.3.3.4. DSC termogrami filmova koji potiču od: a) uzorka F6 i b) uzorka F6A.



Slika 4.3.3.5. Usporedni prikaz DSC analize čistog betametazondipropionata i ispitivanih film-formirajućih sistema.

Naravno, bilo je očekivano da su svi filmovi počinjali da se tope na nižim temperaturama u poređenju sa tačkama topljenja njihovih čistih sastojaka, što se delimično može pripisati i razlikama u specifičnim površinama filmova dostupnim tokom ovog ispitivanja (Hanna i sar., 2019), ali i prisustvu ostalih sastojaka formulacije npr. plastifikatora koji očekivano snižava temperaturu staklastog prelaza ( $T_g$ ) i omogućava formiranje filma.

U poređnom analizom svih termograma, uočava se drugačiji trend termalnog ponašanja kod uzorka F5A, koji se manifestuje širokim pikom sa završetkom približno na mestu endotermnog topljenja BD (slika 4.3.3.5), i može se tumačiti kao rezultat intenzivne termodinamičke aktivnosti unutar ovog sistema. Ovakvo zapažanje je, radi potpunijeg razumevanja, zahtevalo dodatno ispitivanje površinske morfologije nastalih filmova i to AFM tehnikom.

#### **4.3.4. Određivanje topografije filmova primenom mikroskopije atomskih sila**

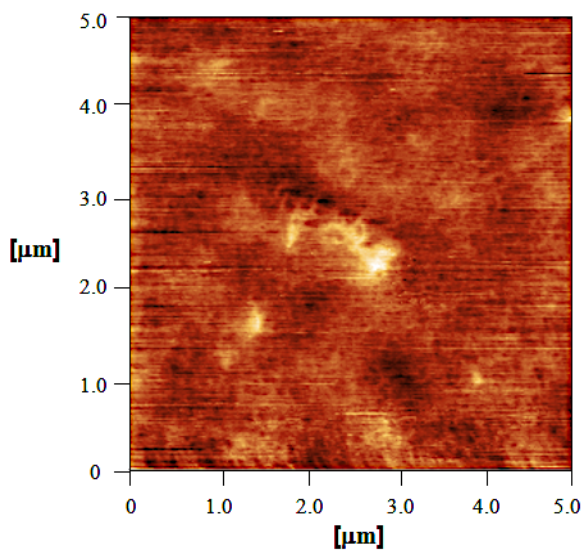
AFM je veoma efikasna i nedestruktivna tehnika koja omogućava vizuelizaciju trodimenzionalne morfologije površine materijala na mikroskopskom nivou. Princip je baziran na merenju sila interakcije između površinskih atoma uzorka i atoma vrha sonde koja sadrži laser (Fahier, 2016). AFM tehnika generiše slike nano razmera koje ukazuju na homogenost filma i njegovu hrapavost. Homogenost filma predstavlja ključnu karakteristiku koja se dovodi u vezu sa ostvarenim kontaktom između kože i FF sistema za isporuku lekovite supstance (Garvie-Cook i sar., 2015). Pored morfološke karakterizacije, ova tehnika omogućava i karakterizaciju konformacije pojedinačnih molekula (odnosno lanaca) polimera koji se koriste za kontrolisano oslobađanje lekovitih supstanci iz različitih sistema nosača poput, primera radi, nanočestica, tečnih kristala ili liposoma (Govedarica i sar., 2010). Izraz „hrapavost površine“ označava da površina ostvaruje kompleksni oblik izgrađen od serije pikova i korita (tzv. dolina ili inkluzija) različitih visina, dubina i intervala. Pod hrapavošću se podrazumeva stanje površine koje se manifestuje kada se neravne površine pojavljuju u kontinuiranom nizu u relativno kratkim ciklusima i u kraćim vremenskim intervalima nego dubina. Površinska hrapavost se definiše i kao kraća učestalost realnih površina u odnosu na registrovane inkluzije (udubljenja). Hrapavost površine pored teksturnih (razlika u izgledu da li je nešto glatko i sjajno, grubo ili mat) utiče i na taktilne razlike (<https://www.nanosurf.com/en/support/afm-modes-overview/topography-and-surface-roughness-measurements>), a one su od posebnog značaja za lekove koji se primenjuju na koži. Izgled i tekstura obezbeđuju dodatne vrednosti proizvoda u smislu zadovoljstva korisnika tj. pacijenta.

Mikroskopijom atomskih sila prikazane su 2D i 3D slike topografije filmova u nano i mikro opsegu. Odabrane su formulacije F1A, F5A i F6A, koje su se već izdvojile primenom prethodnih metoda karakterizacije. Dvodimenzionalna mikrografija filma prikazana na slici 4.3.4.1. (formiran od uzorka F1A) potvrđuje homogenost filma i ujednačenu distribuciju lekovite supstance unutar polimerne matrice sa uočljivom interpenetracijom polimernih lanaca koja se odigrava usled prisustva plastifikatora. Nasuprot tome, prikaz 2D mikrografije filma na slici 4.3.4.4. (formiran od formulacije F5A) ukazuje na potpuno drugačiju distribuciju BD, najverovatnije smeštenog unutar regiona koji se čine kao da uranjaju u samu strukturu dovodeći do obrazovanja inkluzija „nalik dolini“ i okruženih polimernim slojem, iz kojeg se lekovita supstanca oslobađa. Slična otkrića su izložena i od strane drugih autora koji su istraživali FFS na bazi Eudragit® linije polimera (Garvie-Cook i sar., 2015). Ovakva strukturna organizacija bi mogla da dovede do kontrolisane isporuke lekovitih supstanci, a kao rezultat obrazovanja dvostrukih rezervoara leka: unutar filma kao i unutar *stratum corneum*-a, što omogućava produženu i poboljšanu dermalnu isporuku (Pünnel i Lunter, 2021). Takođe, na mikrografiji filma koji potiče od F5A uočava se izvesna deformacija i koalescencija polimernih sfera koja je preduslov za formiranje filma iz vodene disperzije polimera Eudragit® NE 30 D.

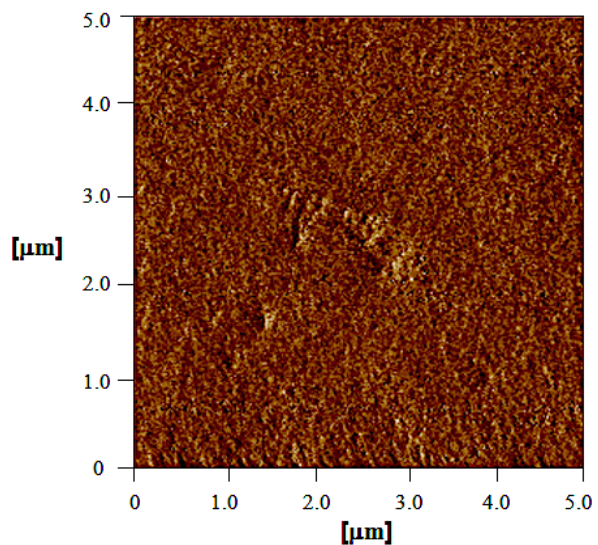
Za razliku od prethodnih mikrografija, dodatno prisustvo hidrofilnog polimera u FFS daje talasastu površinu filma usled bubrenja polimera (slike 4.3.4.7. i 4.3.4.8.). U pogledu karakterizacije topografije površine filmova prisustvo određenog tipa hidrofobnog polimera (u ovom slučaju Eudragit® RS PO) obezbeđuje najveću glatkoću površine filma (slika 4.3.4.2.), dok prisustvo hidrofilnog polimera čak i pri relativno niskoj koncentraciji (1 %) daje talasastu i manje glatku površinu filma (slika 4.3.4.8.). Ipak, najveću hrapavost površine filma pokazala je formulacija sa

prisustvom hidrofobnog polimera Eudragit® NE 30 D (slika 4.3.4.5.), verovatno usled prethodno pomenutog fenomena deformacije polimernih struktura.

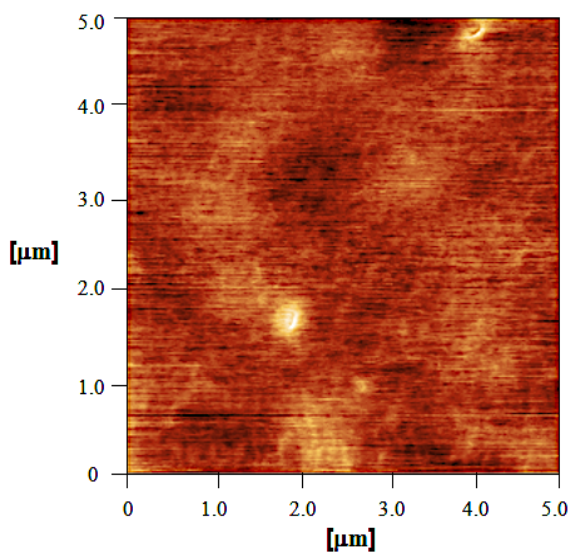
a)



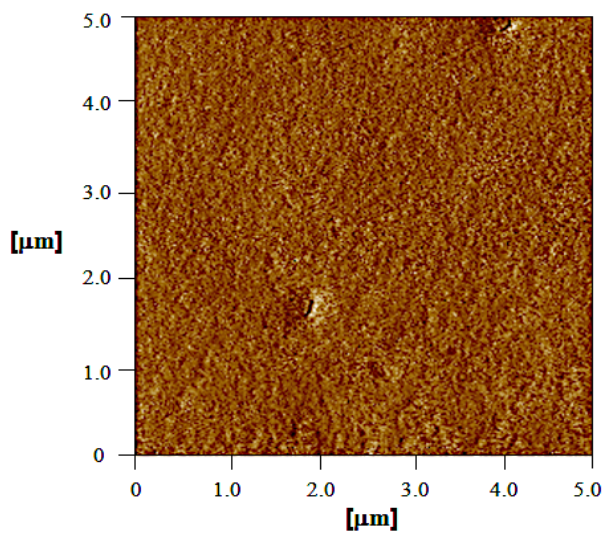
b)



c)

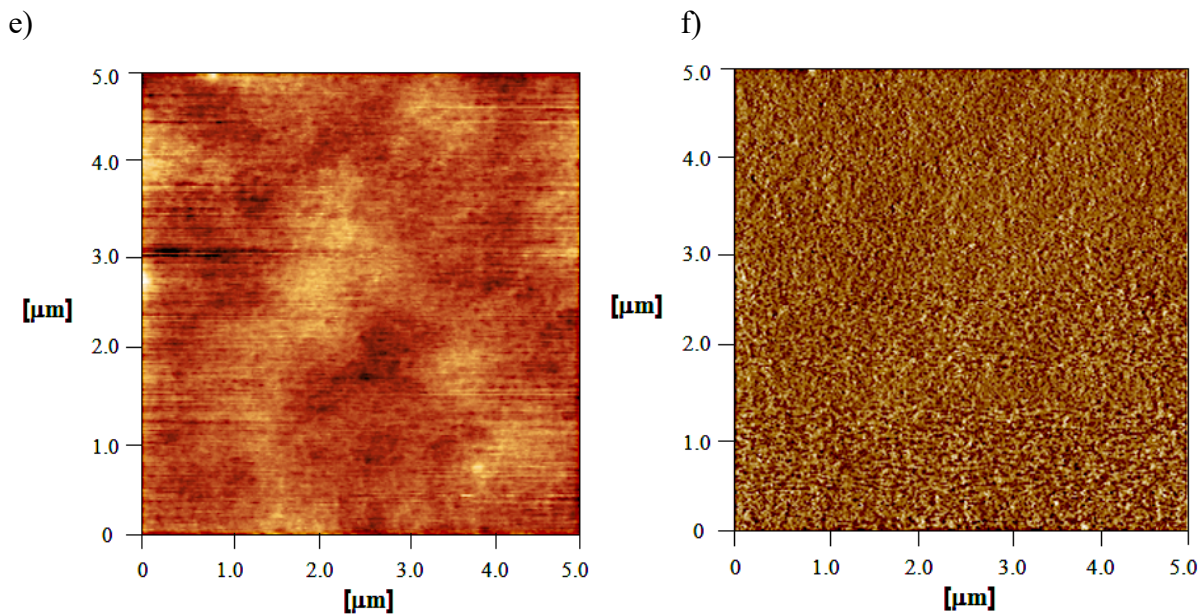


d)

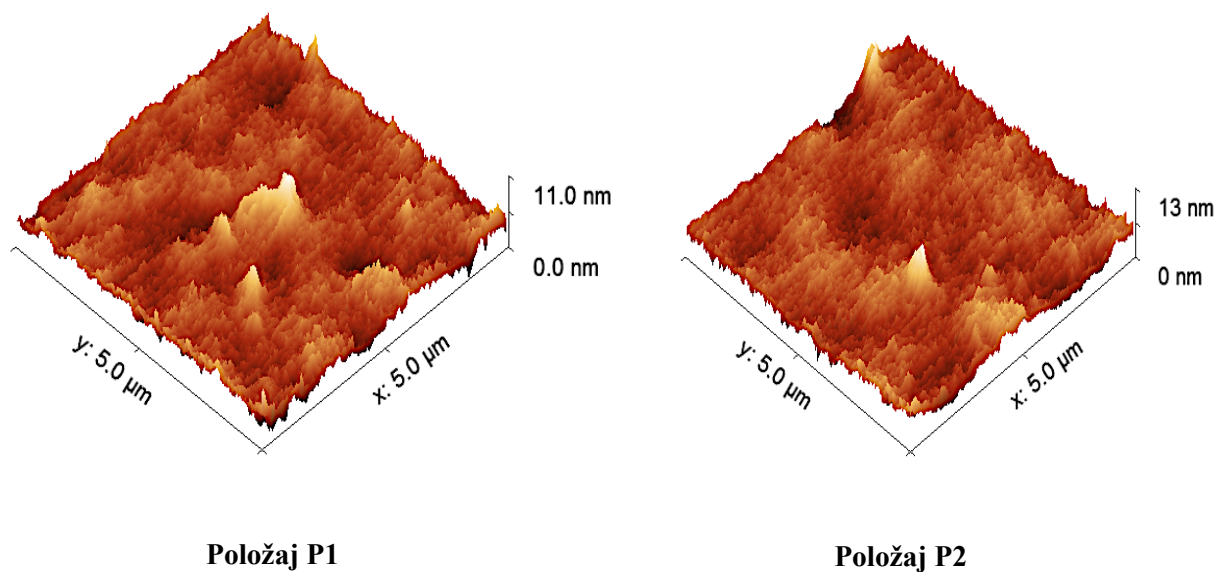


Slika 4.3.4.1. (nastavak na sledećoj strani)

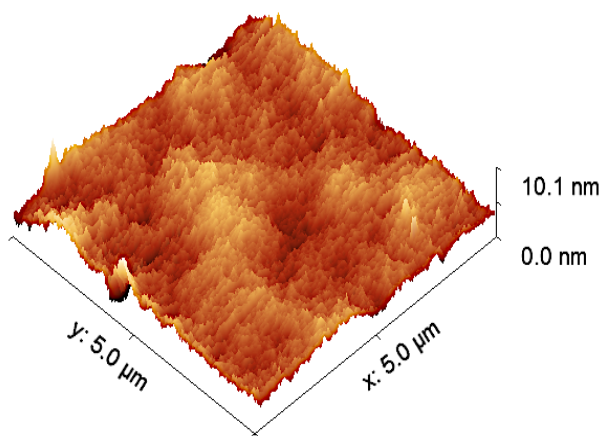




**Slika 4.3.4.1.** 2D AFM mikrografije koje prikazuju topografiju površine filma (pod a, c i e) i signal greške (pod b, d i f) snimljeni na površini  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  na različitim položajima (uzorak F1A).



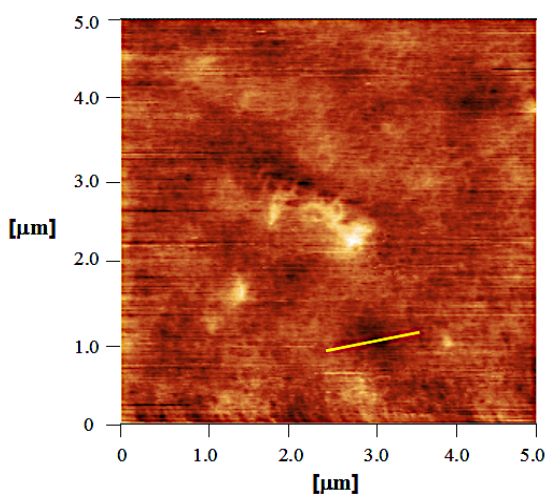
**Slika 4.3.4.2.** (nastavak na sledećoj strani)



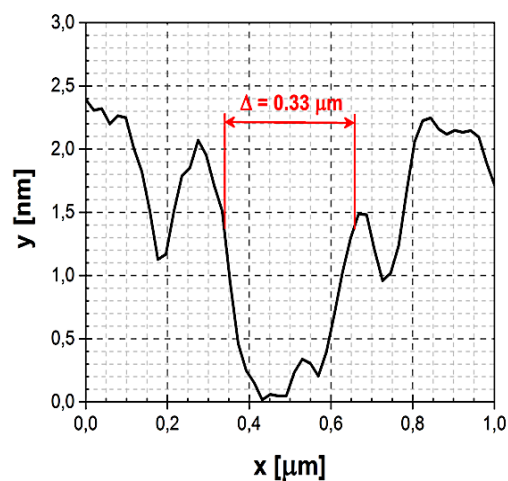
**Položaj P3**

**Slika 4.3.4.2.** 3D AFM topografije filmova koji potiču od uzorka F1A, snimljene na površini uzorka filma  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  u različitim položajima (P1, P2 i P3).

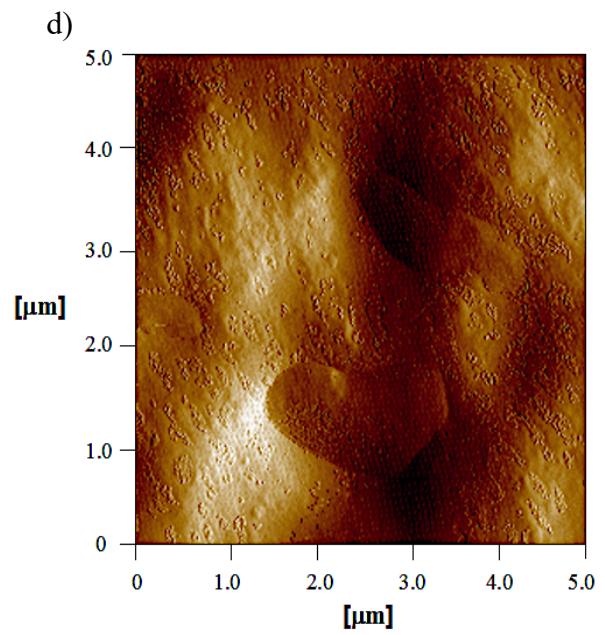
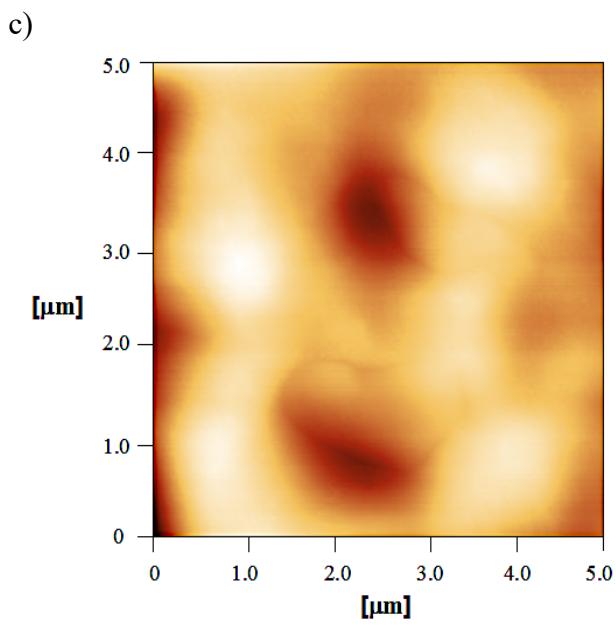
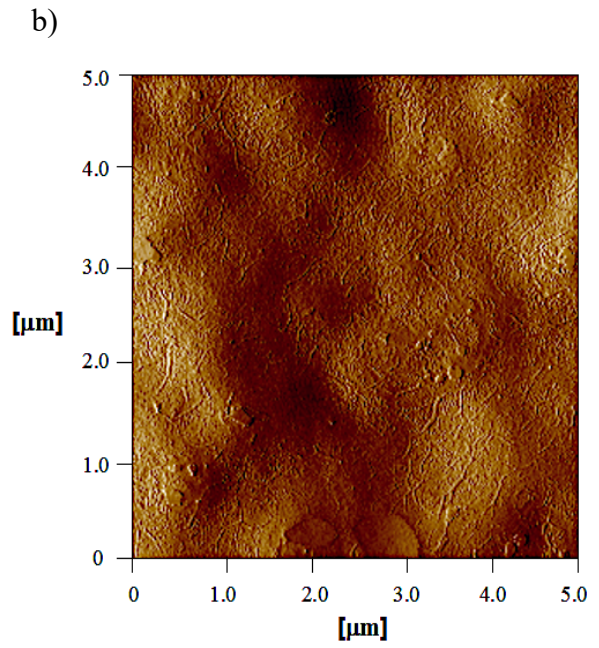
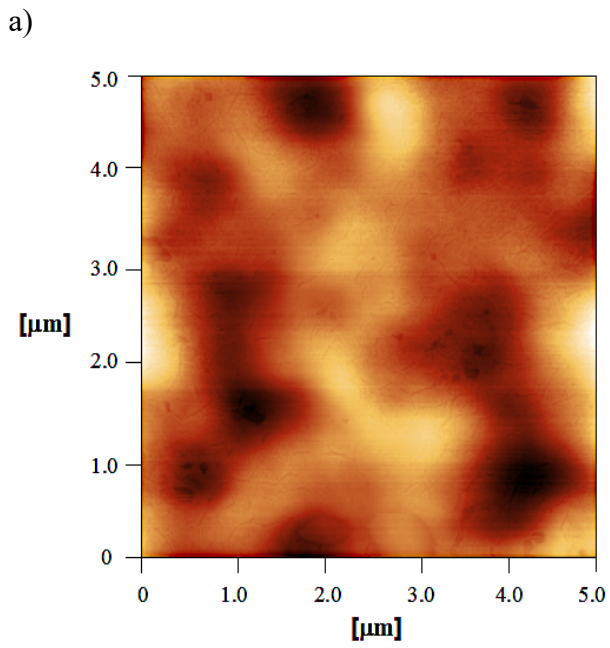
a)



b)

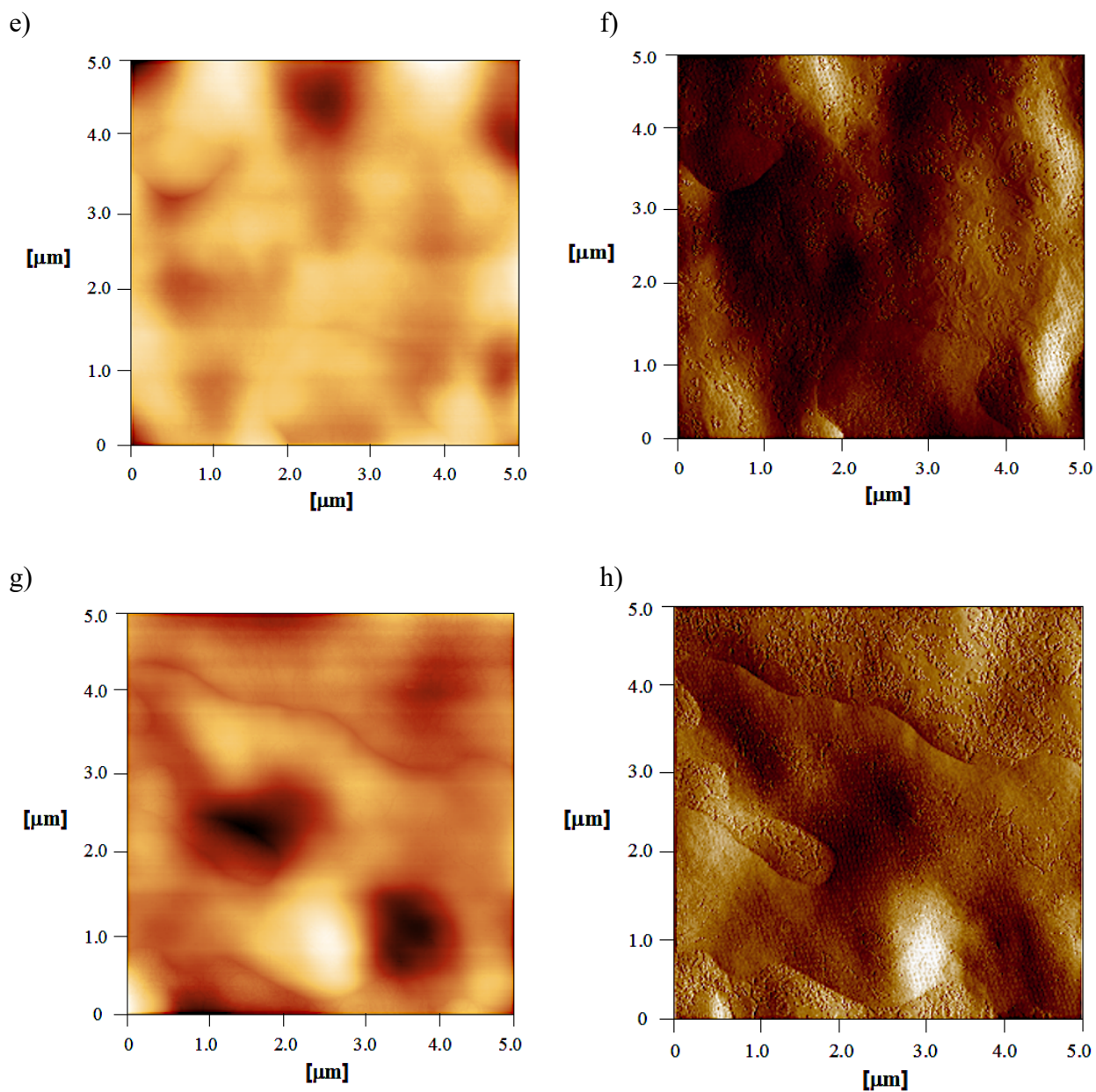


**Slika 4.3.4.3.** a) Pravac profila na 2D slici duž pojedinačne inkluzije filma (položaj P1, uzorak F1A); b) Profil duž jedne inkluzije sa dubinom od 1,5 nm i dijametrom od 0,33  $\mu\text{m}$  (položaj P1, također uzorak F1A).

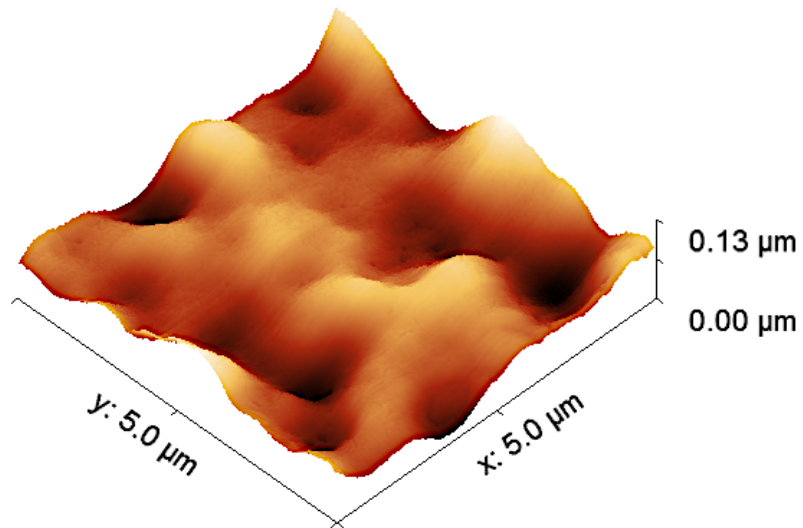


Slika 4.3.4.4. (nastavak na sledećoj strani)

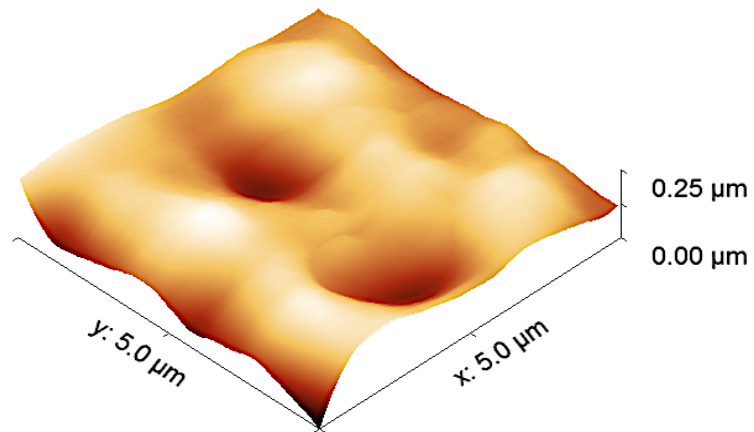




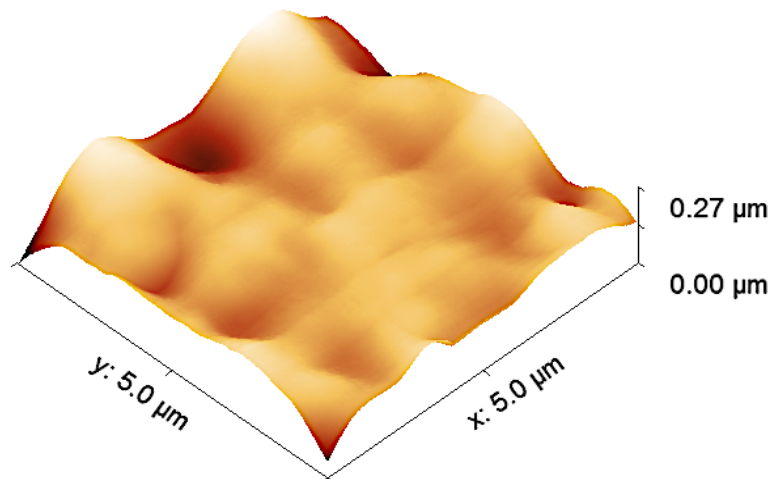
**Slika 4.3.4.4.** AFM 2D topografija obrazovanog filma (a, c, e i g) i signal greške (b, d, f i h) snimljeni na površini  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  uzorka F5A, na različitim položajima.



**Položaj P1**

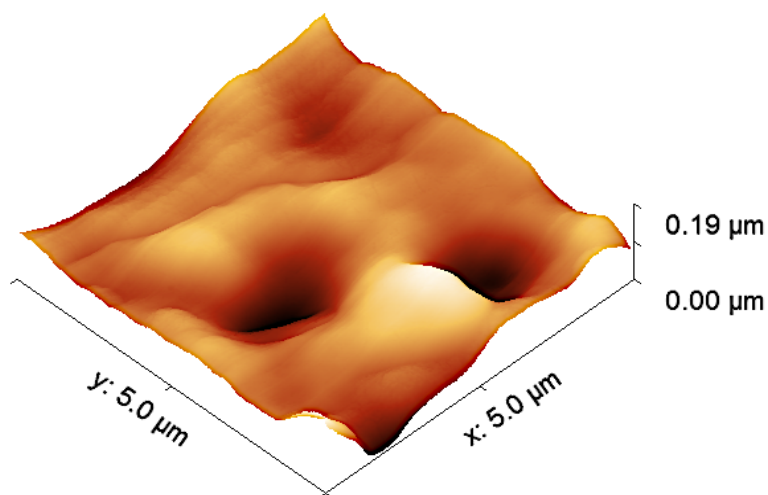


**Položaj P2**



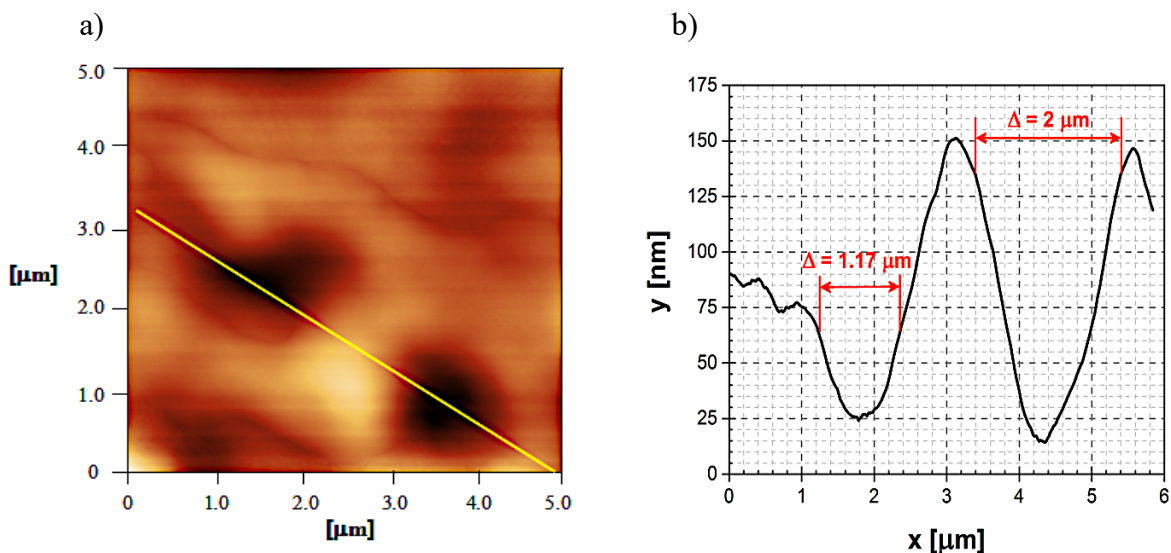
**Položaj P3**

**Slika 4.3.4.5. (nastavak na sledećoj strani)**



Položaj P4

**Slika 4.3.4.5.** AFM 3D mikrografije sa prikazom topografija filma koji potiče od uzorka F5A sa Eudragit® NE polimerom snimljena na površini  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  na 4 različita položaja (P1, P2, P3 i P4).

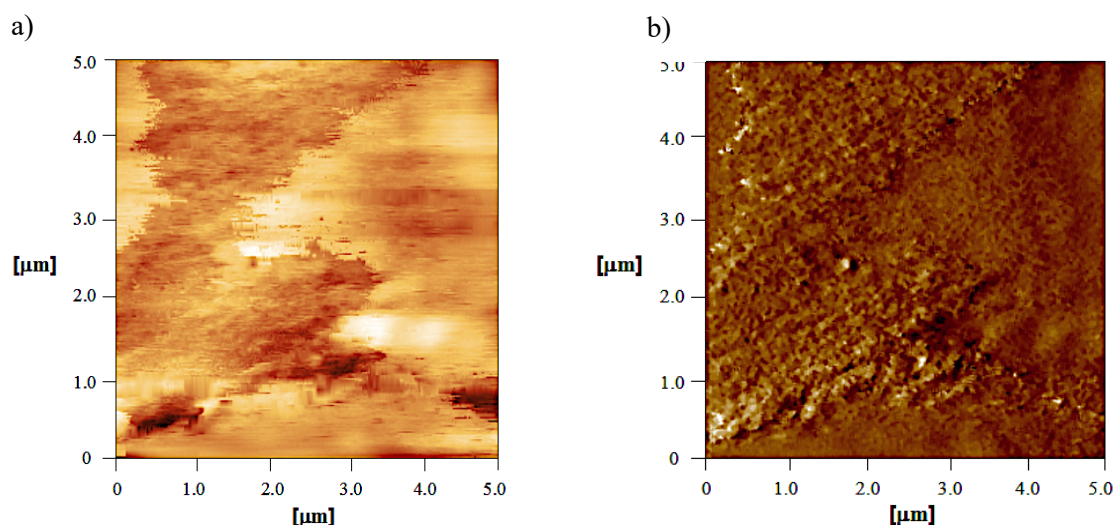


**Slika 4.3.4.6.** a) Pravac profila na 2D AFM slici duž 2 inkluzije za formulaciju F5A (položaj P4); b) Profil duž dve inkluzije pri čemu je dubina inkluzije 50-135 nm, dok je dijametar 1,17 - 2  $\mu\text{m}$ .

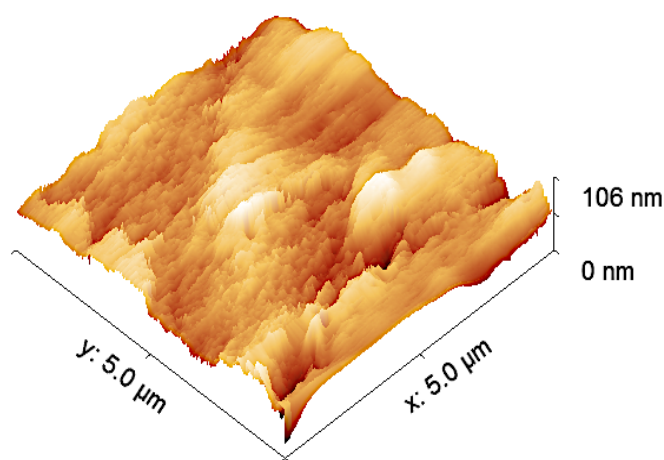
Dobijene trodimenzionalne slike površinske topografije filmova (uzorak F1A, slika 4.3.4.2) prikazuju izrazito glatku površinu filma formiranog od formulacije F1A, gde je hrapavost površine polimernog filma bila oko 1,0 nm (srednja vrednost  $R_q = 1,19 \pm 0,12$  nm) (tabela 4.3.5). Sa druge strane, kao što je prethodno istaknuto kod formiranog filma (uzorak F5A, slika 4.3.4.5.), koji sadrži polimer Eudragit® NE 30 D, dobijena je znatno veća vrednost površinske hrapavosti filma (engl. *root mean square roughness*) (srednja vrednost  $R_q = 64,9 \pm 6,7$  nm) (tabela 4.3.5). Na osnovu dobijenih rezultata, očigledno je i da odsustvo plastifikatora u formulaciji F5A značajno utiče na dobijenu vrednost visoke površinske hrapavosti filma u odnosu na ostale dve FF formulacije. Ovo potvrđuje i otkriće drugih autora koji navode da su primećene razlike među formulacijama takođe, uslovljene i prisustvom i koncentracijom korišćenog plastifikatora, a ne samo odabranog polimera (Garvie-Cook i sar., 2015). U sastavu treće ispitivane FF formulacije - F6A, prisustvo polimera

HPC čak i u niskoj koncentraciji (1 %) u kombinaciji sa polimerom Eudragit® RS PO (4 %) povećava stepen hrapavosti površine filma na  $R_q = 19,4$  nm (tabela 4.3.5).

Mikroskopijom atomskih sila je potvrđeno da se stepen površinske hrapavosti filmova međusobno razlikovao u zavisnosti od tipa i vrste polimera u sastavu FF formulacije (prisustvo hidrofobnih polimera Eudragit® RS PO ili Eudragit® NE 30 D, i sa druge strane prisustvo hidrofilnog polimera HPC), ali i prisustva određenog plastifikatora. Takođe, primetno je da konformacija koju lanci polimera zauzmu u generisanom filmu ima presudan uticaj na veću hrapavost površine filma sa polimerom Eudragit® NE 30 D u odnosu na površinu filma sa polimerom Eudragit® RS PO, što se zapravo odnosi na obrazovanje većih inkluzija (jazova) čiji je dijametar 1,17 - 2  $\mu\text{m}$  na samoj površini filma, a dubina od 50 - 135 nm (slika 4.3.4.6.). Komparativnim određivanjem dijametra i dubine inkluzija kod uzorka F1A dobijena je potvrda da su formirane inkluzije mnogo manjeg dijametra od 0,3  $\mu\text{m}$ , sa dubinom od 1,5 nm (slika 4.3.4.3.)



**Slika 4.3.4.7.** a) signal greške i b) 2D AFM slike topografija površine filma koji potiče od formulacije F6A, snimljeni na površini  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  uzorka sušenog na sobnoj temperaturi tokom 30 h.



**Slika 4.3.4.8.** 3D AFM slika topografije filma obrazovanog nakon primene formulacije F6A, snimljena na površini  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  nakon 30 h sušenja na sobnoj temperaturi.

**Tabela 4.3.5.** Hrapavost površine filmova obrazovanih nakon primene formulacija F1A, F5A, odnosno F6A, određena na različitim položajima.

Naziv uzorka	F1A			F5A			F6A	
<b>Položaj</b>	P1 (slika 4.3.4.2)	P2 (slika 4.3.4.2)	P3 (slika 4.3.4.2)	P2 (slika 4.3.4.5)	P3 (slika 4.3.4.5)	P4 (slika 4.3.4.5)	P1	P2 (slika 4.3.4.8)
<b>Root Mean Square Roughness R<sub>q</sub> [nm]</b>	1,06	1,30	1,21	67,56	69,81	57,23	/	19,39

Na osnovu AFM analize zaključuje se da je kvalitet površine filma (morfologija, hrapavost) specifično određen morfološkim i konformacijskim karakteristikama samog film-formirajućeg polimera u sastavu formulacije. Ipak, prisustvo određenog tipa plastifikatora i njegova koncentracija u formulaciji takođe mogu imati izražen uticaja na kvalitet površine filma.

Zapažanja koja su konstatovana nakon AFM analize, potvrdila su rezultate *in vivo* tribološke studije koja se odnosila na ispitivane FFS bez inkorporiranog BD (tzv. placebo FFS). Naime, glatki filmovi pokazuju nižu vrednost frikcije, pružajući manji otpor sonde osetljivog uređaja Frikciometar. Nasuprot tome, uzorak sa polimerom Eudragit® NE 30 D samostalno, pokazao je potpuno drugačije i, može se reći neočekivano tribološko ponašanje u odnosu na ostale ispitivane uzorke FFS, održavajući visoku vrednost frikcije tokom čitavog eksperimenta. Ovo je sada i potvrđeno AFM tehnikom. Dakle, utvrđeno je da je frikcija u korelaciji sa aktuelnom površinskom hrapavošću filma. Što je veća vrednost frikcije, manja je glatkoća filma i obratno. Interesantno je napomenuti i da su rezultati fizičko-mehaničkog ispitivanja (odeljak 4.3.1.) bili dosledni sa rezultatima dobijenim AFM tehnikom, gde je najveću mehaničku otpornost filma ispoljio uzorak sa prisustvom katjonskog polimera Eudragit® RS PO bilo samostalno ili u kombinaciji sa HPC (uzorci F1A, odnosno F6A).

## 4.4. Rezultati i diskusija četvrte faze eksperimentalnog rada

### 4.4.1. *In vitro* ispitivanje permeacije betametazondipropionata primenom vertikalnih Franz-ovih difuzionih ćelija

U finalnoj fazi eksperimentalnog rada potvrđene su unapređene biofarmaceutske performanse odabranih uzoraka FFS u odnosu na poredbeni, referentni proizvod (označen kao RS) na tržištu (Beloderm<sup>®</sup> mast, Belupo, Hrvatska), u kontekstu produžene i/ili poboljšane dermalne isporuke model lekovite supstance BD. Takođe, pokazana je zadovoljavajuća korelacija sa rezultatima dobijenim u okviru *in vivo* studije ispitivanja.

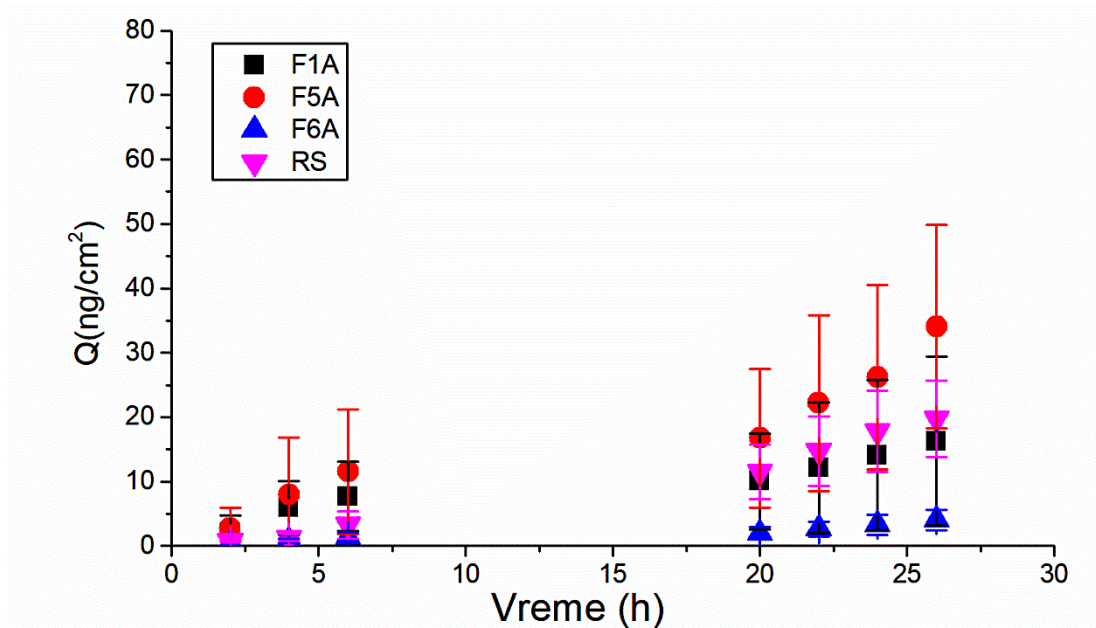
U ovoj fazi eksperimentalnog rada evaluirano je biofizičko pojašnjenje procesa rapidne transformacije koja se odigrava prelaskom sistema iz tečne faze do faze filma, što očekivano dovodi do promene termodinamičke aktivnosti, te poboljšane dermalne isporuke lipofilne model lekovite supstance betametazondipropionata.

Sadržaj lekovite supstance, sastav nosača i način izrade određuju početni stepen (super)saturacije ovakvih sistema, dok samo trajanje saturacije uglavnom zavisi od prisustva korastvarajućih ekscipijenasa koji deluju kao inhibitori precipitacije (Brouwers i sar., 2009).

Procena permeacije lekovitih supstanci odgovarajućih karakteristika se u poslednje vreme sa sve više naučne zasnovanosti izvodi *in vitro* korišćenjem vertikalnih difuzionih (često Franz-ovih) ćelija, a u cilju međusobnog poređenja i ocene ekvivalentnosti topikalnih preparata (Ilić, 2019). Prema Nacrtu vodiča za kvalitet i ekvivalentnost topikalnih proizvoda, prilikom *in vitro* ispitivanja permeacije predlaže se korišćenje isečaka humane kože. Međutim, zbog brojnih problema koji postoje prilikom rada sa humanim biološkim materijalom (neophodno odobrenje Etičkog komiteta, složenost procedure za uklanjanje/uništavanje biohazardnog otpada i dr.), alternativno, kao membrana za ispitivanje *in vitro* permeacije uobičajeno se koristi koža uha svinje, pre svega usled brojnih anatomskih, histoloških i fizioloških sličnosti sa humanom kožom. Ispitivanjem permeacije kroz humanu i kožu uha svinje, pokazana je visoka korelacija između dobijenih rezultata, posebno za lipofilne lekovite supstance (kao što je npr. takrolimus) (Flaten i sar., 2015). Dodatno, treba istaći da EMA u Vodiču za kvalitet transdermalnih flastera (*Guideline on quality of transdermal patches*) iz 2014. godine predlaže između ostalog, korišćenje kože uha svinje prilikom *in vitro* ispitivanje permeacije. Takođe, i u OECD vodiču iz 2004. godine *Guidance document for the conduct of skin absorption studies* (OECD, 2004) predlaže se korišćenje kože uha svinje, zbog pokazanih sličnosti sa humanom kožom. Stoga, kao membrana, za *in vitro* ispitivanje permeacije betametazondipropionata iz razvijenih film-formirajućih formulacija korišćen je toplotom izolovani epidermis kože uha svinje.

Odgovarajućom UHPLC-MS/MS metodom određena je koncentracija BD u svim uzorkovanim alikvotima (u prethodno definisanih sedam vremenskih tačaka). Za svaki ispitivani uzorak određivana je količina betametazondipropionata koja je permeirala kroz membranu po jedinici površine (ng/cm<sup>2</sup>) u kvintiplikatu, a izračunati permeacioni profili su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD,  $n=5$  (slika 4.4.1.).





**Slika 4.4.1.** Komparativni prikaz permeacionih profila betametazondipropionata iz ispitivanih uzoraka (F1A, F5A, F6A i RS) (srednja vrednost  $\pm$  SD,  $n = 5$ ).

**Tabela 4.4.1.** Permeacioni parametri BD dobijeni iz ispitivanih film-formirajućih formulacija (F1A, F5A, F6A) i referentne betametazon masti 0,5 mg/g (RS), korišćenjem izolovanog epidermisa kože uha svinje kao membrane (srednja vrednost  $\pm$  SD,  $n = 5$ ).

Uzorak	Brzina permeacije (ng/cm <sup>2</sup> h)	Q <sub>26h</sub> * (ng/cm <sup>2</sup> )	Koeficijent permeacije (mg/cm <sup>2</sup> h)
F1A	1,039 $\pm$ 0,783	16,277 $\pm$ 13,130	0,0016 $\pm$ 0,0012
F5A	2,964 $\pm$ 0,851 <sup>a</sup>	34,049 $\pm$ 15,795 <sup>a</sup>	0,0046 $\pm$ 0,0013 <sup>a</sup>
F6A	0,348 $\pm$ 0,157 <sup>b</sup>	4,026 $\pm$ 1,615 <sup>b</sup>	0,0005 $\pm$ 0,0002 <sup>b</sup>
RS	1,247 $\pm$ 0,209	19,726 $\pm$ 5,953	0,0019 $\pm$ 0,0003

\* Količina BD koja je permeirala kroz toplotom izolovani epidermis kože uha svinje na kraju eksperimenta (nakon 26 h).

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa formulacijama F1A, F6A i RS

<sup>b</sup>  $p < 0,05$  u poređenju sa RS

Dobijeni permeacioni profili ukazuju na razlike u permeaciji BD između većine ispitivanih formulacija. U poređenju sa svim ostalim uzorcima, permeacija lekovite supstance je bila najveća za uzorak F5A i odvijala se prema sledećem redosledu (F5A > F1A > RS > F6A). Fluks BD iz polimernih, hidrofobnih filmova formiranih od Eudragit® polimera samostalno (F1A, F5A) je bio viši već u početnim satima nakon inicijalne primene (posebno, nakon 4h i nakon 6h) i nastavljao je postepeno da raste (slika 4.4.1). Nakon 26 h, u poređenju sa referentnim proizvodom na tržištu, permeacija BD iz uzorka F5A je bila značajno povećana i to za 2,5 puta.

Razmatrajući u celosti dobijene rezultate za različite ispitivane FFS očigledno je da sastav formulacije (prvenstveno izabrani polimer ili kombinacija polimera, a potom i izabrani sistem



rastvarača, plastifikatora i površinski aktivne materije) značajno utiče na permeacione profile BD. Posebno, uzorak F5A pripremljen sa hidrofobnim polimerom Eudragit® NE 30D je pokazao najveću količinu permeirane model lekovite supstance nakon 26 h, kao i najveću vrednost stacionarnog/ravnotežnog fluksa (engl. *steady-state*) i koeficijenta permeacije (tabela 4.4.1). Step en i brzina permeacije BD iz uzorka F5A su bili značajno veći u odnosu na sve ostale ispitivane uzorke (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Veća brzina permeacije BD iz uzorka F5A se može tumačiti kao rezultat povećane termodinamičke aktivnosti lekovite supstance iz polimernog nosača, gde nakon evaporacije izabranog rastvarača, tj. izopropil alkohola, dolazi do brzog preuzimanja BD-a i njegovog koncentrisanja u rezidualnom polimernom filmu (tj. formiranjem rezervoara lekovite supstance na samoj površini kože, a potom i unutar *stratum corneum*-a), što naknadno dovodi do postepenog oslobađanja lekovite supstance u produženom vremenskom periodu.

Sa druge strane, u poređenju sa uzorkom F5A, uzorak F1A koji sadrži hidrofobni polimer Eudragit® RS PO pokazuje trend niže količine permeiranog BD-a nakon 26 h (posebno u kasnijim vremenskim tačkama), uključujući statistički niže vrednosti stacionarnog fluksa i koeficijenta permeacije ( $t$ -test,  $p < 0,05$ ). Međutim, dobijeni rezultati se ne mogu pripisati varijaciji u tipu polimera već radije prisustvu plastifikatora uključenih u sastavu uzorka F1A. Uzimajući u obzir studiju opisanu od strane Gennari i sar. (2017) izgleda da sami plastifikatori i površinski aktivna materija (PAM) (tj. propilenglikol i polisorbitat 80) smanjuju termodinamičku aktivnost BD-a poboljšanom solubilizacijom unutar filma, što rezultira smanjenim fluksom BD-a kroz epidermalnu membranu. Međutim, svakako treba imati na umu i prethodno pokazanu vezu između hidrofилности matriksa i penetracije lekovite supstance (Cilurzo i sar., 2014). Zanimljivo je da se povećana permeacija BD iz uzorka F1A i F5A može dovesti u vezu sa rezultatima dobijenim u prvom segmentu *in vivo studije*, gde su analogne formulacije bez prisustva lekovite supstance (tj. placebo uzorci označeni kao F1 i F5) u poređenju sa ostalim ispitivanim formulacijama pokazale značajno smanjenje TEGV 1 h nakon ukljanjanja 24-h časovne okluzije, te je konstatovano da ove formulacije, okarakterisane prisustvom isključivo hidrofobnih polimera, pokazuju semi-okluzivan efekat na koži. Stoga se na neki način i očekivalo da one pokažu poboljšanu isporuku lekovite supstance u odnosu na preostalu ispitivanu FF formulaciju. Osim toga, dodatno prisustvo vodene disperzije polimera NE u nastalom filmu (F5A), sa odloženom i dugotrajnom evaporacijom vode bi takođe, moglo da doprinese dodatnom hidriranju kože i poboljšanoj permeabilnosti lekovite supstance.

Kod uzorka F6A, interesantno je da dodatak hidrofилnog HPC polimera (Klucel® GF) u formulaciju koja sadrži hidrofobni polimer Eudragit® RS PO, plastifikator i PAM (propilenglikol i polisorbitat 80) dalje smanjuje permeaciju BD-a kroz epidermalnu membranu. Međutim, u poređenju sa formulacijom F1A, koja je zasnovana isključivo na polimeru Eudragit® RS PO, nije uočena statistički značajna razlika u praćenim permeacionim parametrima (Mann Whitney U test,  $p > 0,05$ ) (tabela 4.4.1). Postoji nekoliko činioca koji mogu da utiču na smanjenu permeaciju BD iz ovog uzorka. Od ispitivanih uzoraka, uzorak F6A je imao najveći viskozitet, kao i najveću debljinu formiranog filma (tabela 4.3.1). Stoga, smanjeno preuzimanje BD-a kroz epidermalnu membranu iz F6A formulacije može proisteći iz ograničene difuzije lekovite supstance, odnosno njenog oslobađanja iz formiranog filma. Naime, evidentno je da tokom procesa formiranja filma prelazna blago-gelasta struktura usled pomenutog prisustva HPC dovodi do odloženog oslobađanja BD.

Nakon ispitivanja permeacionih profila BD može se reći da su dobijeni rezultati takođe bili u korelaciji sa rezultatima prikazanim od strane Garvie-Cook i sar. (2015) koji su pokazali očigledno superiornije performanse FFS sa hidrofobnim polimerima, specifično, polimeri iz Eudragit® i Dermacryl® grupe, u odnosu na FFS izrađene isključivo sa hidrofилnim polimerom Klucel®. Dobijeni nalazi se makar delom mogu pripisati superiornijoj tzv. anti-nukleacijskoj efikasnosti hidrofobnih polimera iz Eudragit® i Dermacryl® grupe. Dodatno, tokom evaporacije rastvarača, sugerisano je da ovi hidrofobni polimeri mogu da stabilizuju lekovitu supstancu u prolaznom, superzasićenom (tj. metastabilnom) stanju znatno bolje u odnosu na hidrofилni polimer Klucel® i to putem vodoničnih interakcija ostvarenih između lekovite supstance i H-veze

akceptorskih amino grupa. Kao rezultat navedenog procesa, omogućeno je uspostavljanje dvostrukih rezervoara lekovite supstance koji se formiraju kako unutar rezidualnog polimernog filma na površini kože tako i unutar *stratum corneum*-a, iz kojih se lekovite supstance dalje kontinuirano oslobađa tokom vremena do nižih vijabilnih slojeva kože i receptorskog odeljka (Garvie-Cook i sar., 2015). Ovaj opisani fenomen bi takođe mogao da podrži uočenu, značajno poboljšanu permeaciju BD iz uzorka F5A koji je sastavljen isključivo od hidrofobnog polimera Eudragit® NE 30D, a sa naglaskom da ovaj uzorak nije sadržao plastifikator i PAM.

Finalno, kada su svi ispitivani FFS poređeni sa izabranom referentnom formulacijom (Beloderm® mast) uočena je statistički značajna razlika u svim praćenim permeacionim parametrima između sledećih uzoraka: RS i F5A; kao i RS i F6A; ali bez značajnih razlika između uzoraka RS i F1A (*t*-test ili Mann Whitney U test,  $p < 0,05$ ).

Interesantno je da u praćenom vremenskom intervalu do nakon 26 h, nije bilo značajne razlike u brzini permeacije BD između uzoraka F1A i RS, potvrđujući poznati 'depo efekat' steroida, gde se dodatna penetracija lekovite supstance odvija usled okluzije kože i to u dužem vremenskom periodu nakon steroidnog tretmana. Rezultati *t*-testa su pokazali da pored statistički značajne razlike između F5A i svih ostalih formulacija (F1A, F6A i RS), takođe postoji statistički značajna razlika i između RS i F6A, ( $p < 0,05$ ) (tabela 4.4.1.). Najniži, a ipak optimalni permeacioni profil BD iz F6A, mogao bi da se objasni prisustvom hidrofilnog polimera HPC koji je u značajnoj meri smanjio stopu oslobađanja BD, ali delimično i prisustvom niže koncentracije hidrofobnog polimera - Eudragit® RS PO (4 %).

Zaključuje se da je pri ispitivanoj terapijskoj koncentraciji BD (0,064 %), optimalna kombinacija hidrofilnog (HPC) i hidrofobnog polimera (Eudragit® RS PO) u nosaču, pri definisanim koncentracijama od 1 % i 4 % (formulacija F6A) posebno pogodna za produženu isporuku BD. Kao što je gore navedeno, prisustvo hidrofilnog polimera HPC u izabranoj koncentraciji (1 %) u formulaciji F6A takođe povećava viskozitet formiranog filma u odnosu na viskozitet filmova formiranih iz F1A i F5A, što se sveukupno odražava na smanjenu difuziju lekovite supstance iz ovakvog sistema.

Stoga, može se zaključiti da fenomen supersaturacije u produženim vremenskim periodima ne mora biti nužno povezan i sa povećanjem u samoj isporuci lekovite supstance. Ograničena permeabilnost BD čini F6A formulaciju obećavajućim kandidatom za kontrolisanu, odnosno produženu isporuku BD na koži. Uočeni, sporiji permeacioni profil bi mogao da omogući manju učestalost primene leka, što bi dovelo do bolje komplijanse pacijenata. Takođe, usled visoke supstantivnosti (prethodno prikazane za odgovarajući placebo uzorak F6 u okviru *in vivo* tribološke studije), ova formulacija bi posebno mogla da bude pogodna za primenu leka na površinama tela izloženim intenzivnoj frikciji (npr. pregibi na rukama i nogama). Međutim, detaljna klinička ispitivanja na samim psorijaznim lezijama (plakovima) treba da potvrde klinički značaj i relevantni uticaj razvijenih sistema na terapijsku efikasnost BD-a. Takođe, izgleda da prisustvo propilenglikola (0,5 %) i surfaktanta (0,3 % polisorbata 80) u nižim koncentracijama može doprineti smanjenju permeacije inkorporirane lekovite supstance kroz kožu. Dodatno, prisustvo neisparljivih rastvarača, poput hidrofilnog propilenglikola u koncentraciji od 1 % dodatno hidrira i vlaži kožu i poboljšava difuziju permeansa kroz membranu, dok prisustvo nejonskog polisorbata 80 (1 %) povećava solubilizaciju lipofilnog BD, i sprečava njegovu kristalizaciju u rezidualnom filmu na površini kože (uzorak F1A).

Nakon ispitivanja permeacije korišćenjem biološki relevantne membrane dobijena je biofarmaceutska potvrda poboljšane dermalne raspoloživosti model lekovite supstance, betametazondipropionata, iz polimernih FFS (praćena u vremenskom periodu od 26 h nakon inicijalne primene na koži) usled prisutnog fenomena (super)saturacije, pri čemu je utvrđeno da sastav formulacije igra kritičnu ulogu u isporuci lekovite supstance kroz kožu. Tip i svojstva izabranog film-formirajućeg polimera su jedan od glavnih faktora koji utiču na permeabilnost inkorporirane lekovite supstance. Dalje, sam FFS kao prospektivan farmaceutski oblik nudi dosta mogućnosti, počevši od toga da li će sistem biti dizajniran u obliku rastvora ili disperzije. Pri tome,

utvrđeno je da rastvor najbrže i u najvećem stepenu povećava dermalnu raspoloživost lekovite supstance usled brze evaporacije organskog rastvarača i međusobne penetracije polimernih lanaca tokom formiranja polimernog filma. Naravno, vrsta i koncentracija odabranog plastifikatora takođe, mogu značajno uticati na brzinu i stepen permeacije. Prisustvo dodatnih ekscipijenasa poput površinski aktivnih materija (polisorbat 80), takođe ima uticaja na poboljšanu difuziju leka.

Sa druge strane, značajno povećana permeabilnost leka koja je evidentno uočljiva posebno iz uzorka F5A, a potom i uzorka F1A, te dalje naročito izražena u početnim vremenskim intervalima nakon primene otvara i nove potencijalne mogućnosti u dizajniranju i primeni FF formulacija i sa nižom terapijskom koncentracijom BD od one koja je ovde korišćena (odnosno sa sadržajem BD < 0,064 %). Ovo je terapijski važna činjenica koja ide u prilog smanjenju rizika od potencijalnih neželjenih efekata kod kortikosteroida jakog delovanja, kao što je BD, a nakon dermalne primene. U tom smislu, neophodna su dodatna ispitivanja, kako bi se potvrdila navedena pretpostavka. Prevažodno, regulatorno široko prihvaćen *in vivo* vazokonstriktorni test, kojim se procenjuje farmakodinamski efekat topikalno primenjenih kortikosteroida (merljivo izbeljivanje kože kao posledica vazokonstrikcije dermalne mikrovaskulature) može da pruži uvid u prisustvo/odsustvo razlika u biološkoj raspoloživosti između različitih formulacija.

#### **4.4.2. Definisane kritičnih atributa kvaliteta film-formirajućih sistema**

Nakon 4 faze eksperimentalnog rada, uspostavljena je **metoda selekcije kritičnih atributa kvaliteta (engl. CQA)** koje treba pratiti kako bi se detektovale eventualno prisutne razlike u mikrostrukturi FF formulacija, tehnike koje treba koristiti za merenje odabranih kritičnih atributa kvaliteta, kako treba interpretirati dobijene rezultate i korelirati promene u kritičnim atributima kvaliteta sa odgovarajućim promenama u relevantnim biofarmaceutskim parametrima.

**Glatkoća filma** je važan kritični atribut kvaliteta koji ukazuje na ostvareni kontakt filma sa kožom, odnosno ispoljeni efekat prijanjanja na koži. Što je glatkoća filma veća, bolje je prijanjanje filma na koži i obratno. Na osnovu AFM analize, uspostavljeni kvalitet površine filmova je specifično određen morfološkim svojstvima i konformacijskim strukturama različitih tipova polimernih molekula u sastavu ispitivanih film-formirajućih formulacija. AFM tehnika je pokazala da je površinska hrapavost filmova u korelaciji sa rezultatima dobijenim u okviru *in vivo* segmenta tribološke studije. Dakle, niska vrednost frikcionog parametra ukazuje na veću površinsku glatkoću filma i obratno. Što je veća vrednost frikcionog parametra veća je i površinska hrapavost filma.

**Lepljivost filma** je važan kritični atribut kvaliteta i osnovni preduslov koji treba zadovoljiti u dizajnu FFS za dermalnu isporuku na koži. Dakle, ovakvi sistemi zahtevaju potpuno odsustvo lepljivosti da bi se uopšte mogle razmatrati njihove ostale karakteristike. U radu je primenjen metod koji se jednostavno može implementirati u svakoj laboratoriji.

**Brzina sušenja filma** je kritični atribut kvaliteta koji je važan u pogledu prihvatljivosti od strane pacijenta, ali i neophodan za ostvarenje supstantivnosti formiranog filma na koži. Ukoliko bi sistem ispoljio produženo vreme sušenja na koži, recimo duže od npr. 15 min, samim tim bi postojala veća verovatnoća da se nepotpunim sušenjem, a u kontaktu sa odećom ukloni deo preparata i time dovede u pitanje terapijsko dejstvo. Dakle, optimalna brzina sušenja koja bi bila najadekvatnija za terapijsku primenu je definisana na oko 5-7 minuta. Odnosno, što je brzina sušenja kraća, očekuje se bolja prihvatljivost od strane pacijenta i uopšte pogodnost primene na koži.

**Umereno lateralno širenje na koži** je kritični atribut kvaliteta koji je važan u smislu aplikativnosti i sprečavanja npr. curenja preparata sa same površine kože. Stoga je cilj obezbediti da se nakon nanošenja FFS obrazuje film adekvatne površine sposoban da pokrije samu leziju na koju se nanosi, a da se sa druge strane spreči curenje preparata sa mesta primene.

**Mehanička otpornost filma** je važan kritični atribut kvaliteta koji ukazuje na postojanost filma na koži i njegov integritet u celini. Prisustvo određenog tipa plastifikatora, kao i prisustvo nejonskog surfaktanta polisorbata 80 u FF formulaciji obezbeđuje važan uticaj na kvalitet površine nastalog filma (tj. poboljšava mehaničku otpornost filma), što na kraju rezultira glatkom i sjajnom površinom filma. Tako je film formiran iz uzorka F1A bio potpuno transparentan, sjajan i glatke površine, sa najvišom vrednošću uvijanja filma od  $111,0 \pm 2,0$  puta, što ukazuje na veoma dobru mehaničku otpornost i postojanost filma. Sa druge strane, film formiran iz uzorka F5A bez prisustva plastifikatora sa vrednošću uvijanja filma od  $54,0 \pm 2,0$  puta je pokazao znatno nižu mehaničku otpornost filma u odnosu na ostala 2 uzorka. Film formiran iz uzorka F6A je imao veoma dobru mehaničku otpornost filma sa vrednošću uvijanja filma od  $107,0 \pm 1,0$ . Takođe, treba naglasiti da nije bilo statistički značajnih razlika u vrednostima uvijanja filmova sa prisutnim lekom u poređenju sa njihovim odgovarajućim placebo uzorcima (F1A, F5A, F6A vs. F1, F5, F6).

**Debljina filma** je važan kritični atribut kvaliteta koji ukazuje na anticipiranu povećanu ili produženu permeaciju lekovite supstance kroz kožu. Ukoliko je film tanji očekivana je bolja i brža permeacija lekovite supstance kroz kožu i obratno, odnosno, što je film deblji očekivana je niža i sporija permeacija kroz kožu. Film formiran iz uzorka F6A je veće debljine ( $0,032 \pm 0,006$  mm) u odnosu na veoma tanke filmove formirane iz uzoraka F5A ( $0,015 \pm 0,002$  mm) i F1A ( $0,007 \pm 0,001$  mm). Nije bilo statistički značajnih razlika u vrednostima debljine filmova sa prisutnim lekom u poređenju sa njihovim odgovarajućim placebo uzorcima (F1A, F5A, F6A vs. F1, F5, F6).

**Viskozitet FFS** je kritični atribut kvaliteta koji, između ostalog, može ukazati na potencijalnu bioadhezivnost filma i njegovu postojanost na koži. Vrednosti viskoziteta su bile u direktnoj korelaciji sa rezultatima dobijenim u okviru tribološke studije *in vivo*, gde je nivo supstantivnosti placebo FFS na koži bio prema sledećem redosledu:  $F6 > F5 > F1$ . Od ispitivanih FF formulacija sa BD, uzorak F6A je imao najveću vrednost početnog viskoziteta ( $47,17 \pm 3,06$  mPa·s), dok je uzorak F1A imao najmanju vrednost početnog viskoziteta ( $1,67 \pm 0,03$  mPa·s). Zanimljivo je da je viskozitet FFS bio u direktnoj korelaciji sa površinom formiranog filma. Tako je uzorak F1A sa najnižim viskozitetom imao najveću površinu obrazovanog filma ( $210,0 \pm 14,2$  mm<sup>2</sup>), tj. najveće lateralno širenje na koži, dok je uzorak F3 sa najvećim viskozitetom ( $1450,19 \pm 702,10$  mPa·s) imao najmanju površinu obrazovanog filma ( $24,0 \pm 1,2$  mm<sup>2</sup>) tj. pokazao je najmanje primarno i lateralno širenje.

Na osnovu navedenog, može se istaći da **reološka studija kao i vrednost površine formiranih filmova** u ranoj fazi razvoja FFS, mogu da ukažu na svojstva od značaja tj. bioadhezivnost i zadržavanje polimernih sistema na koži. Studija je ukazala da kod svih ispitivanih FFS nema statistički značajnih promena u vrednostima viskoziteta tokom vremena. Svi uzorci su čuvani u standardnoj ambalaži tj. tamnim, staklenim bočicama sa polipropilenskim zatvaračem, na sobnoj temperaturi i zaštićeni od svetlosti. Na kraju, nizak viskozitet odabranih uzoraka je ukazao na mogućnost komfornije primene ovakvih sistema u preparatima tipa spreja ili novijim pakovnim rešenjima koja omogućavaju preciznije doziranje leka.

**pH vrednost FFS** je kritični atribut kvaliteta koji može da ukaže na anticipiranu, tj. povećanu permeaciju leka kroz kožu, a takođe ukazuje i na dermatološku prihvatljivost formulacija nakon primene na koži. pH vrednost ispitivanih formulacija sa model lekovitom supstancom (BD) se kretala u opsegu od 6,6 – 7,7. Najveću pH vrednost je imao uzorak F5A od  $7,7 \pm 0,06$ . Kao što je ranije opisano u poglavlju 4.3.1, u odnosu na inicijalne pH vrednosti ispitivanih formulacija, primećene razlike u pH vrednostima nisu bile statistički značajne (nakon 3 meseca unutar 0,2 pH jedinica), nakon 6 meseci (unutar 0,5 pH jedinica), a nakon godinu dana (unutar 0,8 pH jedinica). Takođe, sve dobijene pH vrednosti FFS kako sa inkorporiranom aktivnom supstancom tako i bez aktivne supstance ukazuju da su ispitivane polimerne matrice pogodne za dermatološku primenu i da ne dovode do iritacije ili osećaja bilo kakve neugodnosti na koži, što je i potvrđeno u okviru *in vivo* ispitivanja sa testiranim placebo uzorcima.

**Povećana termodinamička aktivnost lekovite supstance bez vidljive precipitacije u toku i nakon formiranja filma** je kritični atribut kvaliteta od posebnog značaja kako u fazi razvoja i

karakterizacije FFS, tako i u proceni njihovih *biofarmaceutskih performansi*. Naime, kontrola kristalizacije lekovite supstance u svim fazama transformacije FFS kao i nakon obrazovanja filma *in-situ* je od presudne važnosti za *efikasnost i kvalitet ispitivanih dermalnih sistema*.

Metode termalne (DSC) i spektroskopske karakterizacije (FT-IR), ukazuju da je model lekovita supstanca (BD) ostala stabilna tokom procesa dinamičke transformacije kod ispitivanih sistema koji uključuju hidrofobni i/ili hidrofilni polimer, i to u celokupnom procesu tranzicije od tečnosti-do-filma, kao i nakon formiranja filma.

Metoda AFM, kao i metoda optičke mikroskopije su takođe, potvrdile odsustvo kristalizacije leka u ispitivanim sistemima sa model lekovinom supstancom BD.

Kod uzorka F1A koji sadrži polimer Eudragit® RS PO (8,5 %) u prisustvu nejonskog polisorbata 80 (1 %), potvrđena je sposobnost samog surfaktanta da inhibira precipitaciju lekovite supstance u rezidualnom polimernom filmu putem njegove solubilizacije, na taj način sprečavajući da se kristalizacija dogodi u dužim vremenskim periodima nakon izrade (DSC analiza ispitivanih uzoraka nakon 2 meseca je potvrdila odsustvo kristalizacije leka u svim uzorcima). Stoga se u ovako dizajniranom sistemu može prihvatiti da je koncentracija polimera Eudragit® RS PO od 8,5% adekvatna za dermalnu isporuku BD.

*U odnosu na dosadašnje stanje tehnike* za topikalnu primenu na koži, otkriveno je da izabrana kombinacija hidrofilnog polimera HPC (1 %) sa hidrofobnim polimerom Eudragit® RS PO (4,0 %) ovde prisutnim u znatno nižoj koncentraciji, u uzorku F6A najverovatnije usled bubrenja samog hidrofilnog polimera značajno produžava oslobađanje lekovite supstance i smanjuje ukupnu permeaciju BD nakon 26 h, u odnosu na uzorke sa hidrofobnim polimerima samostalno (F1A, F5A). Dalje, otkriveno je da kombinovano prisustvo hidrofobnog polimera Eudragit® NE 30 D (6,0%) (dostupnog na tržištu u obliku vodene disperzije) i smeše izopropil alkohola i vode, dovodi do takvih promena u rezidualnom polimernom filmu uzorka F5A da statistički značajno povećava obim i brzinu permeacije BD u poređenju sa ostalim ispitivanim formulacijama (F1A, F6A, RS).

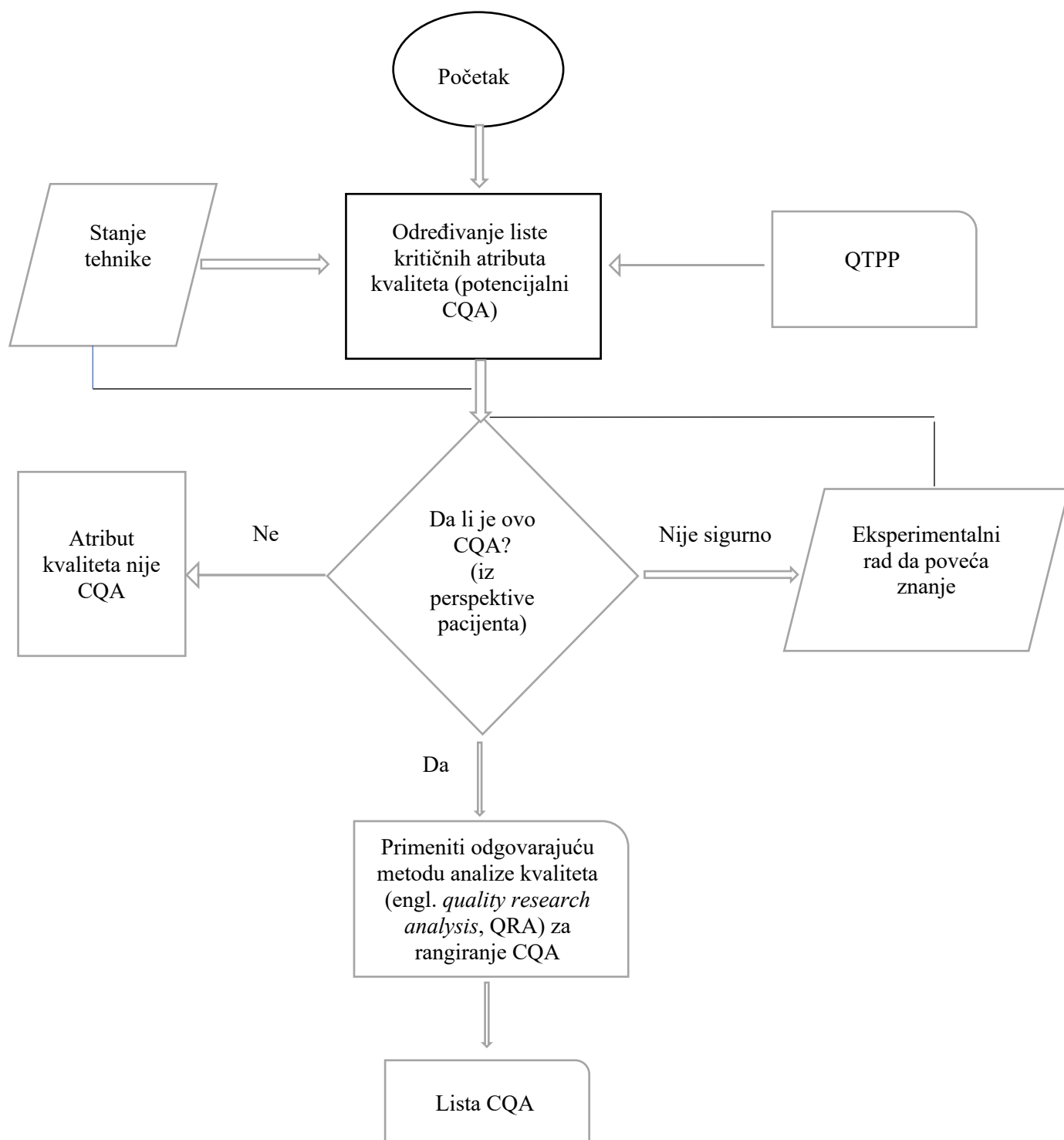
*Na osnovu AFM analize*, primećeno značajno poboljšanje u permeacionom profilu BD kod F5A se može povezati i sa prisustvom izraženih dolina (tzv. inkluzija) u mikrostrukturi filma, koje izgledaju kao da uranjaju u samu površinu uzorka, sa dijametrom od 1,17 - 2 µm. Sledstveno, niži permeacioni profil uočen kod F1A u poređenju sa F5A se može povezati i sa značajno manjim dijametrom ovde vidljivih inkluzija od 0,3 µm. Na ovaj način, uspostavljanjem rezervoara lekovite supstance u rezidualnom polimernom filmu na koži (unutar inkluzija), kao i unutar *stratum corneum*-a može biti objašnjena produžena i poboljšana isporuka leka kod ovih sistema.

Prethodni nalazi sumarno i koncizno su prikazani u okviru tabele 4.4.2.

**Tabela 4.4.2.** Šematski prikaz definisanih kritičnih atributa kvaliteta FFS, preporučene i/ili alternativne tehnike karakterizacije i optimalne vrednosti.

<b>Kritični atribut kvaliteta</b>	<b>Preporučene metode karakterizacije</b>	<b>Optimalne vrednosti</b>	<b>Alternativne metode karakterizacije</b>
<b>Izgled filma (glatkoća)</b>	Senzorno profilisanje <i>In vivo</i> ispitivanje frikcije	/	AFM za laboratorije koje nemaju iskustva sa <i>in vivo</i> studijama koje podrazumevaju regrutovanje ispitanika, pribavljanje odobrenja nadležnog Etičkog komiteta, itd.
<b>Lepljivost filma</b>	Senzorno profilisanje <i>In vivo</i> ispitivanje frikcije	Odsustvo lepljivosti	Analiza teksture (delimično)
<b>Supstantivnost filma</b>	<i>In vivo</i> ispitivanje prema metodi opisanoj u odeljku 3.2.4	Transfer lekovite supstance na odeću < 20 %	/
<b>Kompatibilnost sa kožom</b>	<i>In vivo</i> ispitivanje iritacionog potencijala prema metodi opisanoj u odeljku 3.2.4	Odsustvo značajnog povećanja eritema indeksa kože	/
<b>Brzina sušenja filma</b>	Određivanje vremena sušenja filma na 32°C prema metodi opisanoj u odeljku 3.2.2.2.	5-7 min	<i>In vivo</i> ispitivanje frikcije (delimično)
<b>Širenje FFS na koži / površina filma</b>	Određivanje površine filma prema metodi opisanoj u odeljku 3.2.2.5.	Zavisi od dizajna odabrane ambalaže	/
<b>Mehanička otpornost / fleksibilnost / integritet filma</b>	Prema metodi opisanoj u odeljku 3.2.2.6.	> 50 puta (uvijanja filma)	<i>In vivo</i> ispitivanje frikcije
<b>Debljina filma</b>	Prema metodi opisanoj u odeljku 3.2.2.4.	< 0,05 mm	/
<b>Viskozitet FFS</b>	Reološka karakterizacija	Zavisi od dizajna odabrane ambalaže	/
<b>Metamorfoza / transformacija</b>	<i>In vivo</i> ispitivanje frikcije prema metodi opisanoj u odeljku 3.2.4	Definisanje primarne, sekundarne i tercijernej formulacije	/

Nakon sveobuhvatne analize rezultata dobijenih kroz četiri eksperimentalne faze I-IV: konstruisano je sledeće 'drvo odluke' za lakše definisanje kritičnih atributa kvaliteta koji na najbolji način karakterišu FFS kao inovativne nosače lekova:





*Zaključuje se da uspešna formulacija FFS na bazi polimera namenjena za produženu dermalnu isporuku izabrane model lekovite supstance, odnosno manje frekventnu primenu leka, treba da poseduje sledeća karakteristična svojstva:*

- ◆ *Kratko vreme sušenja na koži;*
- ◆ *Umereno lateralno širenje na koži;*
- ◆ *Optimalnu fleksibilnost u prilagođavanju pokretima kože;*
- ◆ *Visoku supstantivnost;*
- ◆ *Odsustvo lepljivosti;*
- ◆ *Odgovarajuću debljinu filma;*
- ◆ *Dobar integritet filma;*
- ◆ *Određenu i definisanu permeabilnost filma;*
- ◆ *Transparentnost filma;*
- ◆ *Uspešno inkorporiranje lekovite supstance odgovarajućih karakteristika;*
- ◆ *Dobru rastvorljivost lekovite supstance u FF polimeru;*
- ◆ *Homogenost/uniformnost sadržaja;*
- ◆ *Odgovarajuće reološke karakteristike/viskozitet;*
- ◆ *Odgovarajuću pH vrednost;*
- ◆ *Povećanu termodinamičku aktivnost lekovite supstance bez vidljive precipitacije u relevantnom vremenskom periodu nakon primene.*

## 5. ZAKLJUČAK

### Zaključak prve faze eksperimentalnog rada

- ⇒ Tokom prve faze istraživanja u okviru preformulacione studije u kojoj je osmišljeno i dizajnirano ukupno 55 formulacija FFS na bazi hidrofobnih (polimetakrilatnih kopolimera) ili hidrofilnih polimera (hidroksipropil celuloze) ili njihovih kombinacija, na osnovu definisanih kriterijuma navedenih u nastavku, izvršena je selekcija 20 potencijalnih FF formulacija za dermalnu isporuku betametazondipropionata na koži.
- ⇒ Kao ključni parametri za selekciju prospektivnih formulacija u prvom delu preseka prihvaćeni su sledeći: vreme sušenja na sobnoj temperaturi < 60 min, vreme sušenja na temperaturi kože < 15 min, debljina filma < 0,1 mm, fleksibilnost filma < 5 puta i pH u opsegu od 5,5 - 8,5. Ovo je omogućilo racionalno smanjenje broja formulacija na ukupno 20. U drugom delu preseka, ključni parametar za finalnu procenu i krajnji odabir formulacija je bio: fleksibilnost filma < 15 puta. Ovo je omogućilo racionalniju selekciju 6 obećavajućih film-formirajućih formulacija. Izabrane optimalne FF formulacije su u svom sastavu sadržale sledeće polimere: Eudragit® RS PO u koncentraciji od 8,5 %, 10 %, i 17,5 %, Eudragit® NE 30 D u koncentraciji od 6,0 %, i HPC u koncentraciji od 3,5 %, kao i kombinaciju polimera RS/HPC u koncentraciji 4 % / 1 %. Posebno važan aspekt je bio definisanje sadržaja polimera u izabranim formulacijama, pri čemu je kao formulacijski izazov u odnosu na dosadašnje stanje tehnike kao cilj postavljen dizajn formulacije sa nižim sadržajem polimera (< 10 % m/m).
- ⇒ Odabrane formulacije su bile u sledećem obliku: 1. polimerne matrice u obliku rastvora; 2. polimerne matrice u obliku disperzije.
- ⇒ Nakon prve faze eksperimentalnog rada kao rezultat temeljne fizičko-hemijske, mehaničke i senzorne karakterizacije odabrane su **optimalne FF formulacije** sa poželjnim i definisanim fizičko-hemijskim, mehaničkim i senzornim karakteristikama sastavljene od odabranog sistema rastvarača u skladu sa izabranim tipom polimera, uključujući izbor odgovarajućeg plastifikatora i/ili inženjera penetracije.
- ⇒ S obzirom na nedostatak literaturnih podataka o mehaničkim i senzornim svojstvima ispitivanih FFS, prva faza istraživanja je donela **nova saznanja i posebno osmišljene metode karakterizacije u ovom domenu** koje će biti značajne za dalji racionalniji razvoj FFS kao inovativnih nosača lekova.

### Zaključak druge faze eksperimentalnog rada

- ⇒ Nakon završetka druge faze istraživanja, u okviru *in vivo* studije koja je bila podeljena u 3 podjednako važna segmenta ispitivanja, izvršena su merenja i analiza biofizičkih parametara kože (eritema indeksa, TEGV, stepena hidratacije kože i pH vrednosti kože) nakon čega je dobijena potvrda bezbednosnog profila razvijenih FFS na bazi polimera, tj. **odsustvo iritacionog potencijala na koži**, uprkos visokom sadržaju organskih rastvarača.

- ⇒ Angažovanjem i uspostavljanjem potpuno nove *in vivo* metode karakterizacije FFS u okviru tribološke studije, tj. merenjem i analizom frikcionog parametra FFS, a zatim *in situ* filmova u više vremenskih tačaka dobijen je uvid u (i) metamorfozu/transformaciju sistema tokom/nakon primene na kožu, (ii) potencijalne interakcije koje se dešavaju između osetljive sonde uređaja i generisanih filmova, i (iii) postojanost i integritet filma na koži tokom 24 h.
- ⇒ Potpuna i prethodno detaljno osmišljena **tribološka studija** u više vremenskih tačaka omogućila je praćenje značajnih interakcija koje se dešavaju između kože i generisanih filmova, reflektovanih kao ponašanje filma u kontaktu sa osetljivom sondom uređaja Frikciometar, kao i svojstva ovih sistema na koži usled njihove brze transformacije, i to kroz više vremenskih tačaka, obezbeđujući time uvid u kritične karakteristike ovakvih sistema tokom njihovog produženog zadržavanja na koži.
- ⇒ U završnom segmentu druge faze eksperimentalnog rada, testom supstantivnosti kvantifikovan je stepen očekivane prijemčivosti ispitivanih formulacija na koži/za kožu, a formulacije sa najboljim karakteristikama su odabrane za sledeću fazu istraživanja. Iako je najveća supstantivnost uočena kod formulacije izrađene korišćenjem smeše hidrofobnog i hidrofilnog polimera (Eudragit® RS PO i Klucel® u odnosu 4:1, m/m), sve ispitivane FFS odlikuje visoka supstantivnost (između 4,13 % i 6,50 % model aktivne supstance je preneto na odeću ispitanika).
- ⇒ **Potvrdom odsustva iritacije i unapređene supstantivnosti FFS na bazi odabranih polimera** obezbeđen je suštinski preduslov za produženo delovanje razvijenih nosača na koži.

## Zaključak treće faze eksperimentalnog rada

- ⇒ Tokom treće faze istraživanja izvršena je optimizacija postupka izrade FFS sa model lekovitom supstancom BD.
- ⇒ Izvršen je odabir *najoptimalnih FF formulacija* sa model lekovitom supstancom betametazondipropionatom i u skladu sa optimizacijom metode izrade, kao i praćenjem stabilnosti odabranih uzoraka. Kao rezultat, dobijena je potvrda formulacionih faktora koji idu u prilog fizičke mobilizacije BD i formiranja stabilnih topikalnih sistema bez precipitacije lekovite supstance u obrazovanom filmu.
- ⇒ Nakon termalnih i spektroskopskih analiza (DSC i FT-IR) izvršena je sveobuhvatna fizičko-hemijska karakterizacija FFS sa inkorporiranom model lekovitom supstancom BD i dobijen je uvid u potencijalne interakcije koje se dešavaju unutar samih FFS tokom i nakon procesa njihove dinamičke transformacije, odnosno istraživanje je rezultiralo stabilnim FFS sa izabranom model lekovitom supstancom, čijom primenom su obrazovani filmovi odgovarajuće termodinamičke aktivnosti.
- ⇒ Nakon mikroskopskih analiza (optička mikroskopija i AFM) dobijena je potvrda stabilnosti ispitivanih FFS sa BD bez kristalizacije lekovite supstance u formiranom filmu.

- ⇒ Nakon AFM analize dobijen je neposredan uvid u karakterističnu topografiju površine filmova i njihove konformacijske različitosti. Za pojedine uzorke, rezultati AFM su uspješno povezani sa dobijenim biofarmaceutskim performansama.
- ⇒ Na kraju treće faze eksperimentalnog rada, kao rezultat svih angažovanih tehnika: mikroskopije, termalnih i spektroskopskih metoda dobijena je **potvrda formulacionih faktora koji idu u prilog saturaciji BD bez precipitacije u obrazovanom filmu, odnosno približavanje maksimalnoj termodinamičkoj aktivnosti.**
- ⇒ Dodatno, AFM metoda je nagovestila prednost glatkih i tankih filmova u odnosu na filmove sa neravnom površinom.

## Zaključak četvrte faze eksperimentalnog rada

- ⇒ Na samom kraju istraživanja, kao rezultat poslednje faze eksperimentalnog rada dobijena je potvrda *unapređenih biofarmaceutskih performansi FFS* u odnosu na ispitivani referentni preparat (Beloderm<sup>®</sup> mast), tj. značajno poboljšana, kontrolisana, odnosno produžena dermalna isporuka BD iz izabranih FFS čime se omogućuje manja učestalost primene ovakvih preparata, a sam tim je i očekivana povećana aderenza od strane pacijenta.
- ⇒ Formulacija sa polimerom Eudragit<sup>®</sup> NE 30 D inkorporiranim u obliku vodene disperzije (u koncentraciji od 6,0 %) u izabranom sistemu rastvarača sastavljenom od izopropil alkohola i vode pokazala je najveći obim i brzinu permeacije BD.
- ⇒ Formulacija tipa disperzije sa odabranom kombinacijom hidrofobnog (Eudragit<sup>®</sup> RS PO) i hidrofilnog polimera (Klucel<sup>®</sup>) (u koncentraciji od 4%, odnosno 1%, respektivno) pokazala je optimalni potencijal za produženu isporuku model lekovite supstance BD.
- ⇒ Potvrđena je usklađenost sa rezultatima *in vivo* testa supstantivnosti i tribološke studije.
- ⇒ Potvrđena je usklađenost sa rezultatima mehaničkog ispitivanja, pri čemu je optimalna permeacija uočena kod filmova koji su pokazali najveću fleksibilnost na koži tj. filmova sa prisustvom plastifikatora kao i dodatog surfaktanta (polisorbata 80). Sa druge strane, najbolja permeacija uočena je kod filma sa najnižom mehaničkom otpornošću (56 puta) u odnosu na ostale ispitivane filmove.
- ⇒ Potvrđena je korelacija sa rezultatima fizičko-hemijskog i senzornog profilisanja iz prve faze eksperimentalnog rada.
- ⇒ Potvrđena je povezanost reoloških parametara (viskoziteta FFS) i bioadhezivnosti filmova na koži.
- ⇒ Praćen je i analiziran efekat varijabli koje utiču na povećanu i produženu dermalnu isporuku kortikosteroida u/kroz kožu: karakteristike izabranog tipa polimera i/ili kombinacija polimera u sastavu FFS, koncentracija korišćenog/korišćenih polimera, rastvorljivost i koncentracija lekovite supstance BD u polimernom matriksu, tip i koncentracija izabranog tipa plastifikatora i/ili prisustvo ili odsustvo inhensera penetracije.

- ⇒ Nakon četvrte faze eksperimentalnog rada uspostavljena je analiza kritičnih atributa kvaliteta koje treba pratiti kako bi se detektovale eventualno prisutne razlike u mikrostrukturi filmova, tehnike koje treba koristiti za merenje odabranih kritičnih atributa kvaliteta, kako treba interpretirati dobijene rezultate i korelirati promene u kritičnim atributima kvaliteta sa odgovarajućim promenama u relevantnim biofarmaceutskim parametrima.
- ⇒ S obzirom na sastav FFS i specifične senzorne, fizičko-hemijske i mehaničke karakteristike, potvrđena je prednost njihove upotrebe kao nosača slabo rastvornih, lipofilnih lekovitih supstanci (poput steroidne antiinflamatorne lekovite supstance betametazondipropionata) u odnosu na konvencionalne polučvrste preparate tipa masti. Praćenjem osmišljenog 'algoritma odluke' (i tabele 4.4.2.) definisan je racionalni set kritičnih atributa kvaliteta FFS direktno relevantnih i za postizanje željene dermalne isporuke kortikosteroida u dublje slojeve kože, što je od izuzetne važnosti u terapiji hroničnih kožnih oboljenja (posebno psorijaze).

## 6. REFERENCE

- Acrux (2007). Acrux delivers on male testosterone lotion. Available online: <https://www.eurekalert.org/news-releases/763653> (pristupljeno 20.07.2022).
- Alanazi FK, Abdel Rahman AA, Mahrous GM, Alsarra IA. (2007). Formulation and physicochemical characterisation of buccoadhesive films containing ketorolac. *J. Drug Deliv. Sci. Techn.* 17 (3): 183–192.
- Alberti I, Grenier A, Kraus H, Carrara DN. (2005). Pharmaceutical development and clinical effectiveness of a novel gel technology for transdermal drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2: 935–950.
- Alexander A, Dwivedi S, Ajazuddin, Giri TK, Saraf S, Saraf S, Tripathi DK. (2012). Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *J. Control. Release* 164 (1): 26–40.
- Al-Obaidi H, Buckton G. (2009). Evaluation of griseofulvin binary and ternary solid dispersions with HPMCAS. *AAPS PharmSciTech.* 10 (4): 1172–1177.
- Al-Obaidi H, Lawrence MJ, Shah S, Moghul H, Al-Saden N, Bari F. (2013). Effect of drug–polymer interactions on the aqueous solubility of milled solid dispersions. *Int. J. Pharm.* 446 (1–2): 100–105.
- Altmann K, Schulze RD, Friedrich J. (2014). Polymer deposition morphology by electrospray deposition – Modifications through distance variation. *Thin Solid Films.* 564: 269–276.
- Ammar HO, Ghorab M, El-Nahhas SA, Kamel R. (2009). Polymeric Matrix System for prolonged delivery of tramadol hydrochloride, Part II: Biological Evaluation. *AAPS PharmSciTech.* 10 (3): 1065–1070.
- Ammar HO, Ghorab M, Mahmoud AA, Makram TS, Ghoneim AM. (2013). Rapid pain relief using film forming polymeric solution of ketorolac. *Pharm. Dev. Technol.* 18 (5): 1005–1016.
- Aqil M, Ali A, Sultana Y, Najmi AK. (2004). Fabrication and evaluation of polymeric films for transdermal delivery of pinacidil. *Pharmazie* 59 (8): 631–635.
- Asasutjarit R, Sookdee P, Veeranondha S, Fuongfuchat A, Itharat A. (2020). Application of film-forming solution as a transdermal delivery system of piperine-rich herbal mixture extract for anti-inflammation. *Heliyon.* 6 (6): e04139.
- ASTM (2017). American Society for Testing and Materials. D3359-17 Standard Test Methods for Measuring Adhesion by Tape Test. West Conshohocken: ASTM International.
- ASTM (2018). American Society for Testing and Materials. D523-14 Standard Test Method for Specular Gloss. West Conshohocken: ASTM International.
- ASTM (2020). American Society for Testing and Materials. D1005-95 Standard Test Method for Measurement of Dry-Film Thickness of Organic Coatings Using Micrometers. West Conshohocken: ASTM International.
- Axiron® (Testosterone) Pump Applicator, Axiron® (Testosterone) Twist Applicator. Available online: <https://www.lilly.com/products/historic-products> (pristupljeno 23.02.2018.)
- Bakshi A, Bajaj A, Malhotra G, Madan M, Amrutiya N, Bakshi A. (2008). A novel metered dose transdermal spray formulation for oxybutynin. *Indian J. Pharm. Sci.* 70: 733–739.
- Balać I, Bugarski B, Ćosić I, Dramićanin M, Đorđević D, Filipović N, Ignjatović N, Janačković Đ, Kojić M, Manojlović V, Marković Z, Obradović B, Lijaković IP, Pavlović M, Plavšić M, Ranković V, Stojanović B, Trajković V, Uskoković D, Uskoković P, Veljković D, Vlastelica I, Novaković GV. ured. Raković D, Uskoković D. Beograd (2010). Institut tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti: Društvo za istraživanje materijala. *Biomaterijali. Savremeni biomaterijali i tehnologije:* 567- 679.
- Battacharjee S, Nagalakshmi S, Shanmuganathan S. (2014). Design, development and evaluation of mucoadhesive film for water insoluble drug using different plasticizers. *Int. J. Pharm. Sci.* 6 (3): 107–110.

- Beloderm<sup>®</sup>, 0,5 mg/g, mast, uputstvo za lek, <https://www.alims.gov.rs/ciril/files/lekovi/pil/515-0100838-17-001.pdf> (pristupljeno 15.09.2020.).
- Berkenkemper S, Keizer HL, Lindenberg M, Szepes A, Kleinebudde P. (2020). Functionality of disintegrants with different mechanisms after roll compaction. *Int. J. Pharm.* 584: 119434.
- Betamethasone dipropionate [PubChem Document] (2021). Available at <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Betamethasone-dipropionate> (pristupljeno 23. 10. 2021.).
- Boateng JS, Matthews KH, Stevens HNE, Eccleston GM. (2008). Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *J. Pharm. Sci.* 97: 2892-2923.
- Bodratti A, Alexandridis P. (2018). Amphiphilic block copolymers in drug delivery: advances in formulation structure and performance. *Expert Opin. Drug Deliv.* 15 (11): 1085–1104.
- Brazzini B, Pimpinelli N. (2002). New and established topical corticosteroids in dermatology. Clinical pharmacology and therapeutic use. *Am. J. Clin. Dermatol.* 3 (1): 47–58.
- Briddick A, Li P, Hughes A, Courchay F, Martinez A, Thompson RL. (2016). Surfactant and plasticizer segregation in thin poly(vinyl alcohol) films. *Langmuir.* 32(3): 864–872.
- Brouwers J, Brewster ME, Augustijns P. (2009). Supersaturating Drug Delivery Systems: The Answer to Solubility-Limited Oral Bioavailability. *J Pharm Sci.* 98(8): 2549–2572.
- Bucher KE, Walz D. (1979). Irritant actions of unphysiological pH values. A controlled procedure to test for topical irritancy. *Agents Actions*, 9: 124–132.
- Buechler CR, Veenstra J, Stein Gold L. (2021). New topical therapies for psoriasis. *Dermatol. Rev.* 2: 262–268.
- Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. (2018). The human skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 16 (3): 143–155.
- Callis KP, Krueger GG. (2003). Topical agents in the treatment of moderate to severe psoriasis. In: Freeberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, editors. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. New York: McGraw-Hill, 29–51.
- Carrer V, Alonso C, Pont M, Zanuy M, Córdoba M, Espinosa S, Barba C. (2020). Effect of propylene glycol on the skin penetration of drugs. *Arch. Dermatol. Res.* 312: 337–352.
- Casiraghi A, Minghetti P, Cilurzo F, Montanari L, Naik A. (2002). Occlusive properties of monolayer patches: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Pharm. Research.* 19: 423-426.
- Chatelain E, Gabard B, Surber C. (2003). Skin penetration and sun protection factor of five UV filters: effect of the vehicle. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 16 (1): 28–35.
- Cilurzo F, Selmin F, Gennari CG, Montanari L, Minghetti P. (2014). Application of methyl methacrylate copolymers to the development of transdermal or loco-regional drug delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* 11 (7): 1033-1045.
- Danby SG, Draelos ZD, Gold LFS, Cha A, Vlahos B, Aikman L, Sanders P, Wu-Linhares D, Cork MJ. (2020). Vehicles for atopic dermatitis therapies: more than just a placebo. *J. Dermatolog. Treat.* 16: 1–14.
- Dashevsky A, Kolter K, Bodmeier R. (2004). Compression of pellets coated with various aqueous polymer dispersions. *Int. J. Pharm.* 279: 19–26.
- de Melo MO, Maia Campos PMBG. (2019). Application of biophysical and skin imaging techniques to evaluate the film-forming effect of cosmetic formulations. *Int. J. Cosmet. Sci.* 41 (6): 579–584.
- de Oliveira FFD, de Menezes LR, Tavares MIB. (2020). Film-Forming Systems in Topically Administered Pharmaceutical Formulations. *Material Sciences and Application*, 11 (08): 576–590.
- de Paula E, Cereda C, Tofoli GR, Franz-Montan M, Fraceto LF, de Araújo DR. (2010). Drug Delivery Systems for Local Anesthetics. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* 4: 23–34.
- Desai KG, Mallery SR, Holpuch AS, Schwendeman SP. (2011). Development and *in vitro-in vivo* evaluation of fenretinide-loaded oral mucoadhesive patches for site-specific chemoprevention of oral cancer. *Pharm. Res.* 28 (10): 2599–2609.



- du Plessis J, Stefaniak A, Eloff F, John S, Agner T, Chou TC, Nixon R, Steiner M, Franken A, Kudla I, Holness L. (2013). International guidelines for the in vivo assessment of skin properties in non-clinical settings: Part 2. transepidermal water loss and skin hydration. *Skin Res. Technol.* 19 (3): 265–278.
- DuraPeel. Available online: <http://www.crescitatherapeutics.com/technology/durapeel/> (pristupljeno 25. 03. 2019.).
- Edwards A, Qi S, Liu F, Brown MB, McAuley WJ. (2017). Rationalising polymer selection for supersaturated film forming systems produced by an aerosol spray for the transdermal delivery of methylphenidate. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 114: 164–174.
- Elenkov IJ, Chrousos GP. (2002). Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines and autoimmunity. *Ann. NY Acad. Sci.* 966: 290–303.
- Elias PM. (1983). Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J. Inv. Dermatol.* 80: 44-49.
- EMA (2014). Guideline on quality of transdermal patches. European Medicine Agency. Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP/QWP/608924/2014). Oktobar 2014.
- EMA (2018). European Medicines Agency. CHMP/QWP/708282/2018 Draft guideline on quality and equivalence of topical products. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP).
- EMC (2022). Medicinal product Lenzetto 1,53 mg/spray, transdermal spray, solution. Available online: <https://www.medicines.org.uk/emc/product/11175/smpc#gref> (pristupljeno 11.07.2022).
- Eouani C, Piccerelle P, Prinderre P, Bourret E, Joachim J. (2001). In-vitro comparative study of buccal mucoadhesive performance of different polymeric films. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52 (1): 45–55.
- European Patent Publication EP 3 200 748 B1 (27.10.2021). Compositions and methods for the treatment and prophylaxis of surgical site infections: 1-38.
- European Pharmacopeia (Ph.Eur.) 10th Edition, Council of Europe, Strasbourg, France (2019).
- Evans RM. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889–895.
- Evonik industries. (2007). EUDRAGIT® NM 30 D [WWW Document]. URL <http://eudragit.evonik.com/product/eudragit/en/productservices/eudragitproducts/sustained-release-formulations/nm-30-d/pages/default.aspx> (pristupljeno 3.4.16).
- Evonik industries. (2016). Eudragit® Application Guidelines, 12th Edition, Online version. Available at [www.eudragit.com/e-lab](http://www.eudragit.com/e-lab) (pristupljeno 3.4.2016.).
- Fahier J. (2016). Polymeric controlled release film coatings. Human health and pathology. Université du Droit et de la Santé - Lille II. English. NNT: 2016LIL2S025.
- Fantini A, Padula C, Nicoli S, Pescina S, Santi P. (2019). The role of vehicle metamorphosis on triamcinolone acetonide delivery to the skin from microemulsions. *Int. J. Pharm.* 565: 33–40.
- Feldman SR, Fleischer AB Jr, Cooper JZ. (2000). New topical treatment changes the pattern of treatment of psoriasis: dermatologists remain the primary providers of this care. *Int. J. Dermatol.* 39: 41–44.
- Felton LA, Baca ML. (2001). Influence of curing on the adhesive and mechanical properties of an applied acrylic polymer. *Pharm. Dev. Technol.* 6 (1): 1–9.
- Felton LA. (2013). Mechanisms of polymeric film formation. *Int. J. Pharm.* 457 (2): 423-427.
- Flaten GE, Palac Z, Engesland A, Filipović-Grčić J, Vanić Ž, Škalko-Basnet N. In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. *Eur J Pharm Sci.* 2015;75:10-24.
- Fraser IS, Weisberg E, Kumar N, Kumar S, Humberstone AJ, McCrossin L, Shaw D, Tsong YY, Sitruk-Ware R. (2007). An initial pharmacokinetic study with a Metered Dose Transdermal System® for delivery of the progestogen Nestorone® as a possible future contraceptive. *Contraception* 76: 432-438.

- Frederiksen K, Guy RH, Petersson K. (2015). Formulation considerations in the design of topical, polymeric film-forming systems for sustained drug delivery to the skin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 91: 9–15.
- Frederiksen K, Guy RH, Petersson K. (2016). The potential of polymeric film-forming systems as sustained delivery platforms for topical drugs. *Expert Opin. Drug Deliv.* 13 (3): 349–360.
- Fujimori J, Yonemochi E, Fukuoka E, Terada K. (2002). Application of Eudragit RS to Thermo-Sensitive Drug Delivery Systems. I. Thermo-Sensitive Drug Release from Acetaminophen Matrix Tablets Consisting of Eudragit RS/PEG 400 Blend Polymers. *Chem. Pharm. Bull.* 50 (3): 408–412.
- Fullerton A, Fischer T, Lahti A, Wilhelm KP, Takiwaki H, Serup J. (1996). Guidelines for measurement of skin colour and erythema. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis* 35 (1): 1-10.
- García-Couce J, Vernhes M, Bada N, Agüero L, Valdés O, Alvarez-Barreto J, Fuentes G, Almirall A, Cruz LJ. (2021). Synthesis and Evaluation of AlgNa-g-Poly(QCL-co-HEMA) Hydrogels as Platform for Chondrocyte Proliferation and Controlled Release of Betamethasone. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 5730.
- Garvie-Cook H, Frederiksen K, Petersson K, Guy RH, Gordeev S. (2015). Characterization of topical film-forming systems using Atomic Force Microscopy and Raman Microspectroscopy. *Mol. Pharm.* 12 (3): 751–757.
- Gennari C, Selmin F, Franzè S, Musazzi UM, Quaroni GMG, Casiraghi A, Cilurzo F. (2017). A glimpse in critical attributes to design cutaneous film forming systems based on ammonium methacrylate. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 41: 157–163.
- Gennari CGM, Selmin F, Minghetti P, Cilurzo F. (2019). Medicated foams and film forming dosage forms as tools to improve the thermodynamic activity of drugs to be administered through the skin. *Curr. Drug Deliv.* 16 (5): 461-471.
- Gennari CGM, Selmin F, Ortenzi MA, Franzè S, Musazzi UM, Casiraghi A, Minghetti P, Cilurzo F. (2006). *In situ* film forming fibroin gel intended for cutaneous administration. *Int. J. Pharm.* 511: 296–302.
- Ghoshal S, Denner P, Stapf S, Mattea C. (2012). Study of the formation of poly (vinyl alcohol) films. *Macromolecules*, 45 (4): 1913–1923.
- Gohel MC, Nagori SA. (2009). Fabrication of modified transport fluconazole transdermal spray containing ethyl cellulose and Eudragit RS 100 as film formers. *AAPS PharmSciTech.* 10 (2): 684–691.
- Gore E, Picard C, Savary G. (2018). Spreading behavior of cosmetic emulsions: impact of oil phase. *Biotribology*, 16: 17–24.
- Gore E, Picard C, Savary G. (2020). Complementary approaches to understand the spreading behavior on skin of O/W emulsions containing different emollients. *Colloids Surf. B.* 193: 111132.
- Govedarica B, Baumgartner S, Teskač K, Dolenc A, Kristl J, Srčič S. (2010). Mikroskopija atomskih sila - novi način analize i karakterizacije farmaceutskih materijala. *Tehnika-Novi materijali.* 19 (1): 3-8.
- Guo R, Du X, Zhang R, Deng L, Dong A, Zhang J. (2011). Bioadhesive film formed from a novel organic–inorganic hybrid gel for transdermal drug delivery system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79 (3): 574–583.
- Gupta A, Kowalczyk M, Heaselgrave W, Britland ST, Martin C, Radecka I. (2019). The production and application of hydrogels for wound management: A review. *Eur. Polym. J.* 111: 134–151.
- Guy RH, Hadgraft J. (1985). Transdermal drug delivery: A simplified pharmacokinetic approach. *Int. J. Pharm.* 24: 267–274.

- Handbook of Pharmaceutical Excipients. (2016). Sheskey PJ, Cook WG, Cable CG. (Eds.) London: Pharmaceutical Press. Available at [www.medicinescomplete.com/mc/excipients/current/](http://www.medicinescomplete.com/mc/excipients/current/) (pristupljeno 20.10. 2016).
- Hanna PA, Ghorab, MM, Gad S. (2019). Development of betamethasone dipropionate-loaded nanostructured lipid carriers for topical and transdermal delivery. *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.* 18: 26–44.
- Hearnden V, Sankar V, Hull K, Juras DV, Greenberg M, Kerr AR, Lockhart PB, Patton PL, Porter S, Thornhill MH. (2012). New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (1): 16–28.
- Heck R, Hermann S, Lunter DJ, Daniels R. (2016). Film-forming formulations containing porous silica for the sustained delivery of actives to the skin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 108: 1–8.
- Heck R, Lukić MŽ, Savić SD, Daniels R, Lunter DJ. (2017). Ex vivo skin permeation and penetration of nonivamide from and in vivo skin tolerability of film-forming formulations containing porous silica. *Eur. J. Pharm. Sci.* 106: 34–40.
- Herrmann S, Daniels R, Lunter D. (2017). Methods for the determination of the substantivity of topical formulations. *Pharm. Dev. Technol.* 22 (4): 487–491.
- Hifumi H, Ewing AV, Kazarian SG. (2016). ATR-FTIR spectroscopic imaging to study the drying and dissolution of pharmaceutical polymer-based films. *Int. J. Pharm.* 515: 57–68.
- Hydroxypropyl cellulose. (2022). Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Available online at <https://www.sigmaaldrich.com/NL/en/product/aldrich/435007> (pristupljeno 20.07.2022).
- Ilić T. (2019). Mikro- i nanostrukturirani emulzioni sistemi na bazi polihidroksilnih surfaktanata za isporuku aceklofenaka u/kroz kožu primenom hemijskih pojačivača penetracije i mikroigala. Doktorska disertacija. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu.
- ISO (2014). International Organization for Standardization. 2813:2014 Paints and Varnishes - Determination of gloss value at 20°, 60°, and 85°. 4th ed. Geneva: International Organization for Standardization: 1–23.
- Jenquin MR, Liebowitz SM, Sarabia RE, McGinity JW. (1990). Physical and chemical factors influencing the release of drugs from acrylic resin films. *J. Pharm. Sci.* 79: 811–816.
- Jug B, Bećirević-Laćan M, Bengez S.(2009). Novel cyclodextrin-based film formulation intended for buccal delivery of atenolol. *Drug Develop. Ind. Pharm.* 35 (7): 796–807.
- Kathe K, Kathpalia H. (2017). Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. *Asian J. Pharm. Sci.* 12: 487-497.
- Kessler V, Angel M, Mathauer, K. (2016). Water-Resistant Cosmetic Formulations Comprising a Hydrophobically Modified Vinylpyrrolidone Copolymer. US Patent No. 9,364,418 B2: 1–33.
- Kianfar F, Chowdhry BZ, Antonijevic MD; Boateng JS. (2012). Novel films for drug delivery via the buccal mucosa using model soluble and insoluble drugs. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 38 (10): 1207–1220.
- Kienzler JL, Queille-Roussel C, Mugglestone CJ, Ortonne JP, Lauroba J. (2007). Stratum corneum pharmacokinetics of the anti-fungal drug, terbinafine, in a novel topical formulation, for single-dose application in dermatophytoses. *Curr. Med. Res. Opin.* 23 (6): 1293-1302.
- Kircik L, Okumu F, Kandavilli S, Sugarman J. (2017). Rational vehicle design ensures targeted cutaneous steroid delivery. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 10 (2): 12–19.
- Kis N, Kovács A, Budai-Szűcs M, Gácsi A, Csányi E, Csóka I, Berkó S. (2019). Investigation of silicone-containing semisolid in situ film-forming systems using QbD tools. *Pharmaceutics* 11: 660.
- Klucel™ hydroxypropylcellulose. (2017). Physical and chemical properties. [https://www.ashland.com/file\\_source/Ashland/Product/Documents/Pharmaceutical/PC\\_112\\_29\\_Klucel\\_HPC.pdf](https://www.ashland.com/file_source/Ashland/Product/Documents/Pharmaceutical/PC_112_29_Klucel_HPC.pdf) (pristupljeno 29.07.2022).

- Kovács A, Kis N, Budai-Szűcs M, Gácsi A, Csányi E, Csóka I, Berkó S. (2020). QbD-Based Investigation of Dermal Semisolid in situ Film-Forming Systems for Local Anaesthesia. *Drug Des. Devel. Ther.* 14: 5059–5076.
- Krstić M, Manić L, Martić N, Vasiljević D, Mračević SD, Vukmirović S, Rašković A. (2020). Binary polymeric amorphous carvedilol solid dispersions: In vitro and in vivo characterization. *Eur. J. Pharm. Sci.* 150: 105343.
- Krull SM, Susarla R, Afolabi A, Li M, Ying Y, Iqbal Z, Bilgili E, Davé RN. (2015). Polymer strip films as a robust, surfactant-free platform for delivery of BCS class II drug nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 489 (1-2): 45–57.
- Kuo SH, Shen CJ, Shen CF, Cheng CM. (2020). Role of pH Value in Clinically Relevant Diagnosis. *Diagnostics*, 10 (2): 107.
- Lamisil® Once, sažetak karakteristika leka, <https://www.alims.gov.rs/ciril/files/lekovi/smpc/515-0107523-13-001.pdf> (pristupljeno 15.09.2020.).
- Lecomte F, Siepmann, J, Walther M, MacRae RJ, Bodmeier R. (2004). Polymer blends used for the aqueous coating of solid dosage forms: importance of the type of plasticizer. *J. Control. Release* 99: 1–13.
- Lee PI, Li JX. (2010). Chapter 2: Evolution of oral controlled release dosage forms, In: Hong W, Kinam P. (Eds.). *Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery Theory to Practice*. London: John Wiley & Sons: 21–31.
- Li X, Zhang R, Liang R, Liu W, Wang C, Su Z, Sun F, Li Y. (2014). Preparation and characterization of sustained-release rotigotine film-forming gel. *Int. J. Pharm.* 460 (1–2): 273–279.
- Lim H, Hoag SW. (2013). Plasticizer effects on physical-mechanical properties of solvent cast soluplus films. *AAPS PharmSciTech.* 14 (3): 903–910.
- Lippold BC, Gunder W, Lippold H. (1999). Drug release from diffusion pellets coated with the aqueous ethyl cellulose dispersion aquacoat® ECD-30 and 20 % Dibutyl Sebacate as plasticizer: partition mechanism and pore diffusion 47: 27–32.
- Lippold BC, Lippold BH, Sutter BK, Gunder W. (1990). Properties of Aqueous, Plasticizer-Containing Ethyl Cellulose Dispersions and Prepared Films in Respect to the Production of Oral Extended Release Formulations. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 16: 1725–1747.
- Liqui Patch Platform Technology. Available online: <https://epinamics.com/the-liqui-patch> (pristupljeno 5.05. 2021.)
- Liu X, Fu L, Dai W, Liu W, Zhao J, Wu Y, Teng L, Sun F, Li Y. (2014). Design of transparent film-forming hydrogels of tolterodine and their effects on stratum corneum. *Int. J. Pharm.* 471: 322–331.
- Lu W, Luo H, Wu Y. (2013). Preparation and characterization of a metered dose transdermal spray for testosterone. *Acta Pharm. Sin. B.* 3 (6): 392–399.
- Lunter DJ, Daniels R. (2012). New film forming emulsions containing eudragit NE and/or RS 30D for sustained dermal delivery of nonivamide. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 82 (2): 291–298.
- Lunter DJ, Daniels R. (2013). In vitro skin permeation and penetration of nonivamide from novel film-forming emulsions. *Skin Pharmacol. Physiol.* 26 (3): 139–146.
- Lunter DJ, Rottke M, Daniels R. (2014). Oil in oil emulsions with enhanced substantivity for the treatment of chronic skin diseases. *J. Pharm. Sci.* 103 (5): 1515–1519.
- Mahnaj T, Ahmed SU, Plakogiannis FM. (2011). Evaluating the efficacy of a group of nontraditional plasticizers on the glass transition temperature of ethyl cellulose polymer. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 37 (3): 342–350.
- Malik DS, Mital N, Kaur G. (2016). Topical Drug Delivery Systems: A Patent Review. *Exp. Opin. Therapeut. Pat.* 26: 213–228.
- Matousek JL, Campbell KL, Kakoma I, Solter PF, Schaeffer, D. (2003). Evaluation of the effect of pH on in vitro growth of *Malassezia pachydermatis*. *Can. J. Vet. Res. Rev.* 67: 56–59.

- MedSpray® Available online: <https://www.medpharm.com/en/medspray/> (pristupljeno 05.05.2021.).
- Merck Index. 2001. Thirteenth edition. Merck & Co. Inc. Whitehouse Station NJ, USA.
- Minghetti P, Cilurzo F, Montanari L. (1999). Evaluation of adhesive properties of patches based on acrylic matrices. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25: 1–6.
- Misra A, Raghuvanshi RS, Ganga S, Diwan M, Talwar GP, Singh O. (1996). Formulation of a transdermal system for biphasic delivery of testosterone. *J. Control. Release* 39: 1-7.
- Mojumdar EH, Pham QD, Topgaard D, Sparr E. (2017). Skin hydration: interplay between molecular dynamics, structure and water uptake in the stratum corneum. *Sci. Rep.* 7 (1): 15712.
- Monica LL, Jordi G, Francisco FC. (2020). In situ bioadhesive film-forming system for topical delivery of mometasone furoate: Characterization and biopharmaceutical properties. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 59: 101852.
- Mori NM, Patel P, Sheth N, Rathod LV, Ashara KC. (2017). Fabrication and characterization of film-forming voriconazole transdermal spray for the treatment of fungal infection. *Bull. Fac. Pharmacy, Cairo University*, 55 (1): 41–51.
- Nanosurf. Topography and surface roughness measurements. Available online: <https://www.nanosurf.com/en/support/afm-modes-overview/topography-and-surface-roughness-measurements> (pristupljeno 20.09.2021.)
- OECD (2003). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. Series on Testing Assessment 28.
- OECD (2004). Guidance document for the conduct of skin absorption studies. Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 28, 1–31. Pariz, Francuska.
- OECD (2019). Guidance notes on dermal absorption (Draft Second Edition). Series on Testing and Assessment No. 156: 1–63.
- Oh DW, Kang JH, Lee HJ, Han SD, Kang MH, Kwon YH, Jun JH, Kim DW, Rhee YS, Kim JY, Park ES, Park CW. (2017). Formulation and in vitro/in vivo evaluation of chitosan-based film forming gel containing ketoprofen. *Drug Deliv.* 24 (1): 1056–1066.
- Otto A, du Plessis J, Wiechers JW. (2009). Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *Int. J. Cosmet. Sci.* 31: 1–19.
- Ovington LG. (2007). Advances in wound dressings. *Clinics in Dermatol.* 25: 33–38.
- Padula C, Colombo G, Nicoli S, Catellani PL, Massimo G, Santi P. (2003). Bioadhesive film for the transdermal delivery of lidocaine: In vitro and in vivo behavior. *J. Control. Release.* 88: 277–285.
- Padula C, Nicoli S, Colombo P, Santi P. (2007). Single-layer transdermal film containing lidocaine: Modulation of drug release. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66: 422–428.
- Paillet-Mattei C, Nicoli S, Piro F, Vargiolu R, Zahouani H. (2009). A new approach to describe the skin surface physical properties in vivo. *Colloids Surf. B.* 68 (2): 200–206.
- Pantelić I. (2013). Dermalna raspoloživost lekova sa antiinflamatornim delovanjem iz podloga sa šećernim emulgatorom: komparativna primena metoda *in vitro/in vivo* karakterizacije. Doktorska disertacija. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu.
- Paradkar M, Thakkar V, Soni T, Gandhi T, Gohel M. (2015). Formulation and evaluation of clotrimazole transdermal spray. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 41 (10): 1718–1725.
- Parhi R, Goli VVN. (2020). Design and optimization of film-forming gel of etoricoxib using research surface methodology. *Drug Deliv. Transl. Res.* 10: 498–514.
- Parhi R, Swain S. (2018). Transdermal Evaporation Drug Delivery System: Concept to Commercial Products. *Adv Pharm Bull* 8(4): 535–550.
- Pastore MN, Kalia YN, Horstmann M, Roberts MS. (2015). Transdermal patches: History, development and pharmacology. *Br. J. Pharmacol.* 172 (9): 2179–2209.



- Patel S, Srivastava S, Singh MR, Singh D. (2018). Preparation and optimization of chitosan-gelatin films for sustained delivery of lupeol for wound healing. *Int. J. Biol. Macromol.* 107: 1888–1897.
- Patra CN, Priya R, Swain S, Kumar Jena G, Panigrahi KC, Ghose D. (2017). Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. *Future J. Pharm. Sci.* 3 (1): 33–45.
- Peppas NA, Buri PA. (1985). Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. *J. Control. Release* 2: 257–275.
- Pignatello R, Bucolo C, Puglisi G. (2002). Ocular tolerability of Eudragit RS 100® and RL 100® nanosuspensions as carriers for ophthalmic controlled drug delivery. *J. Pharm. Sci.* 91 (12): 2636–2641.
- Prodduturi S, Manek RV, Kolling WM, Stodghill SP, Repka MA. (2004). Water vapor sorption of hot-melt extruded hydroxypropyl cellulose films: Effect on physico-mechanical properties, release characteristics, and stability. *J. Pharm. Sci.* 93 (12): 3047–3056.
- Pünnel LC, Lunter DJ. (2021). Film-Forming Systems for Dermal Drug Delivery. *Pharmaceutics.* 13, 932.
- Ranade S, Bajaj A, Londhe V, Babul N, Kao D. (2017). Fabrication of topical metered dose film forming sprays for pain management. *Eur. J. Pharm. Sci.* 100: 132–141.
- Rao SB, Sharma CP. (1997). Use of chitosan as biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *J. Biomed. Mater. Res.* 34: 21–28.
- Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. (2004). *Biomaterial Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 2nd Edition, Elsevier Academic Press: 345–354.
- Recuvyra authorisation information. (2017). Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/recuvyra#authorisation-details-section> (pristupljeno 21.07.2022).
- Recuvyra product information. (2017). Available online: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/recuvyra-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/recuvyra-epar-product-information_en.pdf) (pristupljeno 21.07.2022).
- Reid ML, Benaouda F, Khengar R, Jones SA, Brown MB. (2013). Topical corticosteroid delivery into human skin using hydrofluoroalkane metered dose aerosol sprays. *Int. J. Pharm.* 452 (1–2): 157–165.
- Rottke M, Lunter DJ, Daniels R. (2014). In vitro studies on release and skin permeation of nonivamide from oil-in-oil-emulsions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 86 (2): 260–266.
- Sanchez-Ballester NM, Bataille B, Benabbas R, Alonso B, Soulaïrol I. (2020). Development of alginate esters as novel multifunctional excipients for direct compression. *Carbohydr. Polym.* 240:116280.
- Savary G, Gilbert L, Grisel M, Picard C. (2019). Instrumental and sensory methodologies to characterize the residual film of topical products applied to skin. *Skin Res. Technol.* 25: 415–423.
- Savić S, Vuleta G. (2008). Penetracija i permeacija kortikosteroida iz farmaceutskih preparata za primenu na kožu. *Arh.farm.* 58: 153–171.
- Schmidberger M, Nikolic I, Pantelic I, Lunter D. (2019). Optimization of Rheological Behaviour and Skin Penetration of Thermogelling Emulsions with Enhanced Substantivity for Potential Application in Treatment of Chronic Skin Diseases. *Pharmaceutics*, 11(8): 361.
- Schroeder IZ, Franke P, Schaefer UF, Lehr CM. (2007a). Development and characterization of film forming polymeric solutions for skin drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 65 (1): 111–121.
- Schroeder IZ, Franke P, Schaefer UF. (2007b). Delivery of ethinylestradiol from film forming polymeric solutions across human epidermis *in vitro* and *in vivo* in pigs. *J. Control. Release* 118 (2): 196–203.

- Selzer D, Abdel-Mottaleb MM, Hahn T, Schaefer UF, Neumann D. (2013). Finite and infinite dosing: difficulties in measurements, evaluations and predictions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65: 278–294.
- Siepmann F, Siepmann J, Walther M, MacRae RJ, Bodmeier R. (2008). Polymer blends for controlled release coatings. *J Control. Release.* 125: 1–15.
- Siepmann J, Siepmann F. (2012). Modeling of diffusion controlled drug delivery. *J. Control. Release* 161 (2): 351–362.
- Singh Malik D, Mital N, Kaur G. (2016). Topical Drug Delivery Systems: A Patent Review. *Exp. Opin. Therap. Patents* 26: 213–228.
- Skalsky B, Petereit HU. (2008). Chemistry and application properties of polymethacrylate systems, In: McGinity JW, Felton LA. (Eds.), *Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms*. New York: CRC Press, 237–277.
- Sritharadol R, Nakpheng T, Heng PWS, Srichana T. (2017). Development of a topical mupirocin spray for antibacterial and wound-healing applications. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 43 (10): 1715–1728.
- Steward PA, Hearn J, Wilkinson MC. (2000). An overview of polymer latex film formation and properties. *Adv. Colloid Interface Sci.* 86 (3): 195–267.
- Subedi RK, Oh SY, Chun MK, Chun M-W, Choi H-K. (2010). Recent advances in transdermal drug delivery. *Arch. Pharm. Res.* 33 (3): 339–351.
- Surber C, Knie U. (2018). Metamorphosis of Vehicles: Mechanisms and Opportunities. In: Surber C, Abels C, Maibach H. (Eds.) *pH of the Skin: Issues and Challenges*. Basel: Karger, 152–165.
- Surber C, Tassopoulos T, Smith EW. (2001). Ointments, creams and lotions used as topical drug delivery vehicles. In: Bronaugh R, Maibach H, (Eds.) *Topical absorption of dermatological products*. New York: Marcel Dekker, 511–517.
- Tran TTD, Tran PHL. (2017). Perspectives on Strategies Using Swellable Polymers in Solid Dispersions for Controlled Drug Release. *Curr. Pharm. Des.* 23: 1639–1648.
- Tran TTD, Tran PHL. (2019). Controlled Release Film Forming Systems in Drug Delivery: The Potential for Efficient Drug Delivery. *Pharmaceutics* 11 (6): 290.
- Tran TTD, Tran PHL. (2020). Molecular Interactions in Solid Dispersions of Poorly Water-Soluble Drugs. *Pharmaceutics* 12 (8): 745.
- Umar AK, Butarbutar M, Sriwidodo S, Wathoni N. (2020). Film-forming sprays for topical drug delivery. *Drug Des. Dev. Ther.* 14: 2909–2925.
- USP, United States Pharmacopeia 44th Edition, The United States Pharmacopeia Convention 2021.
- Valencia IC, Kerdel FA. (2003). Topical glucocorticoids. In: Freeberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI. (Eds.) *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. New York: McGraw-Hill, 2324–2328.
- van der Merwe J, Steenekamp J, Steyn D, Hamman J. (2020). The Role of Functional Excipients in Solid Oral Dosage Forms to Overcome Poor Drug Dissolution and Bioavailability. *Pharmaceutics* 12: 393.
- Vanderhoff JW, Bradford EB, Carrington WK. (2007). The transport of water through latex films. *J. Polym. Sci.* 41 (1): 155–174.
- Wagner KG, Maus M, Kornherr A, Zifferer G. (2005). Glass transition temperature of a cationic polymethacrylate dependent on the plasticizer content—Simulation vs. experiment. *Chem. Phys. Lett.* 406: 90–94.
- Wesseling M, Kuppler F, Bodmeier R. (1999). Tackiness of acrylic and cellulosic polymer films used in the coating of solid dosage forms. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 47: 73–78.
- WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. (2022). *Guidelines for ATC classification and DDD assignment* Oslo, 2021.

- Woertz C, Kleinebudde P. (2015a). Development of orodispersible polymer films containing poorly water soluble active pharmaceutical ingredients with focus on different drug loadings and storage stability. *Int. J. Pharm.* 493 (1-2): 134–145.
- Woertz C, Kleinebudde P. (2015b). Development of orodispersible polymer films with focus on the solid state characterization of crystalline loperamide. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 94: 52–63.
- Wokovich AM, Prodduturi S, Doub WH, Hussain AS, Buhse LF. (2006). TDDS adhesion as a critical safety, efficacy and quality attribute. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 64: 1–8.
- Yang F, Yu X, Shao W, Guo P, Cao S, Wang M, Wang Y, Wu C, Xu Y. (2020). Co-delivery of terbinafine hydrochloride and urea with an *in-situ* film-forming system for nail targeting treatment. *Int. J. Pharm.* 585: 119497.
- Yang Z, Craig DQM. (2020). Monitoring film coalescence from aqueous polymeric dispersions using atomic force microscopy: Surface topographic and nano-adhesion studies. *Asian J. Pharm. Sci.* 15: 104–111.
- Yu B, Kang SY, Akthakul A, Ramadurai N, Pilkenton M, Patel A, Nashat A, Anderson DG, Sakamoto FH, Gilchrest BA. (2016). An elastic second skin. *Nat. Mater.* 15: 911–918.
- Zayed GM, Rasoul SAE, Ibrahim MA, Saddik MS, Alshora DH. (2020) In vitro and in vivo characterization of domperidone-loaded fast dissolving buccal films. *Saudi Pharm. J.* 28: 266–273.
- Zhai X, Yokota M, Maibach HI. (2007). In vitro human skin model to evaluate water permeability and determine wound dressings' occlusivity. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 26 (2): 107–111.



## 7. PRILOZI

### 7.1 Publikovani i saopšteni radovi koji čine deo doktorske disertacije

#### Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

1. **Timotijević M.D**, Ilić T, Savić S, Pantelić I. Simultaneous Physico-Mechanical and In Vivo Assessment towards Factual Skin Performance Profile of Topical Polymeric Film-Forming Systems. *Pharmaceutics* **2022**, *14*(2):1-15. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020223> (IF: 6,525/2021)
2. **Timotijević M.D**, Ilić T, Marković B, Randjelović D, Cekić N, Nikolić I, Savić S, Pantelić I. Coupling AFM, DSC and FT-IR towards Elucidation of Film-Forming Systems Transformation to Dermal Films: A Betamethasone Dipropionate Case Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*(11):1-16. <https://doi.org/10.3390/ijms23116013> (IF: 6,208/2021).

#### Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)

1. **Timotijević M**, Ilić T, Savić S, Pantelić I. Transformation/metamorphosis of topical film-forming systems upon application: contribution of tribological studies, 12th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 11-14 May 2021, Virtual meeting Vienna, Austria.
2. **Timotijević M**, Randjelović D, Marković B, Ilić T, Savić S, Pantelić I. Coupling AFM, DSC and FT-IR towards elucidation of film-forming system's transitions leading to dermal film formation, 13th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 28-31 March 2022, Rotterdam, The Netherlands. p21.

#### Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64)

1. **Timotijević M.**, Pantelić I., Savić S. Preformulaciona studija sistema koji obrazuju film na površini kože kao prospektivnih nosača lekova. *Arh .farm.* 2018; *68*(3):638-639.

## 7.2. Biografija autora

Mirjana Timotijević rođena je 22.05.1974. u Prištini. Osnovnu školu *Aca Marović* i gimnaziju završila je u Prištini kao nosilac diplome *Vuk Karadžić*. Integrisane akademske studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 1992/1993. godine, a diplomirala je jula 1998. godine sa prosečnom ocenom 8,72 (osam i 72/100) i stekla zvanje diplomirani farmaceut. Nakon završetka studija, pripravnički staž u trajanju od 12 meseci obavila je u apoteci Lipov lad "Apotekarska Ustanova Beograd", centralnoj apoteci "Klinički Centar Srbije", Beograd i "Zavodu za Transfuziju krvi Srbije", Beograd, i aprila 2000. godine položila stručni ispit za farmaceute.

Akademsku specijalizaciju iz kozmetologije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisuje školske 1998/1999. godine. Odbranom specijalističkog rada juna 2002. godine pod nazivom „Pregled lekovitih i kozmetičkih preparata za lokalni tretman kože sa aknama“ stiče stručno zvanje specijaliste kozmetologije.

Doktorske akademske studije (modul farmaceutska tehnologija) upisala je školske 2013/2014. godine i položila svih 15 ispita predviđenih planom i programom modula sa prosečnom ocenom 8,67 (osam i 67/100).

U periodu novembar 1998. – jun 2009. godine bila je zaposlena u preduzeću Beolab Laboratorije AD u zvanju stručnog saradnika, gde je radila na poslovima razvoja kozmetičkih proizvoda za negu kože lica i tela, izradi redovnog plana proizvodnje i koordinisanju proizvodnje, izradi deklaracija proizvoda, prezentaciji proizvoda na stručnim skupovima i sajmovima kozmetike.

U periodu jun 2010. – jun 2011. godine bila je zaposlena u Galenici a.d., Institut za istraživanje i razvoj, Sektor za razvoj i registraciju u zvanju višeg stručnog saradnika, gde je radila na poslovima izrade i obnove registracione dokumentacije, na razvoju farmaceutskih oblika, kao i na izradi predloga specifikacija pakovnog materijala.

U periodu decembar 2011. – avgust 2015. godine bila je zaposlena u Zavodu za Intelektualnu svojinu, Sektor za patente, Odeljenje za hemiju i hemijsku tehnologiju u zvanju samostalnog savetnika, gde je radila na ispitivanju patentnih prijava stranih i domaćih podnosioca iz oblasti farmacije i hemijske tehnologije, izdavanju rešenja odobrenih patenata, sertifikata o dodatnoj zaštiti za lekove, dodeljivanju međunarodne klasifikacije patenata, izradi rešeršnih izveštaja o pretraživanju stanja tehnike.

U periodu maj 2016. – do danas angažovana je na stručnom prevođenju Evropskih patentnih prijava iz oblasti farmacije, biotehnologije i medicine u okviru patentne validacije u R. Srbiji.

Pronalazač je 1 patenta iz oblasti kozmetologije, podnetog 2005. godine, autor je 2 rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), 1 rada u zborniku radova 7. Internacionalni Kongres Kozmetičara i Estetičara Jugoslavije, 2002. godine, autor je 2 saopštenja na međunarodnom i 1 saopštenja na domaćem skupu. Učestvovala je na međunarodnim seminarima za edukaciju patentnih ispitivača u okviru Evropske Patentne Akademije u periodu 2012-2015.

Tečno govori engleski i italijanski jezik.

### 7.3. Izjave autora

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписана: Мирјана Тимотијевић

број уписа: 32/13

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Полимерни филм-формирајући системи за дермалну испоруку бетаметазондипропионата: дефинисање критичних атрибута квалитета применом оптимизованих физичко-хемијских, триболошких и биофармацеутских тестова

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

У Београду, 08.09.2022.

Потпис докторанда

Мирјана Тимотијевић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Мирјана Тимотијевић

Број уписа: 32/13

Студијски програм: Докторске академске студије, модул Фармацеутска технологија

Наслов рада: Полимерни филм-формирајући системи за дермалну испоруку бетаметазондипропионата: дефинисање критичних атрибута квалитета применом оптимизованих физичко-хемијских, триболошких и биофармацеутских тестова

Ментор: проф. др. Ивана Пантелић

Потписана: Мирјана Тимотијевић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 08.09.2022.

Потпис докторанда

Мирјана Тимотијевић

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Полимерни филм-формирајући системи за дермалну испоруку бетаметазондипропионата: дефинисање критичних атрибута квалитета применом оптимизованих физичко-хемијских, триболошких и биофармацеутских тестова

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима – без прераде
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис је на полеђини листа).

У Београду, 08.09.2022.

Потпис докторанда

Мирјана Тимишевић

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.