

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ –
ФАРМАЦЕУТСКОГ ФАКУЛТЕТА**

КОМИСИЈИ ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ НАСТАВУ – ДОКТОРСКЕ СТУДИЈЕ

На седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета, одржаној 14.07.2022. године, а одлуком од 18.07.2022. године, именовани су чланови Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата магистра фармације, специјалисте Мирјане Тимотијевић, под насловом

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

Комисија у саставу:

1. Др Снежана Савић, председник, редовни професор – председник Комисије, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет;
2. Др Тања Илић, научни сарадник, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет;
3. Др Небојша Цекић, редовни професор, Универзитет у Нишу – Технолошки факултет у Лесковцу

Прегледала је приложену дисертацију и подноси Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета следећи извештај:

ИЗВЕШТАЈ

1. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација под називом **Полимерни филм-формирајући системи за дермалну испоруку бетаметазондипропионата: дефинисање критичних атрибута квалитета применом оптимизованих физичкохемијских, триболошких и биофармацеутских тестова** садржи седам поглавља: 1. Увод, 2. Циљ рада, 3. Експериментални део, 4. Резултати и дискусија, 5. Закључак, 6. Референце и 7. Прилози. У оквиру докторске дисертације, на њеном почетку, приложен је сажетак на српском и енглеском језику и садржај, а на крају су одговарајући прилози докторској дисертацији: списак публикованих и саопштених радова који чине део докторске дисертације, кратка биографија кандидата, и изјаве кандидата о ауторству, истовестности штампане и електронске верзије и коришћењу докторске дисертације.

Дисертација је написана на 119 страна (почевши од увода, закључно са пописом литературних референци) и садржи 59 слика (7 у уводу, 8 у експерименталном делу, 44 у резултатима и дискусији) и 21 табела (3 у уводу, 2 у експерименталном делу, 16 у резултатима и дискусији). Преглед литературе садржи 187 навода.

Увод садржи 6 поглавља (са одређеним потпоглављима), у којима су јасно наведене информације релевантне за предмет проучавања докторске дисертације. На самом почетку, у првом делу увода, дат је кратак преглед својстава топикалних кортикостероида, са листом најновије међународне класификације кортикостероида према јачини дејства, као и образложењем потребе за увођењем новијих носача за дермалну испоруку лекова, са освртом на терапију псоријазе. У другом делу увода детаљно су описани састав, карактеристике и све предности полимерних филм-формирајућих система (ФФС) у различитим облицима за дермалну примену у односу на конвенционалне фармацеутске облике, као и досадашње стање технике у њиховом развоју и истраживању, али и досадашња сазнања о самим полимерима из групе полиметилметакрилата и њиховом конкретном фармацеутском примени. У наставку, у трећем делу увода, описани су ФФС за продужену испоруку лекова који се користе у различитим фармацеутским облицима (претежно чврсте конзистенције). Четврти део увода описује новије захтеве регулаторних водича за топикалне препарате, са посебним освртом на феномен „метаморфозе” или трансформације ових система на кожи као својство од посебног интереса, а које је тек недавно озваничено од стране Европске агенције за лекове (ЕМА, 2018). Овај елемент у уводу је од посебног значаја јер до сада није детаљније разматран и тумачен ни код других фармацеутских облика. Имајући у виду комплексност иновативних ФФС за дермалну примену, укључујући све изазове који се сусрећу у њиховој карактеризацији, уз значајну хетерогеност у начинима спровођења мерења и увођења потпуно нових метода карактеризације са свеобухватним приступом и интерпретацијом резултата у циљу дефинисања критичних атрибута квалитета, дат је осврт и на доступне актуелне стандарде за спровођење испитивања филмова (ИСО и АСТМ стандарди) који се не односе на дермалне филмове за фармацеутску примену. Пети део увода детаљно се бави прегледом досадашњег стања фармацеутских препарата присутних на тржишту који су по типу филм-формирајући системи намењени локалној/дермалној и трансдермалној примени, али и развојем филм-формирајућих система са различитим лековитим супстанцама од стране више група истраживача. Последњи, шести део увода, посвећен је бетаметазондипропионату – изабраној модел лековитој супстанци и његовим структурним и физичкохемијским својствима. Литературни наводи у уводу су савремени и потврђују актуелност теме ове докторске дисертације.

Циљеви истраживања су јасно и прецизно дефинисани. Свеукупни циљ истраживања ове докторске дисертације је развој, оптимизација и карактеризација полимерних филм-формирајућих система на бази синтетских, полусинтетских или комбинације синтетских и полусинтетских полимера (прецизније полиметакрилатних кополимера и/или хидроксипропилцелулозе), као проспективних и супстантивних носача за побољшану и продужену дермалну испоруку липофилне лековите супстанце (бетаметазондипропионата као изабраног модела из групе кортикостероида јаког деловања), уз праћење и анализу комплексних интеракција које се дешавају између лековите супстанце, полимера и коже, а које су у основи *in-situ* трансформације код оваквих система и формирања готово

невидљивих филмова на површини коже, при чему према досадашњем стању технике није познато да су истраживане у овом степену и обиму. Такође, циљ је и да се смањењем учесталости примене филм-формирајућих система са бетаметазондипропионатом у облику раствора или дисперзија, умање потенцијални нежељени ефекти очекивани од кортикостероида јаког деловања, те да се са друге стране побољша комплијанса пацијента у смислу њихове повећане естетске прихватљивости и изгледа на кожи (танки, готово неприметни топикални филмови који се брзо суше). Упоредо са овим, циљ је и разматрање одређених аспеката специфично-оптимизованих физичкохемијских, триболошких и биофармацеутских тестова развијених за успешну карактеризацију ФФС односно топикалних филмова са идејом дизајнирања прототипа иновативног ФФС за дермалну примену и циљану испоруку бетаметазондипропионата (нпр. на псоријазним плаковима или прегибима коже).

Активности усмерене ка остваривању наведених циљева организоване су у 4 фазе експерименталног рада.

Експериментални део докторске дисертације садржи детаљно описане материјале и методе коришћене у истраживачком раду (преформулациона истраживања, израда полимерних „плацебо” ФФС (без лековите супстанце) и израда полимерних ФФС са модел лековитом супстанцом бетаметазондипропионатом, опсежна физичкохемијско-механичка, сензорна, триболошка и биофармацеутска карактеризација).

У првој фази експерименталног рада приказани су сви сегменти истраживања спроведени у оквиру дизајниране преформулационе студије, тј. финални одабир и дефинисање концентрацијског опсега ексципијенаса у саставу ФФС изабраних од следећих група: хидрофобних и/или хидрофилних синтетских или полусинтетских филм-формирајућих полимера, различитих система растварача, пластификатора и побољшивача пенетрације у циљу оптимизације састава формулације и генерисања филмова оптималних/жељених карактеристика за примену на кожи (време/брзина сушења, одсуство лепљивости, дебљина филма, транспарентност филма, латерално ширење на кожи). Поред описа поступка и услова израде ФФС, приказан је опис уређаја и поступака специфично оптимизованих метода карактеризације како би се добио увид у следеће потенцијалне критичне атрибуте квалитета од значаја током трансформације ФФС и након формирања филмова: време сушења образованих филмова на собној температури, време сушења образованих филмова на просечној температури коже (32 °C), дебљина, флексибилност и сензорна својства (органолептичка карактеризација и лепљивост) генерисаних филмова, дифузиону површину образованих филмова, као и скрининг микроструктуре филмова и рН вредност ФФС. Стога, формулације су подвргнуте детаљној физичкохемијској, механичкој и сензорној карактеризацији, као и хемијској процени стабилности, како би се добио додатни увид у погодност примене развијених ФФС за касније инкорпорирање модел лековите супстанце. Посебан сегмент прве фазе истраживања посвећен је осмишљавању и оптимизацији појединих протокола испитивања прилагођених потребама испитивања фармацеутских ФФС за дермалну примену, односно образованих филмова. Додатни сегмент прве фазе истраживања у оквиру праћења сензорних својстава и структуре формираних филмова посвећен је сагледавању, праћењу и разумевању прелазних структура које настају након иницијалног апликовања ФФС на стаклени супстрат, а чија испитивања су такође описана (коришћењем поларизационе микроскопије

и уређаја типа инкубационе коморе за испитивање брзине сушења филмова на просечној температури коже).

У другој фази експерименталног рада детаљно су описана сва три сегмента у оквиру истраживачке студије, спроведене *in vivo* на укупно 16 добровољаца (након прибављања одговарајућег одобрења надлежног Етичког комитета), без историје или клиничких знакова било којих дерматолошких болести, физичких оштећења коже или алергијских реакција, при чему је иницијални сегмент ове студије спроведен у циљу процене безбедносног профила односно иритационог потенцијала одабраних плацебо филм-формирајућих формулација развијених као проспективних, савремених носача за испоруку лекова. Стога је први сегмент студије прелиминарне процене иритационог потенцијала, развијених и пажљиво одабраних филм-формирајућих система на бази хидрофобних и/или хидрофилних полимера заједно са једним поредбеним хидрофилним ФФС на бази поливинилалкохола (као референтна филм-формирајућа формулација) спроведен применом неинвазивних биофизичких мерења на кожи у тзв. студији под оклузијом и оценом ефеката ових узорака на кожи након 24-очасовне оклузије, мерењем следећих параметара коже: еритема индекса (енгл. EI); трансепидермалног губитка воде (енгл. TEGV); степена хидратисаности *stratum corneum*-а (енгл. SCH); и pH коже. Други сегмент *in vivo* студије посвећен је праћењу и оцени механичких и триболошких својстава ФФС у процесу њихове брзе трансформације до настанка *in-situ* филмова на кожи применом торзионог теста, при чему је мерени параметар била фрикција применом сонде Frictionmeter® FR700 опремљене са равним, глатким тефлонским диском. Отпор који је најпре ФФС, а затим образовани филм на кожи испољио према торзији (фрикција) указивао је најпре на лакоћу наношења/размазивост, затим на трансформацију формулације услед испаравања (дела) присутних растварача, потом супстантивност формулације и коначно на карактеристике квалитета површине генерисаног филма (глаткоћу и храпавост), затим еластичност, пластичност и интегритет филма током 24 часа на кожи. У завршном сегменту *in vivo* студије, у циљу процене пријемчивости и постојаности испитиваних формулација на кожи спроведено је испитивање супстантивности модификовано на начин да обухвати уобичајено понашање корисника/пацијената кроз симулирање контакта кожа-ФФС и ФФС-одећа (памучна мајица). За потребе овог сегмента студије у одабране ФФС инкорпорирано је 0,9% авобензона, UV филтера са занемарљивим потенцијалом пенетрације у кожу.

У трећој фази експерименталног рада извршена је оптимизација поступка израде различитих ФФС са лековитом супстанцом. Утврђено је да начин израде (начин инкорпорирања лековите супстанце) има непосредан утицај на даље карактеристике система представљајући тиме критичан процесни параметар. Даље су описане методе физичкохемијске карактеризације одабраних ФФС са инкорпорираним бетаметазондипропионатом у терапијској концентрацији од 0,064%, што одговара садржају од 0,05% бетаметазона. У циљу успостављања релевантне корелације између формулационих параметара и физичкохемијских, механичких, тактилних и триболошких својстава од значаја, уз одређивање вискозитета, у овом сегменту је за дефинисање квалитета површине насталих филмова након сушења (морфологија, храпавост) од одабраних узорака ФФ формулација са укљученим бетаметазондипропионатом коришћена метода микроскопије атомских сила (енгл. AFM), док је оптичка микроскопија примењена за детекцију евентуалног присуства кристала бетаметазондипропионата (праћење преципитације лековите супстанце током трансформације ФФС) након сушења филма.

Фокус треће фазе експерименталног рада усмерен је ка значајним аспектима термалних (диференцијална скенирајућа калориметрија) и спектроскопских метода карактеризације (инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом) за процену потенцијалне промене физичког стања лековите супстанце, али и детекцију интеракција које се дешавају између лековите супстанце и полимера унутар фазне транзиције како „плацебо” тако и „активних” ФФС, са посебним освртом да су ове методе дале увид у прелиминарну стабилност одабраних ФФС у дужем временском периоду. У последњем сегменту треће фазе експерименталног рада описан је и поступак одређивања дугорочне стабилности одабраних ФФС праћењем органолептичког изгледа и рН вредности (током годину дана, на собној температури и заштићено од директног извора светлости), док је реолошка студија одабраних ФФС без и са бетаметазондипропионатом спроведена након 7, 90 и 180 дана од припреме узорака.

Четврта фаза експерименталног рада, посвећена је биофармацеутској процени дермалних филмова са бетаметазондипропионатом, односно испитивању *in vitro* пермеације бетаметазондипропионата из *in-situ* формираних филмова, коришћењем мембране пореклом са коже уха свиње (изоловани епидермис). С обзиром да је дифузија активне супстанце из формулације важан предуслов за остваривање ефеката, детаљно је описан поступак *in vitro* испитивања пермеације бетаметазондипропионата из дермалних филмова применом модификованих, вертикалних, дифузионих (Францових) ћелија. Примена *in vitro* методологија у прелиминарној процени ефикасности *in-situ* дермалних филмова представља веома важан сегмент карактеризације, чинећи окосницу у сагледавању финалне фазе истраживања и интерпретацији добијених резултата. У оквиру ове фазе, процењен је и утицај типа и концентрације одабраног полимера, и додатне солубилизације бетаметазондипропионата у ФФ формулацијама присутним пластификаторима и/или хемијским појачивачима пенетрације на физикохемијске, сензорне, механичке и биофармацеутске карактеристике дермалних филмова. Фокус четврте фазе експерименталног рада усмерен је ка успостављању и дефинисању критичних атрибута квалитета које треба пратити како би се детектовале евентуално присутне разлике у микроструктури ФФС/филмова, потом дефинисању техника које треба користити за мерење одабраних критичних атрибута квалитета, као и утврђивању начина интерпретације добијених резултата и спровођењу анализе усклађености промена у критичним атрибутима квалитета са одговарајућим променама које се одражавају у дермалној испоруци лека.

Све методе и протоколи који су коришћени у експерименталном раду ове докторске дисертације су у складу са савременим захтевима научноистраживачког рада у овој области, и спроведени су према актуелним препорукама, односно стандардним оперативним процедурама (за оне методе за које ове процедуре постоје). Примењене методе и протоколи су омогућили добијање објективних и поузданих резултата на основу којих је било могуће донети адекватне научне закључке.

Сва испитивања на хуманим добровољцима у оквиру сва три сегмента истраживачке *in vivo* студије спроведена су у складу са Хелсиншком декларацијом, применом протокола одобреног од стране Етичког комитета за биомедицинска истраживања Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета.

Резултати и дискусија су приказани на 62 страница текста, и садрже 44 слике и 16 табела, пратећи претходно описане фазе експерименталног рада. Резултати су тумачени на разумљив и адекватан начин, и дискутовани у светлу савремених налаза других аутора

који се баве овом облашћу. Такође, кандидат је изнео и своја тумачења добијених резултата, проширујући налазе истраживања у области формулација филм-формирајућих система за дермалну испоруку лекова.

У поглављу Закључак, у складу са резултатима добијеним у свим фазама истраживања, наведени су најзначајнији закључци сваке од четири експерименталне целине.

У поглављу Литература наведене су 187 референце, цитиране Харвардским стилем.

2. ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

У складу са експерименталним планом, резултати ове докторске дисертације подељени су у четири целине, како су и изнети и тумачени.

Као **резултат прве фазе експерименталног рада**, из дизајниране преформулационе студије – експерименталног сета од укупно 55 формулација, од којих је на основу ниже дефинисаних критеријума прелиминарно одабрано 20 формулација које су у свом саставу укључивале филм-формирајуће полимере на бази хидрофилног (хидроксипропилцелулозе (Klucel® GF)) или једног од хидрофобних полимера (Eudragit® NE 30 D, Eudragit® RS PO) или комбинације једног хидрофилног (хидроксипропилцелулоза) и једног хидрофобног полимера (Eudragit® RS PO), а у којима су хидрофобни синтетски полимери из групе полиметилметакрилата изабрани тако да укључују један неутрални (Eudragit® NE 30 D) или један катјонски (Eudragit® RS PO) полимер из групе акрилата и метилметакрилатних кополимера. Кроз специфично дефинисани сет експеримената испитани су сви узорци на релевантна сензорна, физичкохемијска и механичка својства, након чега су откривени неки од фундаменталних аспеката одговорни за настанак оптималних дермалних филмова, при чему су специфични кључни параметри у првом пресеку за даљу процену били следећи: време сушења на собној температури < 60 min, време сушења на температури коже < 15 min, дебљина филма < 0,1 mm, флексибилност филма < 5 пута и рН вредност у опсегу од 5,5-8,5. Оваква селекција је рационално смањила број проспективних формулација на укупно 20, да би потом у наставку испитивања, у другом делу пресека, кључни параметар за финалну процену и одабир формулација био флексибилност филма < 15 пута. Ово је било од посебног значаја јер су филмови са неадекватном флексибилношћу (механичком отпорношћу) били искључени, а са друге стране омогућена је селекција 6 формулација обећавајућих за даља испитивања. Од укупно шест, три формулације су одабране са катјонским полимером Eudragit® RS PO где се распон концентрације полимера кретао од 8,5-17,0 % м/м (тачније F1 - 8,5 %; F2 - 10 %; F3 - 17,0 %); четврта формулација је садржала хидрофилни полимер (тј. хидроксипропилцелулозу) у концентрацији од 3,5 % м/м; пета формулација је садржала неутрални полимер Eudragit® NE 30 D у концентрацији од 6,0 % м/м, и шеста формулација је садржала комбинацију хидрофобног полимера Eudragit® RS PO и хидрофилног полимера хидроксипропилцелулозе у концентрацији од 4 % и 1 % м/м, респективно. Одабрани пластификатори и њихова концентрација у ових шест формулација су били следећи: пропиленгликол (F1 – 1 % м/м); триетил-цитрат (F2 - 2,0 % м/м); пропиленгликол (F3 - 3,5 % м/м); средње-ланчани триглицериди (F4 - 0,7 % м/м); пропиленгликол (F6 - 0,5 % м/м); док је формулација F5 била без пластификатора. Од укупно шест формулација, две

формулације су додатно садржале и површински активну материју (полисорбат 80) у концентрацијама од 0,3 и 1 % м/м (F6 и F1). Осим тога формулације су садржале одабране, различите системе растварача или самостални растварач, од којих су били присутни следећи: етанол (96%, V/V) и вода (код формулација F1, F2, F3 и F6); или изопропил алкохол и вода (формулација F5); док је формулација F4 садржала само етанол (96%) без присуства воде. Садржај етанола је у систему растварача био у распону концентрација од 73,4 - 92,9 % м/м, док је садржај етанола као самосталног растварача био 95,8 %, а садржај изопропил алкохола у систему растварача је био 85 %.

Након сензорних испитивања на основу времена сушења на температури коже изабране формулације су класификоване у три групе: 1. Група са временима сушења ≤ 5 мин (F2, F6), 2. Група унутар опсега времена сушења од 5-7 мин (F1, F3, F5), и 3. Група са временима сушења > 7 мин. (само F4). Описано је да је формулација F2 (стабилисана са 10 % м/м полимера RS) карактерисана са значајно краћим временом сушења у поређењу са формулацијама које садрже нижу количину истог полимера (узорак F1 са 8,5 % RS), полимера NE или хидроксипропилцелулозе; а уочено је да испитивана комбинација полимера у узорку F6 резултира истим временом сушења као и у случају F2, сугеришући да додаток хидрофилног полимера у ниској концентрацији од 1 % омогућава значајно смањење удела хидрофобног полимера (тј. од 10 % на 4 % RS). Време сушења на собној температури свих шест формулација се кретало у распону од 22-48 min, при чему је најдуже време сушења испољила формулација F5 са полимером Eudragit® NE 30 D што је схваћено комплексним феноменом трансформације код оваквог система са постепеном евапорацијом воде (у питању је облик водене дисперзије инкорпорираниог полимера). У погледу козметичких својстава, формулација F3 се показала формулацијом избора, образујући кристално-транспарентне, хомогене филмове са ниском лепљивошћу након сушења на 32 °C, као и након сушења на собној температури, а једино је узорак који садржи хидроксипропилцелулозу као самостални полимер оцењен као интензивно замућен, те је констатовано да ова карактеристика може негативно утицати на комплијансу од стране пацијента. У погледу основног ширења ФФС на микроскопској плочици, повећање садржаја полимера RS од 8,5 на 17,0 % м/м је очекивано довело до смањења образоване површине филма од $223,0 \pm 21,2 \text{ mm}^2$ на $79,0 \pm 1,5 \text{ mm}^2$; при чему је најмања површина филма измерена за узорак на бази хидроксипропилцелулозе, и са уочљиво најмањим ширењем на микроскопској плочици од $24,0 \pm 1,2 \text{ mm}^2$. У погледу дебљине формираног филма су окарактерисани са свеукупно прихватљивом дебљином, која се кретала у опсегу од 0,007 до 0,096 mm, где је само повећање садржаја полимера RS довело до постепеног повећања дебљине генерисаних филмова, па је тако најдебљи филм формиран са највећом употребљеном концентрацијом полимера RS од 17,5 % (0,096 mm), док је формулација F1 (8,5 % полимера RS) образовала веома танки филм са најмањом дебљином (0,007 mm). У случају полимера хидроксипропилцелулозе и RS дебљина *in-situ* формираног филма је била у директној зависности са изабраним типом полимера и његовом концентрацијом, што је указивало да са повећањем концентрације наведених полимера долази до значајног повећања дебљине филма; док је у случају полимера NE као самосталног у саставу ФФС, само повећање концентрације полимера од 5,0 % до 8,5 % довело до благог смањења дебљине филма. У погледу механичких карактеристика најбољу механичку отпорност је испољио филм са катјонским полимером RS ($F1 = 112,0 \pm 2,9$ пута); а затим филм са комбинацијом полимера ($F6 = 105,0 \pm 9,0$), док је најмању механичку отпорност имао филм са неутралним полимером NE и без присуства

пластификатора ($F5 = 56,0 \pm 3,5$ пута). Анализа микроструктуре филмова методом поларизационе микроскопије је потврдила значај ове методе за прелиминарну оцену микроструктуре формираних филмова са различитим типовима и концентрацијом полимера, те избор адекватног система растварача, при чему је истакнуто да је узорак искључиво на бази хидроксипропилцелулозе (F4) показао видљиве агрегате, док је за неутрални полимер NE изопропил алкохол био бољи избор за систем растварача у односу на етанол.

Као **резултат друге фазе експерименталног рада** спроведене унутар 3 одвојена сегмента, при чему су након првог дела успешно квантификовани ефекти које формулације на бази полиметакрилатних кополимера (Eudragit[®]) и/или хидроксипропилцелулозе (Klucel[®]) остварују на кожи током 24-часова под оклузијом, потврђена је добра подношљивост на кожи код свих испитаних формулација. Посебно је интересантно да су узорци са присуством искључиво хидрофобних полимера довели до значајног смањења трансепидермалног губитка воде, указујући тиме да хидрофобни топикални филмови делимично блокирају испаравање воде на површини испољавајући тиме полу-оклузивни ефекат на кожи. Треба напоменути и да сви тестирани узорци доводе до смањења степена хидратисаности *stratum corneum*-а у поређењу са базалним вредностима, при чему статистички значајно смањење испољавају F1, F5, и посебно узорак F6 ($p < 0,05$, одабир статистичких тестова био је у складу са природом података). Међутим, ово смањење хидратисаности *stratum corneum*-а се тумачи високим садржајем присутних органских растварача и самим тим је пролазног карактера услед њихове брзе евапорације и краткотрајног задржавања на кожи. Анализирајући рН вредности коже приметно је да су само узорци F2 и F6, довели до статистички значајне промене овог параметра у односу на њихове базалне вредности (t-тест, $p < 0,05$), као и у односу на обе нетретиране контроле (АНОВА, $p < 0,05$), при чему је наглашено да су ове две формулације индуковале, иако статистички значајан, само благи пад рН вредности коже након 24-часовне оклузије (од $5,3 \pm 0,3$ до $4,9 \pm 0,4$ за оба узорка), те је стога разумљиво да уочене мале разлике у рН вредностима (унутар 0,5 рН јединица) неће значајно утицати на *in vivo* понашање потенцијалног лека. Интересантан налаз је да F4 формулација, упркос нешто вишој рН вредности, није испољила статистички значајан ефекат на рН вредност коже. Сви резултати овог сегмента *in vivo* студије су обезбедили потврду да су испитивани ФФС благе природе.

Унутар другог дела истраживачке студије спроведена је посебна 24-часовна триболошка студија изведена без оклузије, мерењем фрикционог параметра у пет дефинисаних временских тачака (након 5 минута, након 30 минута, након 1 сата, након 6 сати, и након 24 сати), у непрекидном трајању од 100 секунди, при чему је након софтверске обраде из велике групе добијених података добијен прецизан увид у феномен метаморфозе/трансформације различитих ФФС током примене на кожи, али и увид у потенцијалне интеракције које се дешавају између коже и генерисаних филмова. Иницијално је посматрана фрикциона крива добијена 5 min након апликације испитиваних ФФС на воларној страни обе подлактице добровољаца, у поређењу са нетретираном контролом, при чему су током мерења фрикционог параметра на кожи, формулације F1, F2, F4 и F6 испољиле одређени лубрикантни ефекат на кожи, а који је регистрован нижим вредностима фрикционог параметра у поређењу са нетретираном контролом, док су са друге стране, време потребно за достизање платоа, његова вредност и дужина били у високој корелацији са изабраним типом полимера и његовом концентрацијом. Код

формулације F1 припремљене са хидрофобним полимером RS (8,5 %), откривено је да је плато достигнут након приближно 5 s са трајањем до приближно 20 s, а након 40 s примећено је благо постепено повећање фрикционог коефицијента што је тумачено евапорацијом растварача током мерења, као и извесним степеном лепљивости резидуалног филма. У другом случају, приликом укључивања додатног полимера као што је хидроксипропилцелулоза (формулација F6) добијено је продужено време потребно за достизање платоа (приближно 20 s) као и његово трајање (до приближно 40 s), узрокујући ниже вредности фрикционог коефицијента, што је објашњено већом дебљином формираног филма код формулације F6 у поређењу са формулацијом F1, као и побољшаним лубрикантним ефектом. Тако је овом студијом додатно откривено да формирано глатки филмови пружају мањи отпор приликом увртања коже од стране сонде, дајући тиме ниже фрикционе вредности што је нарочито испољено код формулација F2 и F6. Важност описаног момента достизања платоа је била од посебног значаја јер је он представљао почетак тзв. секундарне формулације у оквиру динамичке трансформације ФФС на кожи, док је терцијарно стање описано комплетним сушењем филма.

Са друге стране, формулација F5 је испољила потпуно неочекивано триболошко понашање у односу на све остале испитиване ФФС, показујући значајно више вредности фрикционог параметра у поређењу са нетретираном контролом у свим временским тачкама, специфично по томе да поред већег садржаја воде као растварача у односу на остале ФФС додатно садржи и водену дисперзију полимера, те се у самом процесу формирања филма одвија прилично комплексан процес динамичке трансформације са евапорацијом воде у свим фазама формирања филма, али и накнадно из самог образованог филма. Поред тога, овакво понашање би додатно могло да буде приписано и релативно нижим биоадхезивним својствима полимера NE услед одсуства пластификатора у насталом филму.

Контролна (поредбена) формулација која је садржала 10 % PVA, 0,5 % пропиленгликола и 89,5 % воде, показала је значајно више почетне вредности фрикционог параметра у поређењу са нетретираном контролом, што је разумљиво јер се евапорација воде дешавала искључиво у иницијалној фази образовања филма (највећи раст фрикционог параметра након 5 min), па је и вредност фрикције била нарочито повећана у иницијалној фази формирања филма када је и брзина евапорације воде била највећа. Праћење фрикције након апликовања ФФС и њихове трансформације од течног стања до сувог филма, показало се као значајно ради процене и дуготрајног понашања оваквих система (интегритета филма) након дужег задржавања на кожи. Промене средњих вредности фрикције на површинама третираним са испитиваним филм-формирајућим системима и нетретираном контролом након 24 сата су показале да током 1 сата, средња вредност фрикције постепено опада код свих испитиваних формулација (средњи фрикциони коефицијент је био значајно нижи у односу на нетретирану контролу, осим за формулацију F5), услед евапорације растварача и образовања хомогених, фино-структурираних филмова на површини коже, где је најизраженије смањење коефицијента фрикције откривено за поредбени узорак с обзиром да је садржао највећу количину воде (89,5 %) чије присуство повећава фрикциони отпор између сонде и коже. Утврђено је да полиметакрилатни узорци захтевају већу силу да би се одвојили од коже у поређењу са узорцима на бази хидроксипропилцелулозе, што је потврдило бољи интегритет и постојаност оваквих филмова, па се примера ради они могу дуже задржавати на телесним површинама са већом фрикцијом.

У финалном трећем делу истраживачке студије, у циљу процене очекиване пријемчивости испитиваних формулација на кожи/за кожу, спроведеним тестом супстантивности који симулира контакт кожа-ФФС и ФФС-одећа добијен је висок проценат задржавања формираних филмова на површини коже, при чему је на одећу испитаника пренето свега 4,1-6,5 % формулације. Иако је супстантивност одлика катјонских материјала, настали филм (формулација F5) се показао нешто бољим од филма формулације F1, док је највећу супстантивност испољио филм F6 од $99,1 \pm 16,9$ %, потврђујући тиме оптималан одабир односа хидрофобног RS и хидрофилног полимера (4:1) који је уочен већ током скрининга физичко-механичких својстава. Код 4 испитаника проценат задржавања на тканини се кретао између 2 и 3 %, што је било и у складу са органолептичким запажањима уоченим након мерења фрикции током 24 сата.

Резултати треће фазе експерименталног рада недвосмислено су указали на значај реолошке карактеризације у раном одабиру филм-формирајућих формулација и процени њихове дугорочне стабилности у оквиру реолошке студије. Тестиране су могућности и спектроскопске, термалне и микроскопске технике у карактеризацији ФФС са бетаметазондипропионатом, а такође је утврђен значај ових метода у процени дугорочне стабилности ФФС кроз праћење стања инкорпориране лековите супстанце. Површинске топографије филмова (морфологија, храпавост) прецизно су анализирани применом AFM, где су код сва три различита полимерна ФФС система визуелизовани и различити начини дистрибуције лековите супстанце, што је допринело суштинском сагледавању утицаја хидрофобних полимера на формирање резервоара лековите супстанце у резидуалном филму на површини коже.

Током праћења дугорочне физичке стабилности формулација са и без бетаметазондипропионата, током 6 месеци, сви испитивани ФФС (изузев формулације F4 са хидрофилним полимером) су били непромењених реолошких својстава (нисковискозне течности), без знакова раздвајања фаза или таложења бетаметазондипропионата.

Током праћења дугорочне хемијске стабилности формулација, током годину дана, испитиване формулације F1A, F2A, F3A, F5A, и F6A нису испоиле значајне промене рН вредности, при чему су ФФ формулације F2A, F3A, F6A у односу на иницијално измерене рН вредности након годину дана чувања показале само незнатну промену рН која се кретала у распону унутар 0,1 до 0,4 рН јединица, док су ФФ формулације F1A и F5A показале смањење рН вредности унутар 0,8 рН јединица, што је такође узето као прихватљиво. Такође, након годину дана код свих испитиваних ФФ формулација нису уочене било какве органолептичке промене током њиховог чувања на собној температури и на тамном месту.

Четврта фаза експерименталног рада је потврдила релевантност примене мембране пореклом из коже уха свиње за ефикасну и одложу испоруку бетаметазондипропионата из одабраних ФФС, праћено у продуженом временском периоду (26 сати). Добијени пермеациони профили су указали на знатне разлике у пермеацији бетаметазондипропионата између одабраних формулација, па је тако пермеација лековите супстанце била највећа за формулацију F5A и одвијала се према следећем редоследу ($F5A > F1A > R > F6A$; $p < 0,05$). Кумулативне количине дифундованог бетаметазондипропионата након 26 сати испитивања пратиле су исти редослед: $34,0 \pm 15,8$ ng/cm² за F5A, $16,3 \pm 13,1$ ng/cm² за F1A, $19,7 \pm 5,9$ ng/cm² за референтни узорак (маст са тржишта, R), и $4,0 \pm 1,6$ ng/cm² за F6A. Након 26 сати, пермеација

бетаметазондипропионата из узорка F5A је била значајно повећана, приближно за око 2,5 пута ($0,0046 \pm 0,0013 \text{ mg/cm}^2 \cdot \text{h}$) у поређењу са референтним производом на тржишту типа масти ($0,0019 \pm 0,0003 \text{ mg/cm}^2 \cdot \text{h}$), док је пермеација из узорка F6A била значајно смањена ($0,0005 \pm 0,0002 \text{ mg/cm}^2 \cdot \text{h}$) у поређењу са референтном машћу. Са друге стране, пермеација је била различита и из формулација са различитим хидрофобним полимерима (F5A: $0,0046 \pm 0,0013 \text{ mg/cm}^2 \cdot \text{h}$; и F1A: $0,0016 \pm 0,0012 \text{ mg/cm}^2 \cdot \text{h}$) у односу на референтну маст, указујући тиме да тип полимера у саставу ФФ формулације није пресудан, већ да и други састојци попут пластификатора и површински активних материја утичу на растворљивост активне супстанце, смањујући на тај начин термодинамичку активност и самим тим дифузију. Интеракција лековите супстанце са различитим компонентама у саставу ФФС и термодинамичка активност, како унутар ФФ формулације тако и унутар насталог резидуалног филма на површини коже, тј. растворљивост активне супстанце у одабраним ексципијенсима након формирања филма на површини коже, али и сама дебљина формираног филма показале су се као пресудни фактори за пермеацију. У конкретном случају, редослед формулација према ефикасности дермалне испоруке био је следећи: F5A > F1A > F6A. Овакав редослед кореспондира са растворљивишћу и термодинамичком активношћу бетаметазондипропионата у образованом филму, а након евапорације растварача на површини коже.

3. УПОРЕДНА АНАЛИЗА РЕЗУЛТАТА ДИСЕРТАЦИЈЕ СА ПОДАЦИМА ИЗ ЛИТЕРАТУРЕ

Како је главни циљ развоја топикалних фармацеутских облика лекова и њихове терапијске примене испорука оптималне концентрације лековите супстанце на месту примене, уз адекватан однос очекиване користи и безбедносног профила, увођењем нових носача за дермалну испоруку лекова проширене су извесне могућности како у лечењу дерматолошких обољења тако и избору адекватне терапије за сваког појединачног пацијента. Топикални носачи који оптимизују испоруку кортикостероида за лечење одређене кожне патологије уз смањење ресорпције, могли би да побољшају исход многих кожних имунолошких обољења, између осталих и псоријазе (Kircik и сар., 2017). Осим тога, савремени формулациони приступи пружају наду за бољом сатисфакцијом пацијената и побољшаним квалитетом живота (Buechler и сар., 2021). За разлику од трансдермалних, дермални системи су дизајнирани да обезбеде локално дејство, а користе се у терапији акутних кожних инфекција и хроничних кожних болести, тако што се обично течни или получврсти препарати апликују у прописаним временским интервалима, а формулација је осмишљена тако да инкорпорирани активни фармацеутски састојак циљано пенетрира у/кроз епидермис (Pünnel и Lunter, 2021).

У том смислу, садашња докторска дисертација даје значајан допринос у контексту развоја (резултати у домену преформулационих и формулационих истраживања филм-формирајућих система) проспективних носача лекова за циљану дермалну испоруку лековитих супстанци (модел бетаметазондипропионат). Надаље, докторска дисертација бави се препознавањем критичних атрибута квалитета ових система и развојем/оптимизацијом погодних метода карактеризације, антиципирајући бенефите за

пацијента да се након наношења, овакви системи брзо суше на температури коже образујући танке, готово невидљиве филмове.

Формулације топикалних кортикостероида такође нису могле да избегну утицаје који долазе из козметичке индустрије, а односе се на задовољавајуће основне органолептичке, али и софистициране текстурне и сензорне карактеристике носача примењеног за испоруку, што се директно одражава на комплијансу савременог пацијента (Пантелић, 2013). Познато је да избор подлоге или вехикулума има значајан утицај на (транс)дермалну испоруку лековите супстанце која је у њу инкорпорирана (Otto и сар., 2009). Из тог разлога, приликом формулисања фармацеутског облика за примену на кожи треба размотрити већи број критеријума (Surber и сар., 2001). Услед антиинфламаторне активности, имуносупресивног и антипролиферативног деловања, топикални кортикостероиди и даље налазе широку примену (Elenkov и Chrousos, 2002; Feldman и сар., 2000; Valencia и Kerdel, 2003). Треба истаћи да је ризик повезан са употребом кортикостероида, паралелно са терапијским користима, односно односом ризик/корист, у директној вези са њиховом јачином и капацитетом за пенетрацију, односно пермеацију кроз кожу и евентуалну перкутану ресорпцију (Brazzini и Pimpinelli, 2002).

У оквиру ове докторске дисертације, у односу на класичне конвенционалне препарате (типа масти и крема), развијени филм-формирајући системи су окарактерисани бројним пожељним својствима: краткотрајним сушењем на температури коже (просечно 5-7 минута) што је од пресудног значаја са аспекта знатно побољшаних естетских и других пожељних тактилних перформанси (не масте кожу, не изазивају било какав осећај непријатности или неугодности на кожи, не лепе се на кожи нити одећи, лако се шире на месту примене, готово су невидљиви након сушења) повећавајући тиме прихватљивост и апликативност од стране пацијената, а са друге стране потенцијал смањења учесталости примене додатно повећава комплијансу пацијента. Развој филм-формирајућих система као носача новије генерације за дермалну испоруку кортикостероида јаког деловања може донети одређене терапијске користи, односно водити ка за пацијента комфорном, мање учесталом, те ефикаснијем лечењу кожных обољења.

Након што су филм-формирајући системи првобитно коришћени у области хирургије или за третман рана (Boateng и сар., 2008; Gupta и сар., 2019; Ovington, 2007; Patel и сар., 2018), започета су истраживања ових система за (транс)дермалну испоруку лековитих супстанци (Frederiksen и сар., 2015; Singh Malik и сар., 2016; Tran и Tran, 2017). Филм-формирајући системи се последњих петнаест година због својих многобројних предности (нпр. лакоће примене, одсуства оклузивних својстава, брзог сушења и образовања готово невидљивог, транспарентног филма на кожи, поседовања високог солубилизационог капацитета за липофилне и хидрофилне лековите супстанце, мање учесталости примене у односу на конвенционалне полуврсте препарате, смањења ризика од системске токсичности лекова, омогућавања продуженог ослобађања лековите супстанце формирањем резервоара у и/или на кожи и побољшања адхеренце пацијента) интензивно истражују као потенцијални носачи лекова за неколико путева примене (Frederiksen и сар., 2015; Gennari и сар., 2017; Kathe и Kathpalia, 2017; Schroeder и сар., 2007; Tran и Tran, 2019). Поред фармацеутске примене, полимерни ФФС имају и козметичку примену (производи за хидратацију коже, водоотпорне формулације и др.) (Kessler и сар, 2016; Pünnel и Lunter, 2021).

Примена различитих филм-формирајућих система може бити интересантан и обећавајући приступ постизања контролисаног ослобађања лековите супстанце (de Oliveira и сар., 2020; Gennari и сар., 2017). Ипак, недостају студије које на свеобухватан начин карактеришу овакве полимерне, лако испарљиве формулације. Додатно, приметан је недостатак *in vivo* студија.

Конвенционални фармацеутски облици за примену на кожи попут масти, крема, гелова, па чак и фластера, имају одређена терапијска ограничења. Тако, фластери често доводе до локалне иритације коже услед оклузивних својстава узрокујући опструкцију знојних канала и пролиферацију микроорганизама, тешко се апликују на прегибима, узрокују непријатност приликом скидања и др. Са друге стране, полуврсти препарати типа масти и крема превазилазе неке од наведених недостатака, али имају и друге као што су: немогућност остваривања трајног контакта са површином коже услед чега се лако уклањају са одеће и спирају са коже, наносе се више пута у току дана, остављају мастан осећај и сјајан изглед на кожи, преносе се на одећу, што све скупа знатно утиче на адхеренцу (Kathe и Kathpalia, 2017). За разлику од крема и масти, гелови са биоадхезивним полимерима могу продужити време контакта, али се често апликују на велике површине коже и у значајној мери преносе приликом контакта што смањује доступну количину лековите супстанце (Parhi и Swain, 2018).

У том смислу, спроведена *in vivo* студија у оквиру садашње докторске дисертације кроз три одвојена сегмента недвосмислено даје допринос потврди биокompatбилности развијених филм-формирајућих система (без инкорпориране модел лековите супстанце), у погледу њихове прихватљивости, естетског изгледа на кожи и ниског иритационог потенцијала без ремећења природне баријере и рН вредности коже што је од посебног значаја у терапији акутних и хроничних кожних обољења. Са друге стране код оваквих система је први пут спроведена триболошка студија на хуманим добровољцима у циљу карактеризације значајних, комплексних интеракција које се дешавају током њихове брзе трансформације и образовања филмова на кожи, а из које су касније проистекли и други значајни чиниоци у дефинисању критичних атрибута квалитета од интереса за развој, али и перспективну контролу квалитета оваквих система.

Имајући у виду да ФФС обезбеђују значајну супстантивност лека на кожи, као и да досадашња истраживања фаворизују инкорпорирање лековитих супстанци довољне липофилности (Pünnel и Lunter, 2021), од интереса је будуће модел лековите супстанце за полимерне носаче за дермалну испоруку изабрати из групе кортикостероида јаког деловања, попут слабог растворног бетаметазона. Бетаметазондипропионат је на основу својих својстава (неутралан; 505 Da; log P 3,96; Carter и сар., 2020) изабран као погодна модел лековита супстанца за ФФС. Користи се у лечењу различитих типова дерматитиса, а у облику ФФС могао би унапредити исход терапије нпр. хроничне плак псоријазе на шакама и стопалима. Допринос садашње докторске дисертације лежи и у спознаји да се ефикасност бетаметазона код горе наведених индикација може значајно унапредити савременим формулационим приступима, односно циљаном применом формулација унапређене супстантивности на месту примене.

Са становишта најновијих регулаторних водича везаних за квалитет и еквивалентност топикалних производа, циљани профили квалитета производа морају бити допуњени додатним, специфичним подацима (Sanchez-Ballester и сар., 2020). Тзв. „метаморфоза“ или

трансформација ових система након примене на кожи је својство од посебног интереса, имајући у виду да се карактеристике формулације драстично мењају након испаравања растварача са површине коже, омогућавајући генерисање филма. Важност метаморфозе топикалних формулација приликом примене је тек скорије озваничена од стране Европске агенције за лекове (нацрт водича CHMP/QWP/708282/2018; EMA, 2018), а до сада је била предмет интересовања мањег броја научних публикација (Fantini и сар., 2019; Frederiksen и сар., 2016; Surber и Knie, 2018). Независно од очигледног утицаја на дермалну расположивост, трансформација система током и након примене лека, може значајно утицати на његову супстантивност и тактилна својства (Danby и сар., 2020). У зависности од кинетике евапорације, примарна формулација се трансформише најпре у тзв. секундарну, а затим у терцијарну која остаје на кожи (Surber и Knie, 2018). Међутим, регулаторне смернице не прецизирају методе карактеризације метаморфозе/трансформације формулација. Осим трансформације, морају се размотрити и други параметри квалитета које треба идеално постићи на финалном ступњу развоја производа. Стога је од посебног значаја дефинисање критичних атрибута квалитета који директно зависе од састава формулације и примењених процесних параметара, а које треба строго пратити да би се гарантовао унапред дефинисан квалитет препарата. Сет критичних атрибута квалитета за ФФС као иновативне носаче лекова је први пут дефинисан и презентован садашњом докторском дисертацијом. Додатни допринос ове дисертације је да су поједини протоколи испитивања посебно осмишљени и/или оптимизовани сходно потребама испитивања фармацеутских дермалних ФФС, односно образованих филмова. Одређени сегменти ове докторске дисертације управо су посвећени разјашњењу механизма настанка топикалних филмова, уз дубље сагледавање различитих феномена који се дешавају током њихове рапидне трансформације преко транзиторних структура које настају у том поступку, дајући недвосмислени научни допринос у домену истраживања механизма укључених у настанак и обезбеђивање стабилности филм-формирајућих система.

На тржишту је присутан ограничен број ФФС за топикалну и трансдермалну испоруку лекова, најчешће у облику спрејева. Најшире познат пример доступног препарата за локалну примену на кожи на бази полимерних филм-формирајућих система представља Lamisil[®] Once (Novartis Consumer Health SA, Швајцарска) који садржи антимиотик тербинафин-хидрохлорид, а примењује се једнократно за лечење дерматофитоза. Наведени ФФС заснован на комбинацији филм-формирајућих полимера (конкретно поли(акриламид-коизооктилакрилат) и хидроксипропилцелулоза) обезбеђује продужено ослобађање лека (Pünnel и Lunter, 2021). Насупрот томе, Axiron[®] (Eli Lilly and Co., САД) представља први трансдермални ФФС (поливинилпирилон као филм-формирајући полимер) намењен за испоруку тестостерона који је одобрен од стране Америчке управе за храну и лекове (FDA) 2010. године (<https://www.lilly.com/products/historic-products>). Актуелност ФФС као новијих носача за (транс)дермалну примену огледа се и у броју формулација типа филм-формирајућих раствора, гелова или емулзија у развоју, попут DuraPeel[®] технологије за ропивакаин (Crescita Therapeutics Inc., Канада; <http://www.crescitatherapeutics.com/technology/durapeel/>), MedSpray[®] (MedPharm Ltd, Велика Британија) технологије која користи тзв. „patch-in-a-can“ концепт (<https://www.medpharm.com/en/medspray/>) или Liqui Patch[®] технологије (Epinamics GmbH, Немачка) у фази развоја формулација са ривастигмином, тестостероном, тербинафином и витамином Д3 (Pünnel и Lunter, 2021). Праћењем вискозитета развијених ФФС током дужег

временског периода, у докторској дисертацији је коментарисана и погодност појединих формулација за спреј паковања.

Као фармацеутски ексципијенси, полимери представљају праве мултифункционалне материјале (Verkenkemper и сар., 2020; van der Merwe и сар., 2020). Упркос чињеници да су неки од полимера коришћених током развоја ФФС добро познати ексципијенси у појединим фармацеутским облицима (нпр. употреба Eudragit[®] полимера код чврстих оралних фармацеутских облика; Gennari и сар., 2017; Patra и сар., 2017), развој нових формулација је указао на недостатак одређених информација о полимерима (нпр. одсуство података који се односе на адхезивна својства, супстантивност формулација које их садрже и др.; Cilurzo и сар., 2014).

Успешна филм-формирајућа формулација за продужену испоруку лековите супстанце, тј. мање учесталу примену лека, треба да поседује флексибилност у прилагођавању покретима коже, високу супстантивност, као и добар интегритет филма (Ammaг и сар., 2009), те је независно од избора полимера, други важан фактор у развоју ФФС био селекција одговарајућег пластификатора. Пластификатор испољава јак утицај на својства насталих филмова, резултирајући у већој флексибилности, смањењу кртости, унапређеном интегритету филма, побољшаној адхезивности (Wokovich и сар., 2006) и извесној пермеабилности филмова (Ammaг и сар., 2009). Поред полимера, пластификатори такође доприносе испоруци лека кроз кожу не само смањењем температуре стакластог прелаза образованих полимерних филмова већ и повећањем дифузије лека (Frederiksen и сар., 2015). Такође, пластификатори могу да повећају слободни волумен и покретљивост ланца полимера, побољшавајући ослобађање лека (Ammaг и сар., 2009; Frederiksen и сар., 2015; Mahnaј и сар., 2011).

Па ипак, како доступни ИСО и АСТМ стандарди који се односе на карактеризацију танких филмова углавном не одговарају специфичностима дермалних филмова за фармацеутску примену (нпр. ИСО 2014; АСТМ 2017, 2018, 2020), свеобухватна карактеризација перформанси ФФС је у оквиру ове докторске дисертације захтевала развој и/или оптимизацију посебних протокола испитивања.

С обзиром да одговарајуће формулације ФФС могу обезбедити контролисано, тј. продужено ослобађање лековите супстанце, спроведено истраживање њиховог потенцијала за смањење учесталости примене је од посебног научног значаја. Додатно, са губитком испарљиве компоненте носача, повећава се концентрација лековите супстанце која ће бити ослобођена, достижући стање (супер)сатурације на површини коже. Сам концепт суперсатурације као алтернативног начина за побољшање пермеације лековитих супстанци кроз кожу представља језгро истраживања ФФС. Суперсатурација може резултовати побољшаном испоруком лековите супстанце повећањем термодинамичке активности формулације без утицаја на кожную баријеру (Gennari и сар., 2019). Међутим, суперзасићени системи су инхерентно нестабилни и уколико се одговарајућим формулационим параметрима не спречи преципитација лековите супстанце, губе се све предности оваквог система (Edwards и сар., 2017). Стога, развој формулације мора бити подржан одговарајућим сетом физичкохемијских, односно термалних и спектроскопских метода, како би се пратила промена термодинамичке активности лека, али и евентуални допринос молекулских интеракција присутних ексципијенаса том феномену (Tran и Tran, 2020).

Посебан допринос ове докторске дисертације чини опсежна физичка карактеризација како одабраних ФФС тако и формираних филмова (без и са инкорпорираном модел лековитом супстанцом) спровођењем термалних, спектроскопских и микроскопских метода ради праћења термодинамичке активности и појаве евентуалне кристализације и преципитације бетаметазондипропионата које би се потом одразиле на саму стабилност и смањену испоруку лека, али и на значајне интеракције унутар ФФС и образованих резидуалних филмова на површини коже. Микроскопијом атомских сила остварен је дубљи увид у структуру образованих инклузија полимерних филмова и тиме анализиран њихов утицај на образовање резервоара лековите супстанце унутар саме формулације на површини коже који додатно доприноси побољшаној дермалној испоруци. На основу АФМ анализе, значајно побољшање у пермеационом профилу лека код F5A се може повезати са присуством изражених долина (тзв. инклузија) у микроструктури филма, које изгледају као да урањају у саму површину узорка, са дијаметром од 1,17-2 μm . Следствено, нижи пермеациони профил уочен код F1A у поређењу са F5A се може повезати и са значајно мањим дијаметром видљивих инклузија од 0,3 μm . На овај начин, успостављањем својеврсног резервоара лековите супстанце у зависности од изабраног типа полимера у резидуалном полимерном филму на кожи (унутар инклузија), као и унутар *stratum corneum*-а, може бити објашњена продужена и побољшана испорука лековитих супстанци код ових система.

Коначна потврда унапређених биофармацеутских перформанси развијених ФФС у односу на испитивани референтни препарат (Beloderm[®] маст) је добијена *in vitro* испитивањем пермеације које је указало на значајно побољшану, продужену испоруку бетаметазондипропионата из изабраних ФФС чиме се обезбеђује мања учесталост примене оваквих препарата, а сам тим разумно је очекивати и повећање адхеренце, при чему је формулација са полимером Eudragit[®] NE 30D (у концентрацији од 6,0 %) у изабраном систему растварача (изопропил алкохол/вода) испољила највећи обим и брзину пермеације бетаметазондипропионата, док је формулација типа дисперзије са комбинацијом полимера RS/хидроксипропилцелулоза (4:1) испољила оптимални потенцијал за продужену испоруку бетаметазондипропионата. С обзиром на приказани састав испитиваних ФФС и специфичне сензорне, физичкохемијске и механичке карактеристике, потврђена је предност њихове употребе као новијих носача слабо растворних, липофилних лековитих супстанци (попут стероидног антиинфламаторног лека бетаметазондипропионата) у односу на конвенционалне полуврсте препарате типа масти.

У оквиру садашње докторске дисертације, свеукупном анализом постигнутих резултата и применом осмишљеног модела одлуке, шематски је први пут приказан рационални сет дефинисаних критичних атрибута квалитета ФФС, препоручене и/или алтернативне технике карактеризације и њихове оптималне вредности које су директно релевантне за постизање жељене дермалне испоруке бетаметазондипропионата у дубље слојеве коже, што је од посебне важности у савременој терапији хроничних кожних обољења попут псоријазе.

Након свеукупне анализе, резултати добијени и представљени у оквиру ове докторске дисертације делом су сагласни са подацима из литературе, а резултати одређених испитивања изведених у оквиру дисертације нису могли бити упоредо анализирани са публикованим изворима, те се сматрају доприносом истраживачког рада кандидата.

ЛИТЕРАТУРА

- [ASTM] American Society for Testing and Materials (2017). D3359-17 Standard Test Methods for Measuring Adhesion by Tape Test. West Conshohocken: ASTM International.
- [ASTM] American Society for Testing and Materials (2018). D523-14 Standard Test Method for Specular Gloss. West Conshohocken: ASTM International.
- [ASTM] American Society for Testing and Materials (2020). D1005-95 Standard Test Method for Measurement of Dry-Film Thickness of Organic Coatings Using Micrometers. West Conshohocken: ASTM International.
- [EMA] European Medicines Agency (2018). CHMP/QWP/708282/2018 Draft guideline on quality and equivalence of topical products. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP).
- [ISO] International Organization for Standardization (2014). 2813:2014 Paints and Varnishes - Determination of gloss value at 20°, 60°, and 85°. 4th ed. Geneva: International Organization for Standardization: 1–23.
- 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.
- Axiron® (Testosterone) Pump Applicator, Axiron® (Testosterone) Twist Applicator. Available online: <https://www.lilly.com/products/historic-products> (pristupljeno 23.08.2022.)
- 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.
- Boateng JS, Matthews KH, Stevens HNE, Eccleston GM. (2008). Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *J. Pharm. Sci.* 97: 2892-2923.
- 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.
- Buechler CR, Veenstra J, Stein Gold L. (2021). New topical therapies for psoriasis. *Dermatol. Rev.* 2: 262–268.
- 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.
- 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.
- 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.
- DuraPeel. Available online: <http://www.crescitatherapeutics.com/technology/durapeel/> (pristupljeno 23. 08. 2022.).

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lamisil® Once, sažetak karakteristika leka, <https://www.alims.gov.rs/ciril/files/lekovi/smpc/515-0107523-13-001.pdf> (pristupljeno 25.08.2022.).
- Liqui Patch Platform Technology. Available online: <https://epinamics.com/the-liqui-patch> (pristupljeno 25.08.2022.).
- 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.
- MedSpray® Available online: <https://www.medpharm.com/en/medspray/> (pristupljeno 20.08.2022.).
- 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.

- 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.
- Parhi R, Swain S. (2018). Transdermal Evaporation Drug Delivery System: Concept to Commercial Products. *Adv Pharm Bull* 8(4): 535–550.
- 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.
- Pünnel LC, Lunter DJ. (2021). Film-Forming Systems for Dermal Drug Delivery. *Pharmaceutics.* 13, 932.
- Sanchez-Ballester NM, Bataille B, Benabbas R, Alonso B, Soulairol I. (2020). Development of alginate esters as novel multifunctional excipients for direct compression. *Carbohydr. Polym.* 240:116280.
- Schroeder IZ, Franke P, Schaefer UF, Lehr CM. (2007). Development and characterization of film forming polymeric solutions for skin drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 65 (1): 111–121.
- Singh Malik D, Mital N, Kaur G. (2016). Topical Drug Delivery Systems: A Patent Review. *Exp. Opin. Therap. Patents* 26: 213-228.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

4. ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РЕЗУЛТАТИ КОЈИ ЧИНЕ ДЕО ДИСЕРТАЦИЈЕ

Резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације до сада су објављени у два рада у часописима који су на SCI листи (оба категорије M21), и у форми саопштења на међународним и домаћим научним скуповима штампаним у изводу. Подаци о публикованим радовима дати су у наставку.

Радови у врхунским међународним часописима (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, 223. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020223>
IF (2021) = 6,525; Pharmacology & Pharmacy (39/279) M21.

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. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, 23(11), 6013. <https://doi.org/10.3390/ijms23116013>

IF (2021) = 6,208; Chemistry, Multidisciplinary (50/180), Biochemistry & Molecular Biology (69/296) M21

Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34)

1. **Timotijević M**, Ilić T, Savić S, Pantelić I. Transformation/metamorphosis of topical film-forming systems upon application: contribution of tribological studies, 12th PBP World Meeting 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 PBP World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 28-31 March 2022, Rotterdam, The Netherlands. p21.

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64)

1. **Тимођијевић М.**, Пантелић И., Савић С. Преформулациона студија система који образују филм на површини коже као проспективних носача лекова. *Арх.фарм.* 2018; 68 (3):638-639.

5. ЗАКЉУЧАК – ОБРАЗЛОЖЕЊЕ НАУЧНОГ ДОПРИНОСА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Резултати ове докторске дисертације представљају нова или допуњена сазнања о:

- ❖ фундаменталним аспектима формирања танких, брзо-сушећих дермалних филмова на бази полимера путем евапорације испарљивих растварача из различитих филм-формирајућих система на температури коже,
- ❖ *in vivo* триболошким феноменима у контексту сагледавања динамичке трансформације ФФС на кожи, те процене супстантивности образованих филмова,
- ❖ предностима примене ФФС као проспективних носача за кортикостероидне анти-инфламаторне лекове у односу на конвенционалне препарате,
- ❖ развојем и/или оптимизацијом метода карактеризације ФФС, односно образованих филмова и испитивању механизма *in-situ* суперсатурације као алтернативне технике за побољшање дермалне расположивости лекова,
- ❖ испитивању комбиноване примене хидрофобног и хидрофилног полимера са циљем унапређења дермалне испоруке бетаметазондипропионата.

Укупно гледано, на основу приказаних резултата, може се закључити да су развијени биокомпатибилни, полимерни филм-формирајући системи који образују танке, компактне филмове на кожи погодни као савремени носачи за дермалну испоруку бетаметазона у облику бетаметазондипропионата. Применом низа комплементарних техника, детаљно су окарактерисани у домену микроструктуре, топографије површине насталих филмова, реолошких карактеристика, физичкохемијских карактеристика, евентуалних интеракција, погодности примене и могућности за мање учесталу примену кортикостероида јаког деловања. На самом крају, испитана је *in vitro* пермеација бетаметазондипропионата из формираних филмова (са хемијским појачивачем пенетрације, пластификатором или без њих) и упоређена конвенционалним фармацеутским обликом (маст бетаметазондипропионата), након чега су потврђене унапређене биофармацеутске перформансе развијених полимерних дермалних филмова као напредних носача за ефикасну дермалну испоруку изабране липофилне активне супстанце.

Као највећи фундаментални научни допринос ове докторске дисертације може се сматрати анализа феномена у оквиру триболошке студије, затим праћење и откривање доприноса различитих ексципијенаса у саставу филм-формирајућих формулација естетском изгледу, флексибилности, дебљини филмова, латералном ширењу и стабилности, али и термодинамичкој активности лека након апликовања, утицају топографије филмова, реолошких својстава и теорије суперсатурације у побољшаној пермеацији лека, а који се свеукупно битно разликују од досадашњих разматрања у овој области. Посебан нагласак стављен је и на значајност ангажовања већег броја оптимизованих техника у тзв. трансформационој карактеризацији филм-формирајућих система и формираних филмова, а све са циљем добијања поузданих резултата. Приказани резултати експерименталног дела расветлили су кључне и критичне аспекте одговорне за настанак дермалних филмова пожељних тактилних, физичкохемијских, механичких и биофармацеутских перформанси.

6. ПРОВЕРА ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације *Полимерни филм-формирајући системи за дермалну испоруку бетаметазондипропионата: дефинисање критичних атрибута квалитета применом оптимизованих физичкохемијских, триболошких и биофармацеутских тестова*, аутора Мирјане Д. Тимотијевић, утврђено је подударање текста у износу од 13%. Након анализе добијеног извештаја, закључено је да је овај степен подударности последица коришћења уобичајених израза на страници са изразима захвалности, коришћења стручних синтагми које се не могу избећи, назива и описа појединих метода (стандардни услови испитивања), назива званичних докумената (релевантних водича), личних имена, цитата, фраза које се устаљено користе у описивању и тумачењу резултата истраживања, описа појединих испитиваних параметара и одређених општих места, што је у складу са чланом 9. поменутог Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, добијени извештај програма iThenticate указује на оригиналност докторске дисертације.

7. ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ ЗА ОЦЕНУ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација под називом *Полимерни филм-формирајући системи за дермалну испоруку бетаметазондипропионата: дефинисање критичних атрибута квалитета применом оптимизованих физичкохемијских, триболошких и биофармацеутских тестова*, чија је израда одобрена на седници Већа научних области медицинских наука на Универзитету у Београду одржаној 14.09.2021. године, кандидата маг. фарм. спец. Мирјане Д. Тимотијевић, по свом садржају и форми, јасно постављеним истраживачким циљевима, добро осмишљеној и разноврсној методологији, прецизно изнетим резултатима рада, одговарајућој дискусији, те добро формулисаним закључцима, испуњава све критеријуме адекватно написаног научног дела.

Стога, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета да прихвати позитиван извештај о израђеној докторској дисертацији под називом *Полимерни филм-формирајући системи за дермалну испоруку бетаметазондипропионата: дефинисање критичних атрибута квалитета применом оптимизованих физичкохемијских, триболошких и биофармацеутских тестова*, и кандидату маг. фарм. спец. Мирјани Тимотијевић одобри јавну одбрану докторске дисертације по добијању сагласности Већа научних области медицинских наука Универзитета у Београду.

Београд, 30.08.2022. године

Чланови Комисије

1. _____

Др сц. Снежана Савић, редовни професор,
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

2. _____

Др сц. Тања Илић, научни сарадник,
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

3. _____

Др сц. Небојша Цекић, редовни професор,
Универзитет у Нишу – Технолошки факултет у Лесковцу