

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

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKE STUDIJE

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, održanoj 8.7.2014. godine imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata diplomiranog farmaceuta Anđelke Kovačević, pod naslovom:

„Lipidne nanočestice stabilizovane nejonskim polihidroksilnim surfaktantima: postupak dobijanja, karakterizacija, stabilnost i inkorporiranje lekovite supstance”

Komisija u sastavu:

- 1. Dr Snežana Savić**, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu–Farmaceutski fakultet, mentor i predsednik komisije
- 2. Dr Gordana Vuleta**, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
- 3. Dr Jela Milić**, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
- 4. Dr Cornelia M. Keck**, redovni professor (full professor), Applied Pharmacy Division, University of Applied Sciences Kaiserslautern, Germany
- 5. Dr Rainer H. Müller**, redovni profesor (full professor), Institute of Pharmacy, Free University of Berlin, Germany

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

IZVEŠTAJ

A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija kandidata diplomiranog farmaceuta Anđelke Kovačević pod nazivom: „**Lipidne nanočestice stabilizovane nejonskim polihidroksilnim surfaktantima: postupak dobijanja, karakterizacija, stabilnost i inkorporiranje lekovite supstance**”, napisana je na 215 strana i sadrži osam poglavlja: Uvod, Opšti deo, Cilj istraživanja, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključak, Literatura i Priloge. Na početku disertacije priložen je rezime na srpskom i engleskom jeziku.

Doktorska disertacija napisana je jasnim i preglednim stilom i sadrži 102 grafička prikaza (24 u opštem delu, 1 u eksperimentalnom delu i 77 u rezultatima i diskusiji), 31 tabelu (6 u opštem delu, 7 u eksperimentalnom delu i 18 u rezultatima i diskusiji) i 301 literaturni navod koji se tiče razmatrane problematike.

OPŠTI DEO obuhvata četiri odeljka: *Lipidne nanočestice kao potencijalni nosači za lokalnu primenu lekovitih supstanci*; *Metode za karakterizaciju lipidnih nanočestica*; *Surfaktanti i njihova uloga u formulaciji lipidnih nanočestica*; *Takrolimus kao model lekovita supstanca*, koji su podeljeni na ukupno 16 pododeljaka. Svaki odeljak sadrži informacije koje su od značaja za predmet proučavanja doktorske disertacije. U *prvom odeljku*, izdvojene su najznačajnije informacije o lipidnim nanočesticama kao potencijalnim nosačima za lokalnu primenu lekovitih i kozmetički aktivnih supstanci. U okviru ovog odeljka data je definicija, i navedene su najznačajnije osobine lipidnih nanočestica, opisan je postupak dobijanja ovih nosača, zatim postupak inkorporiranja i oslobađanja aktivne supstance iz lipidnih nanočestica.

U *drugom odeljku* opisane su metode za karakterizaciju lipidnih nanočestica i teorijski aspekti ovih metoda, čije poznavanje je od posebnog značaja za razumevanje i tumačenje rezultata doktorske disertacije. U ovom poglavlju istaknuti su važnost i značaj metoda za određivanje sposobnosti kvašenja čvrstog lipida tečnim lipidom, metoda za određivanje veličine čestica i distribucije čestica po veličini, mikroskopskih metoda, metoda za karakterizaciju strukture lipidnih nanočestica, kao i značaj metoda za ispitivanje površinskih karakteristika i morfologije lipidnih nanočestica i metoda za *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance iz polučvrstih preparata za primenu na koži. U okviru ovog poglavlja prikazana je dosadašnja praktična primena pomenutih metoda u oblasti razvoja i karakterizacije formulacija lipidnih nanočestica, na osnovu dostupnih podataka iz relevantne literature. S obzirom na postojeće podatke i nedostatak literature koja se bavi problematikom novijih surfaktanata u formulaciji lipidnih nanočestica, kandidat iznosi pretpostavku da bi goniometrijska merenja (merenja kontaktnog ugla) mogla imati veći značaj u preformulacionim studijama (pre svega u selekciji odgovarajućih surfaktanata/stabilizatora lipidnih nanočestica), kao i da bi bilo interesantno ispitati postojanje eventualnih korelacija između kontaktnog ugla surfaktanata na čvrstoj lipidnoj fazi i fizičko-hemijskih osobina surfaktanata sa jedne strane i veličine lipidnih čestica, tj. fizičke stabilnosti čestica sa druge strane.

Treći odeljak posvećen je surfaktantima/stabilizatorima i njihovoj ulozi u formulaciji lipidnih nanočestica. U okviru ovog poglavlja opisana su osnovna razmatranja prilikom izbora surfaktanata/stabilizatora lipidnih nanočestica, a takođe i mehanizmi kojima se u literaturi opisuje stabilizacija lipidnih nanočestica. U nastavku je dat prikaz nejonskih surfaktanata/stabilizatora, koji se koriste u formulaciji lipidnih nanočestica. U okviru ovog odeljka prikazani su navodi koji upućuju na mogućnost primene nove generacije nejonskih

polihidroksilnih surfaktanata, u razvoju formulacija lipidnih nanočestica za primenu na koži. Na osnovu literaturnih navoda, kandidat ističe podatak da polihidroksilni surfaktanti poseduju povoljne tehnološke, dermatološke i ekološke osobine, zbog čega se preporučuje njihova primena u formulaciji farmaceutskih i kozmetičkih preparata za primenu na koži. Međutim, i pored svih prethodno navedenih prednosti, kandidat ističe da je funkcionalnost polihidroksilnih surfaktanata u stabilizaciji lipidnih nanočestica nedovoljno okarakterisana u dosadašnjim istraživanjima.

Četvrti odeljak posvećen je takrolimusu kao novijoj model lekovitoj supstanci u formulaciji lipidnih nanočestica. Uz detaljan pregled postojeće i dostupne literature, kandidat je predstavio fizičko-hemijske osobine, farmakološki profil, mehanizam delovanja i upotrebu takrolimusa. Detaljnim pregledom literature pružen je uvid u brojne prednosti ove nove model lekovite supstance koja je odobrena od strane Evropske agencije za lekove (eng. *European Medicines Agency, EMA*) i Američke uprave za hranu i lekove (eng. *Food and Drug Administration, FDA*) u lečenju atopijskog dermatitisa kod dece, starije od 2 godine i odraslih pacijenata. U nastavku kandidat se osvrnuo na probleme sa takrolimusom/formulacijom sa takrolimusom za primenu na koži, koja se nalazi na tržištu. Pružen je uvid u brojne prednosti koloidnih lipidnih nanonosača u povećanju obima i penetracije takrolimusa iz u/kroz kožu, a komparativne studije pokazale su da ovi nosači mogu biti superiorniji u poređenju sa formulacijom koja se nalazi na tržištu. Međutim, i pored svih prethodno navedenih prednosti, kandidat ističe podatak da potencijal lipidnih nanočestica kao nosača za dermalnu isporuku takrolimusa, kao i opravdanost primene nejonskih polihidroksilnih surfaktanata u stabilizaciji ovih nosača do danas nisu istraženi. Na taj način, ukazuje se na značaj detaljnijeg ispitivanja funkcionalnosti nejonskih polihidroksilnih surfaktanata u stabilizaciji koloidnih nosača tipa lipidnih nanočestica sa ciljem uvođenja jednog novog koncepta u razvoju formulacija lipidnih nanočestica koje se mogu primenjivati na kožu, zahvaćenoj atopijskim dermatitisom.

Sveukupan CILJ RADA bio je formulacija lipidnih nanočestica stabilizovanih nejonskim polihidroksilnim surfaktantima, sveobuhvatna karakterizacija dobijenih nosača, ispitivanje fizičke stabilnosti i mogućnosti inkorporiranja lekovite supstance.

Ovaj cilj ostvaren je kroz tri jasno definisane faze.

Cilj prve faze bio je formulacija vodenih disperzija čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih nejonskim polihidroksilnim surfaktantima, karakterizacija dobijenih nosača i ispitivanje fizičke stabilnosti. U okviru ove faze sistematski se ispitivao uticaj hemijske strukture surfaktanata na fizičko-hemijske osobine čestica, tj. sposobnost kvašenja površine čestica surfaktantom, veličinu čestica i distribuciju čestica po veličini, zeta potencijal i stepen kristaliniteta lipidnog matriksa.

Cilj druge faze bio je formulacija vodenih disperzija nanostrukturiranih lipidnih nosača stabilizovanih polihidroksilnim surfaktantima, karakterizacija dobijenih nosača i ispitivanje fizičke stabilnosti. U okviru ove faze sistematski se ispitivao uticaj rastućeg udela tečnog lipida (ulja) i hemijske strukture surfaktanata na fizičko-hemijske osobine čestica, tj. veličinu čestica i distribuciju čestica po veličini, zeta potencijal i stepen kristaliniteta čestica.

Cilj treće faze istraživanja, bio je formulacija lipidnih nanočestica sa takrolimusom, kao izabranom model lekovitim supstancom, fizičko-hemijska i biofarmaceutska karakterizacija dobijenih nosača i ispitivanje fizičke stabilnosti. Važan korak u tom pravcu predstavljala je selekcija i karakterizaciju odgovarajućih lipida koji su se koristili kao lipidni matriks čestica, sa ciljem postizanja visokog stepena inkapsulacije lekovite supstance, kao i ispitivanje mogućnosti primene polihidroksilnih surfaktanata u stabilizaciji ovih nosača.

EKSPERIMENTALNI DEO obuhvata *Materijale* u kome su navedene supstance koje su korišćene u eksperimentalnom radu i *Metode*, gde su opisani postupci dobijanja i metode karakterizacije placebo formulacija lipidnih nanočestica i lipidnih nanočestica sa lekovitom supstancom.

Eksperimentalni rad odvijao se u tri faze.

U *prvoj fazi eksperimentalnog rada* ispitivana je mogućnost primene polihidroksilnih surfaktanata, sa bazično različitom hemijskom strukturom, u formiranju i stabilizaciji čvrstih lipidnih nanočestica. Prva faza započeta je selekcijom surfaktanata, a potom nastavljena optimizacijom procesnih parametara za dobijanje vodenih disperzija čvrstih lipidnih nanočestica tehnikom homogenizacije pod visokim pritiskom. Selekcija surfaktanata izvedena je na osnovu goniometrijskih merenja (merenje kontaktnog ugla), dok su za optimizaciju procesnih parametara za dobijanje čvrstih lipidnih nanočestica korišćene tehnike foton korelacione spektroskopije, laserske difrakcije i mikroskopska analiza. Mogućnost primene polihidroksilnih surfaktanata u obrazovanju i stabilizaciji čvrstih lipidnih nanočestica ispitivana je kroz seriju od dvanaest formulacija, u kojima se održavao konstantan odnos čvrstog lipida i surfaktanta. U nastavku ove faze, sprovedena je studija kratkoročne fizičke stabilnosti nosača pri različitim temperaturama čuvanja, kao i studija dugoročne fizičke stabilnosti na sobnoj temperaturi uz primenu tehnika foton korelacione spektroskopije, laserske difrakcije i mikroskopske analize. U okviru ove faze izvršena su merenja elektrokinetičkog (zeta) potencijala čestica, sa ciljem dobijanja informacija o mehanizmu stabilizacije čestica polihidroksilnim surfaktantima. Morfološka karakterizacija čvrstih lipidnih nanočestica, izvedena je tehnikom skenirajuće elektronske mikroskopije. U okviru ove faze izvršena je i strukturna karakterizacija čvrstih lipidnih nanočestica, odnosno određivanje stepena (indeksa) kristaliniteta lipidnog matriksa čestica, tehnikom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije. Paralelno sa ovim ispitivanjem, izvedena je i karakterizacija lipida u „*bulk*” stanju pomenutom termalnom tehnikom.

Druga faza eksperimentalnog rada obuhvatila je ispitivanje uticaja različitiog udela tečnog lipida (ulja) kao i ispitivanje uticaja hemijske strukture polihidroksilnih surfaktanata na obrazovanje i stabilizaciji vodenih disperzija nanostrukturiranih lipidnih nosača. Za dobijanje pomenutih formulacija, kao i u prvoj fazi koristila se tehnika homogenizacije pod visokim pritiskom. Karakterizacija dobijenih formulacija izvedena je kroz određivanje veličine čestica, distribucije čestica po veličini, mikroskopskom analizom, određivanjem elektrokinetičkog (zeta) potencijala i stepena (indeksa) kristaliniteta čestica. Ispitivanje uticaja udela tečnog lipida (ulja) i hemijske strukture surfaktanata u obrazovanju i stabilizaciji nanostrukturiranih lipidnih nosača ispitivana je kroz seriju od osamnaest formulacija, u kojima se održavao konstantan odnos između smeše čvrstog i tečnog lipida koja se koristila kao lipidni matriks čestica i surfaktanta. Ova faza imala je za cilj procenu mogućnosti upotrebe nejonskih polihidroksilnih surfaktanata u stabilizaciji nanostrukturiranih lipidnih nosača sa rastućim udelom tečnog lipida (ulja) u lipidnom matriksu, sa ciljem razvoja „*tailor-made*” lipidnih nanonosača koji bi se koristiti za inkapsulaciju lekovitih i kozmetički aktivnih supstanci.

U okviru *treće faze eksperimentalnog rada* razvijene su konačne formulacije lipidnih nanočestica sa polihidroksilnim surfaktantima, koje su se koristile kao nosači za model lekovitu supstancu, takrolimus. U ovoj fazi ispitana je mogućnost primene teorijskog pristupa u selekciji odgovarajućih lipida koji su se koristili kao matriks lipidnih nanočestica kojim se postiže visok stepen inkapsulacije nosača lekovitom supstancom. Pored toga, izvedena je opsežna fizičko-hemijska karakterizacija izabranih lipida i procena potencijalnih interakcija između lipida i model lekovite supstance. Procenom fizičke stabilnosti pripremljenih formulacija (kroz praćenje veličine čestica, distribucije čestica po veličini, zeta potencijala i

kroz primenu mikroskopske analize) ispitan je potencijal izabranog surfaktanta u stabilizaciji lipidnih nanočestica sa model lekovitom supstancom. Dodatno, studija oslobađanja u *in vitro* uslovima primenjena je u ispitivanju izrađenih formulacija lipidnih nanočestica i nanoemulzije (kao poredbene formulacije). Pored toga, na osnovu rezultata ove faze rada procenjivalo se da li se varijacijama u sastavu lipidnog matriksa nanonosaa može uticati na profile oslobađanje model lekovite supstance, odnosno koji uzorak bi se mogao koristiti kao funkcionalni nosač u preparatima za primenu na kožu zahvaćenu atopijskim dermatitisom.

Dobijeni rezultati prikazani su u delu **REZULTATI I DISKUSIJA** na 99 stranica teksta, kroz 77 grafičkih prikaza i 18 tabela, kroz sledeće odeljke: *Prva faza eksperimentalnog rada* (prikazani su rezultati merenja kontaktnog ugla (goniometrijska merenja), pripreme vodenih disperzija čvrstih lipidnih nanočestica sa polihidroksilnim surfaktantima, ispitivanja fizičke stabilnosti pripremljenih disperzija kroz kratkoročnu studiju fizičke stabilnosti (pri različitim temperaturama čuvanja) i dugoročnu studiju fizičke stabilnosti (na sobnoj temperaturi), ispitivanja površinskog naelektrisanja, morfologije i strukture čvrstih lipidnih nanočestica); *Druga faza eksperimentalnog rada* (prikazani su rezultati karakterizacije lipida i surfaktanta u „bulk” stanju uz primenu termalne analize, priprema disperzija nanostrukturiranih lipidnih nosaa stabilizovanih polihidroksilnim surfaktantima, analize veličine čestica i fizičke stabilnosti nosaa, ispitivanje površinskog naelektrisanja i strukturna karakterizacija nosaa); *Treća faza eksperimentalnog rada* (prikazani su rezultati selekcije i karakterizacije lipida koji su se koristili kao lipidni matriks nanočestica, izračunavanje parametara rastvorljivosti i analiza podataka uz primenu teorijskog pristupa, karakterizacija čvrstih lipida i smeše čvrstih lipida sa model lekovitom supstancom uz primenu termalne analize i difrakcije X-zraka pod širokim uglom, formulacija lipidnih nanonosaa sa lekovitom supstancom, karakterizacija lipidnih nanonosaa sa lekovitom supstancom, *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanje supstance iz lipidnih nanonosaa i primena matematičkih modela u proceni profila brzine oslobađanja). Za određivanje procenta oslobođene lekovite supstance primenjena je tečna hromatografija pod visokim pritiskom.

Paralelno sa prikazanim rezultatima, kandidat je izneo detaljnu analizu i tumačenje dobijenih rezultata, shodno postavljenim ciljevima, uzimajući u obzir i raspoložive literaturne podatke.

Na kraju doktorske disertacije dat je **ZAKLJUČAK**, izveden na osnovu dobijenih rezultata istraživanja i njihove analize.

U poglavlju **LITERATURA** navedena je 301 referenca citirana harvardskim stilom.

B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Rezultati doktorske disertacije podeljeni su u tri celine, shodno postavljenim ciljevima.

U okviru prvog dela prikazani su rezultati merenja kontaktnog ugla, koji pružaju korisne informacije o sposobnosti kvašenja čvrstog lipida rastvorom surfaktanta, tj. indirektno ukazuju na afinitet surfaktanta za površinu čestice. Ovako dobijeni podaci korišćeni su za dalji razvoj disperzija čvrstih lipidnih nanočestica, primenom metode homogenizacije pod visokim pritiskom. Metod homogenizacije pod visokim pritiskom omogućio je smanjenje veličine čestica i sužavanje distribucije čestica po veličini. Na osnovu prethodno dobijenih rezultata postavljeni su optimalni procesni parametri za pripremu disperzija čvrstih lipidnih nanočestica.

Sveobuhvatna karakterizacija čvrstih lipidnih nanočestica tehnikama foton korelacione spektroskopije, laserske difrakcije i mikroskopskom analizom u prvoj fazi pružila je korisne informacije o funkcionalnosti polihidroksilnih surfaktanata u formulaciji ovih nosaa.

Pokazano je da su surfaktanti, koji imaju afinitet za površinu čestica i veliku difuzionu brzinu na novostvorene površine, efikasni stabilizatori čvrstih lipidnih čestica. Posebna pažnja bila je posvećena ispitivanju uticaja hemijske strukture surfaktanata na karakteristike čvrstih lipidnih nanočestica. Na osnovu dobijenih rezultata uočeno je da se korišćenjem literaturnih podataka, koji su vezani za hemijsku strukturu surfaktanata (dužina alkil lanca, stepen esterifikacije, stepen izomerizacije i HLB vrednost), kao i vrednosti kontaktnog ugla koja se dobija eksperimentalnim putem, u izvesnoj meri može ograničiti obim eksperimentalnog rada prilikom izbora potencijalnih kandidata iz grupe polihidroksilnih surfaktanata za stabilizaciju čvrstih lipidnih nanočestica. Pored toga, uočeno je da su hemijska struktura, odnosno dužina alkil lanca i stepen esterifikacije surfaktanata imali izvestan uticaj na kristalizaciono ponašanje lipidnih nanočestica. Usled promena u kristalizacionom ponašanju čestica došlo je i do izvesnih promena u njihovom površinskom naelektrisanju. Uz to, uočeno je da je došlo do smanjenja temperature topljenja i stepena kristaliniteta lipida u „*bulk*” stanju u odnosu na lipid u čvrstim nanočesticama. Rezultati studije fizičke stabilnosti ukazali su da je korišćenjem niskih koncentracija polihidroksilnih surfaktanata (1% (m/m)) (sa izuzetkom saharoza polilaurata i saharoza polistearata) bilo moguće uspešno formulisati fizički stabilne disperzije čvrstih lipidnih nanočestica prosečnog dijametra u intervalu od 150 do 200 nm, koje su posedovale usku i monomodalnu distribuciju čestica po veličini.

Na osnovu rezultata prve faze, za drugu fazu izabrana su tri surfaktanata koji poseduju bazično različitu hemijsku strukturu i ispitana njihova funkcionalnost u formulaciji nanostrukturiranih lipidnih nosača sa različitim udelom tečnog lipida (ulja) u matriksu. Formulacija ispitivanih sistema započeta je optimizacijom procesnih parametara za dobijanje nosača koja je izvedena na homogenizatoru pod visokim pritiskom, a nastavljena kroz mikroskopsku analizu uzoraka i određivanje veličine čestica i distribucije čestica po veličini tehnikama foton korelacione spektroskopije i laserske difrakcije.

Rezultati studije fizičke stabilnosti ponovo su ukazali na činjenicu da su polihidroksilni surfaktanti iz različitih hemijskih grupa upotrebljeni u niskoj koncentraciji (1% (m/m)) posedovali dobru funkcionalnost u stabilizaciji disperzija nanostrukturiranih lipidnih nosača. Uzimajući u obzir podatak da se nanostrukturirani lipidni nosači razlikuju od čvrstih lipidnih nanočestica u sastavu lipidnog matriksa, uočen je izvestan uticaj tečnog lipida (ulja) u matriksu čestica na njenu kristalnu strukturu. Prisustvo viših koncentracija tečnog lipida u čvrstom lipidu u „*bulk*” stanju dovelo je do smanjenja sposobnosti kristalizacije čvrstog lipida. Isti efekat je uočen i kada je lipid iz „*bulk*” stanja preveden u nanoveličinu, što je potvrđeno kroz rezultate termalne analize. Sem toga, uočeno je da je temperatura topljenja nanonizovanog lipidnog matriksa bila znatno ispod temperature topljenja lipidnog materijala u „*bulk*” stanju. Pored uticaja tečnog lipida (ulja), uočeno je da je i hemijska struktura surfaktanata (dužina alkil lanca) imala izvestan uticaj na veličinu, površinsko naelektrisanje i stepen kristaliniteta čestica.

Rezultati treće faze eksperimentalnog rada posvećeni su formulaciji lipidnih nanonosaa sa model aktivnom supstancom i farmaceutsko-tehnološkoj i biofarmaceutskoj karakterizaciji. U fokusu ovog dela studije bila je selekcija i karakterizacija lipida koji su se koristili kao lipidni matriks nanonosaa. Odabir lipida sa zadovoljavajućom sposobnosti rastvaranja model supstance izveden je primenom teorijskog pristupa, koji se bazira na izračunavanju parametara rastvorljivosti u kombinaciji sa eksperimentalnim pristupom. Nakon analize dobijenih rezultata, uočeno je da postoji dobro slaganje između eksperimentalnih rezultata i izračunatih parametara rastvorljivosti. Na osnovu prethodno dobijenih rezultata uspešno su formulisane disperzije čvrstih lipidnih nanočestica, nanostrukturiranih lipidnih nosača i nanoemulzija (poredbena formulacija) sa model aktivnom supstancom, čime je još jednom

potvrđena mogućnost korišćenja polihidroksilnih surfaktanata u formulaciji i stabilizaciji različitih vrsta lipidnih nanonosača.

U sledećem delu ove faze eksperimentalnog rada sprovedena je fizičko-hemijska i biofarmaceutska karakterizacija dobijenih nosača. Zadovoljavajuća fizička stabilnost svih ispitivanih formulacija sa model lekovitom supstancom se pripisala visokom afinitetu surfaktanta za lipidni matriks nanočestica, i visokim vrednostima elektrokinetičkog (zeta) potencijala. Rezultati dobijeni u okviru *in vitro* ispitivanja brzine oslobađanja model supstance iz lipidnih nanonosača ukazali su generalno na značaj izbora komponenata koje ulaze u sastav lipidnog matriksa nanočestica na brzinu oslobađanja supstance.

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Rezultati dobijeni i predstavljeni u okviru prve faze rada ukazali su na činjenicu da merenje kontaktnog ugla rastvora surfaktanta na lipidu, koji se koristi kao matriks lipidnih nanočestica pruža korisne informacije prilikom izbora efikasnog stabilizatora što je u saglasnosti sa navodima *Pardeike i saradnici (2011)*. Sniženje kontaktnog ugla povezano je sa povećanjem disperzibilnosti čvrstog lipida u vodenom disperzionom medijumu (*Parfitt, 1973*). U skladu sa rezultatima prethodnih studija (*Lippacher i saradnici, 2001; Mehnert i Mäder, 2012; Muchow i saradnici, 2008*), pokazano je da se uz adekvatan izbor formulacionih parametara topla homogenizacija pod visokim pritiskom može smatrati efikasnom metodom za dobijanje disperzija čvrstih lipidnih nanočestica, prosečnog dijametra oko i ispod 200 nm, koje poseduju usku i monomodalnu distribucije čestica po veličini. Sa povećanjem broja ciklusa homogenizacije u svim ispitivanim formulacijama uočeno je smanjenje veličine čestica do određene granice, nakon čega svaki dalji unos energije u sistem nije vodio značajnijem smanjenju veličine ili je čak rezultovao obrazovanjem čestica većeg dijametra. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa navodima *Jahnke (1998)* koji ovaj fenomen objašnjava dostizanjem tzv. platoa u toku homogenizacije.

Najbolju funkcionalnost u stabilizaciji čvrstih lipidnih nanočestica ispoljili su surfaktanti sa višim HLB brojem, nižim kontaktnim uglom na lipidnom filmu i manjom molekulskom masom. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima *Mehner i Mäder (2012)* prema kojima će surfaktantima sa manjom molekulskom masom trebati manje vremena za redistribuciju na novostvorene površine čestica u odnosu na surfaktante sa višom molekulskom masom. Poznato je da rastvori surfaktanata/stabilizatora sa nižim kontaktnim uglom na lipidnom filmu u većoj meri snižavaju međupovršinski napon između lipidnog matriksa i vodenog disperzionog medijuma (*Parfitt, 1973*), te se stoga prema mišljenju *Pardeike i saradnici (2011)* oni preporučuju kao stabilizatori izbora pri formulacijama disperzija lipidnih nanočestica (tj. nanostrukturiranih lipidnih nosača).

Nakon 30 dana čuvanja disperzija čvrstih lipidnih nanočestica na različitim temperaturama ($5\pm 3^{\circ}\text{C}$, $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, $40\pm 2^{\circ}\text{C}$), veličina čestica i distribucija čestica po veličini bili su gotovo identični vrednostima dobijenim neposredno nakon izrade. Ovakvi rezultati donekle su očekivani, obzirom na navode iz literature (*Söderman i Johansson, 1999*) prema kojima na povišenoj temperaturi ne dolazi do dehidracije molekula polihidroksilnih surfaktanata usled jakih vodoničnih veza između hidroksilnih grupa u molekulu ovih surfaktanata i vode. Sa druge strane *Yadav i saradnici (2013)* navode da se upravo sa povećanjem temperature verovatnoća da dođe do agregacije čestica povećava. *Pardeike i Müller (2010)* takođe navode da povećanje temperature vodi ka smanjenju dinamičkog viskoziteta odnosno povećanju difuzione konstante što može da poveća verovatnoću kontakta između čestica i da dovede do agregacije u sistemu.

Tokom 180 dana čuvanja uzoraka na sobnoj temperaturi došlo je do povećanja veličine čestica u formulacijama u kojima su vrednosti indeksa kristalizacije bile visoke. *zur Mühlen, (1996)* je zapazila da usled sudara čestica i delimične destrukcije filma surfaktanta, dolazi do „premošćavanja” čestica tj. obrazovanja većih čestica, što vodi povećanju indeksa kristalizacije i nestabilnosti sistema.

Zeta potencijal kao odraz visine Nernstovog potencijala (površinski potencijal) čestica i dodatnih naelektrisanja kreiranih od strane adsorbovanih jona ili molekula stabilizatora ili surfaktanta u Stern-ovom sloju, menjao se sa promenom hemijske strukture surfaktanata. Treba naglasiti da ne postoji veliki broj radova koji se bavi poređenjem hemijske strukture surfaktanata i zeta potencijala. Uočene razlike u vrednostima zeta potencijala u ovom radu zavisile su od dužine i broja alkil lanaca upotrebljenog surfaktanta, i objasnile su se različitom interakcijom surfaktanata i lipida, tj. različitom organizacijom molekula surfaktanata na površini lipidnih nanočestica.

U prisustvu surfaktanata sa kraćim alkil lancem u strukturi, koji se dobro rastvaraju u vodi uočene su najviše razlike u vrednostima zeta potencijala u vodi u odnosu na originalni disperzioni medijum. Prema mišljenju *Mishra i saradnici (2009)* prilikom razblaženja originalne disperzije nanokristala sa vodom može doći do desorpcije surfaktanta sa površine čestica, a verovatnoća desorpcije surfaktanata se povećava sa povećanjem rastvorljivosti surfaktanta u vodi. Sličan princip, može se reći, važi i kod lipidnih nanočestica.

Vrednosti zeta potencijala u svim ispitivanim formulacijama bile su iznad -30 mV, što shodno literaturnim navodima (*Müller, 1996*) odgovara vrednostima potrebnim za postizanje zadovoljavajuće fizičke stabilnosti. Međutim, nasuprot ovom podatku i pored visokih vrednosti zeta potencijala u formulacijama koje sadrže poliestre saharoze nije ispoljena zadovoljavajuća fizička stabilnost. Prema literaturnim navodima (*McClements, 2012*) zeta potencijal se ne može smatrati jedinim pokazateljom fizičke stabilnosti lipidnih nanočestica, zbog toga što promene u lipidnoj modifikaciji mogu dovesti do promena u obliku čestica (pr. iz sfernog u štapičasti), što posledično može da dovede do nestabilnosti sistema.

Rezultati dobijeni i predstavljeni u okviru druge faze rada ukazali su ponovo na dobru funkcionalnost polihidroksilnih surfaktanata u niskim koncentracijama (1% (m/m)) u toku formiranja nanostrukturiranih lipidnih nosača sa rastućim udelom tečnog lipida (ulja) u lipidnom matriksu. Ovakvi rezultati nisu u saglasnosti sa nalazima *Das i saradnici (2014)* koji navode da generalno u formulaciji lipidnih nanočestica pripremljenih sa niskim koncentracijama surfaktanata dolazi do obrazovanja agregata tokom čuvanja uzoraka, usled nedovoljno odbojnih sila, potrebnih da spreče privlačenja između čestica.

Čestice nešto većeg dijametara dobijene su u formulacijama nanostrukturiranih lipidnih nosača u odnosu na čvrste lipidne nanočestice. U studiji koju su izveli *Jores i saradnici (2004)* takođe je uočeno izvesno povećanje veličine čestica u formulacijama nanostrukturiranih lipidnih nosača u odnosu na čvrste lipidne nanočestice.

Nakon čuvanja uzoraka na sobnoj temperaturi tokom 180 dana u formulacijama stabilizovanim surfaktantima sa dužim alkil lancem sa povećanjem udela tečnog lipida u lipidnom matriksu iznad 30% (m/m), uočeni su znaci nestabilnosti. Uočeno promene u fizičkoj stabilnosti u zavisnosti od udela tečnog lipida (ulja) u matriksu, mogu se delimično dovesti u korelaciju sa sa prethodno opisanim rezultatima *Lin i saradnika (2007)*, odnosno sa isključenjem tečnog lipida (ulja) iz lipidnog matriksa čestica koji može da dovede do destabilizacije sistema. Međutim, nasuprot ovim nalazima, u svim formulacijama nanostrukturiranih lipidnih nosača stabilizovanih surfaktantom sa kratkim alkil lancem nisu uočeni znaci fizičke nestabilnosti nezavisno od udela tečnog lipida (ulja) u matriksu.

Elektrokinetički (zeta) potencijal u formulacijama nanostrukturiranih lipidnih nosača je nešto viši u odnosu na formulacije čvrstih lipidnih nanočestica, verovatno usled promena u površinskim karakteristikama čestica sa dodatkom tečnog lipida (ulja). Sa povećanjem udela

tečnog lipida u lipidnom matriksu čestica uočava se da dolazi do neznatnog povećanja u vrednostima zeta potencijala. Slični rezultati opisani su u prethodnoj studiji, koju su izveli *Teeranachaidekul i saradnici (2007)*.

Rezultati termalne analize ukazali su na sniženje temperature topljenja i entalpije topljenja u formulacijama nanostrukturiranih lipidnih nosača u poređenju sa čvrstim lipidnim nanočesticama. Ovakav rezultat u saglasnosti je sa velikim brojem radova u ovoj oblasti i objašnjava se dodatkom tečnog lipida u čvrsti lipidni matriks, što vodi sniženju temperature topljenja i entalpije topljenja lipida u „*bulk*” stanju i u nanodimenzijama. Razlike u obliku DSC krivih koje su dobijene nakon termalne analize, ukazale su na činjenicu da tip surfaktanta u velikoj meri utiče na unutrašnju strukturu čvrstih lipidnih nanočestica. Slični rezultati dobijeni su u studijama koje su izveli *Awad i Sato (2001; 2002)* koji su takođe ukazali na činjenicu da u u/v emulzijama koje sadrže emulgatore sa dugim zasićenim lancima masnih kiselina, povećana krsitalizaciona tendencija dispergovane faze se može dovesti u vezu sa formiranjem templata emulgatora u kapljicama ulja.

Dalja ispitivanja mogućnosti inkorporiranja aktivne supstance (takrolimus) u lipidne nanočestice i nanoemulzije, kao i ispitivanje funkcionalnosti polihidroksilnih surfaktanata u stabilizaciji ovih nosača pružila su interesantne podatke koji do sada nisu opisani u literaturi. Teorijski pristup koji se bazira na izračunavanju parametara rastvorljivosti u kombinaciji sa eksperimentalnim pristupom pružio je zadovoljavajuću korelaciju. Do sada u oblasti lipidnih nanočestica, za određivanje rastvorljivosti lekovite supstance u lipidnim ekscipijensima u cilju selekcije adekvatnog lipidnog matriksa uz primenu ovog pristupa ima veoma malo publikovanih rezultata. Dobra korelacija između eksperimentalno određene rastvorljivosti model supstance u lipidnim ekscipijensima i teorijski izračunatih parametara rastvorljivosti zabeležena je u radovima koje su izveli *Li i saradnici (2006); Shah i saradnici (2013)*.

Literatura:

Awad T, Sato K. Effects of hydrophobic emulsifier additives on crystallization behavior of palm oil mid fraction in oil-in-water emulsion. *J Am Oil Chem Soc.* 2001; 78: 837–842.

Awad T, Sato K. Acceleration of crystallization of palm kernel oil in oil-in-water emulsion by hydrophobic emulsifier additives. *Colloid Surfac B.* 2002; 25:45–53

Das S, Kiong Ng W, Tan RBH. Sucrose ester stabilized solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: I. Effect of formulation variables on the physicochemical properties, drug release and stability of clotrimazole-loaded nanoparticles. *Nanotechnology* 2014; 25: 105101 (14pp).

Jores K, Mehnert W, Drechsler M, Bunjes H, Johann C, Mäder K. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. *J Control Rel.* 2004; 95: 217–227.

Li Y, Taulier N, Rauth AM, Wu XY. Screening of lipid carriers and characterization of drug-polymer-lipid interactions for the rational design of polymer-lipid hybrid nanoparticles (PLN). *Pharm Res.* 2006; 23 (8): 1877-1887.

Lin X, Li X, Zheng L, Yu L, Zhang Q, Liu W. Preparation and characterization of monopalmitate nanostructured lipid carriers. *Colloid Surface A.* 2007; 311(1-3): 106-111.

Jahnke S. The theory of high pressure homogenization. In: Müller RH, Benita S, Böhm B (Ed.) Emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 1998: 177-200.

Lippacher A, Müller RH, Mäder K. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm.* 2001; 214(1-2): 9-12.

McClements DJ. Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: implications for emulsion based delivery systems. *Adv Colloid Interfac.* 2012; 174: 1-30.

Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliver Rev.* 2012; 64, 83–101.

Mishra, P. R., Al Shaal, L., Müller, R. H., Keck, C. M., Production and characterization of Hesperitin nanosuspensions for dermal delivery, *Int J Pharm.* 2009; 371: 182-189.

Muchow M, Maincent P, Müller RH. Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN[®], NLC[®], LDC[®]) for oral drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm.* 2008; 34(12): 1394–1405.

Müller RH. Zetapotential und Partikeladung in der Laborpraxis, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1996.

Pardeike J, Weber S, Haber T, Wagner H, Zarfl P, Plank H, Zimmer A. Development of an Itraconazole-loaded nanostructured lipid carrier (NLC) formulation for pulmonary application. *Int J Pharm.* 2011; 419(1–2): 329-338.

Pardeike J, Müller RH. Nanosuspensions: A promising formulation for the new phospholipase A2 inhibitor PX-18. *Int J Pharm.* 2010; 391(1-2):322-329.

Parfitt GD. Dispersion of Powders Liquids, 2nd ed., Wiley, New York, 1973.

Shah M, Agrawal Y. High throughput screening: an in silico solubility parameter approach for lipids and solvents in SLN preparations. *Pharm Dev Technol.* 2013; 18(3): 582-590.

Söderman O, Johansson I. Polyhydroxyl-based surfactants and their physico-chemical properties and applications. *Curr Opin Colloid In.* 1999; 4(6): 391-401.

Teeranachaidekul V, Souto EB, Junyaprasert VB, Müller RH. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of coenzyme Q₁₀ – development, physicochemical characterization and in vitro release studies. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007; 67: 141-148.

Yadav N, Khatak S, Singh Sara UV. Solid lipid nanoparticles – a review. *Int J App Pharm.* 2013; 5(2): 8-18.

zur Mühlen A. Feste lipid nanopartikel mit prolongierter wirkstoffiberation. PhD thesis. Berlin, Germany, Free University of Berlin, Institute of Pharmacy, 1996.

D. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

A. Radovi objavljeni u međunarodnom časopisu

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21)

1. **Kovacevic A**, Savic S, Vuleta G, Müller RH, Keck, CM. Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on the particle size, physical stability and particle matrix structure. *International Journal of Pharmaceutics* 2011, 406, 163-172 (doi:10.1016/j.ijpharm.2010.12.036) (IF (2011): 3,350) (60/261)
2. Keck, CM. **Kovačević A**, Müller RH, Savić S, Vuleta G, Milić J. Formulation of solid lipid nanoparticles (SLN): The value of different alkyl polyglucoside surfactants. *International Journal of Pharmaceutics* 2014, 474 (1-2), 33-41 (doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.08.008) (IF 3,785) (45/254)

Rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22)

3. **Kovačević A**, Müller RH, Savić S, Vuleta G, Keck, CM. Solid lipid nanoparticles (SLN) stabilized with polyhydroxy surfactants: Preparation, characterization and physical stability investigation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2014, 444, 15-25 (doi: 10.1016/j.colsurfa.2013.12.023). (IF 2,354) (59/136)

B. Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33)

1. **Kovacevic A**, Savic S, Vuleta G, Müller RH, Keck CM. Oil loaded lipid nanoparticles stabilized with polyglycerol fatty acid esters: a physico-chemical characterization. 7th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Valetta, Malta, 08 – 11.03.2010. (CD ROM).
2. **Kovacevic A**, Müller RH, Savic S, Vuleta G, Keck CM. Preparation and characterization of alkylpolyglucoside - based solid lipid nanoparticles The 38th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, Maryland, USA, 30.7 – 3.8.2011. (usmeno izlaganje)
3. **Kovacevic A**, Isailovic T, Milic J, Vuleta G, Savic S. Formulacija nanoemulzija variranjem tipa surfaktanta pripremljenih homogenizacijom pod visokim pritiskom II Kongres farmaceuta Bosne i Hercegovine sa međunarodnim učešćem, Banja Luka, Republika Srpska, 17-20.11.2011., 256-258. (knjiga abstrakata)
4. **Kovacevic A**, Milinkovic J, Milic J, Vuleta G, Savic S. Formulacija nanoemulzija sa visokim udelom masne faze II Kongres farmaceuta Bosne i Hercegovine sa međunarodnim učešćem, Banja Luka, Republika Srpska, 17-20.11.2011., 259-261. (knjiga abstrakata)

5. **Kovacevic A**, Milic J, Vuleta G, Isailovic T, Milinkovic J, Savic S. Formulation and physical stability evaluation of a polyhydroxy surfactant stabilized nanoemulsions with varying oil content. 8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Istanbul, Turkey, 19 - 22.03.2012., P 117.
6. **Kovacevic AB**, Müller RH, Savic SD, Vuleta GM, Keck CM. Successful formulation of solid lipid nanoparticles (SLN) using polyhydroxy surfactants. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 40, Honolulu/Hawaii, 21-24.07.2013., #409.
7. **Kovacevic A**, Müller RH, Savic S, Milic J, Vuleta G, Keck CM. Lipid nanoparticles stabilized with an alkyl polyglucoside surfactant for dermal delivery of tacrolimus, 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Lisbon, 31.3.-3.04.2014., p. 36, #234.
8. **Kovacevic A**, Müller RH, Savic S, Vuleta G, Milic J, Keck CM. Sugar esters for the formulation of lipid nanoparticles, 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics & Pharmaceutical Technology, Lisbon, 31.3.-3.4.2014., p. 24, #11,

E. ZAKLJUČAK - OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DISERTACIJE

Predmet proučavanja doktorske disertacije bio je ispitivanje mogućnosti primene polihidroksilnih surfaktanata u formulaciji lipidnih nanočestica i farmaceutsko-tehnološka karakterizacija dobijenih nosača sa aspekta potencijalne primene kao nosača za model lekovitu supstancu (takrolimus).

Utvrđeno je da su uspešno formulisane vodene disperzije lipidnih nanočestica (čvrste lipidne nanočestice i nanostrukturirani lipidni nosači) stabilizovane polihidroksilnim surfaktantima različite hemijske strukture u koncentracijama nižim od koncentracija u kojima se koriste konvencionalni polietoksilovani surfaktanti. Razlike u karakteristikama upotrebljenih surfaktanata (u prvom redu HLB broj i hemijska struktura tj. dužina alkil lanca) imali su uticaj na karakteristike i fizičku stabilnost nosača.

Ispitivanje fizičke stabilnosti lipidnih nanočestica u vremenskom periodu od 30 dana pri različitim temperaturama čuvanja pokazalo je da su promene u veličini i distribuciji čestica po veličini bile zanemarljive, što je važan rezultat sa aspekta buduće primene pomenutih nosača u razvoju finalnih formulacija za primenu na koži koje sadrže lipidne nanočestice. Na osnovu analize fizičke stabilnosti lipidnih nanočestica u vremenskom periodu od 180 dana pokazano je da su prvenstveno razlike u karakteristikama surfaktanata bile odgovorne za promene u fizičkoj stabilnosti nosača.

Analiza površinskog potencijala čestica izvršena je merenjem zeta potencijala, na osnovu čega je pokazano da su i elektrostatički i sterna mehanizmi istovremeno uključeni u stabilizaciju čestica, kao i da je sterna stabilizacija dominantan mehanizam. Elektrostatička stabilizacija se ostvaruje preko formiranja električnog dvostrukog sloja, koji je sličan onom kod jonskih surfaktanata, a nastaje usled privlačenja potencijalno negativno naelektrisanih hidroksilnih jona. Ipak kako su polihidroksilni surfaktanti nejonski stabilizatori, usled adsorpcije surfaktanta oko čestica formira se sterna barijera, koja ometa privlačenje i agregaciju čestica i posledično povećava stabilnost sistema.

Termalnom analizom ispitivana je struktura lipidnog matriksa u „*bulk*” stanju i u lipidnim nanočesticama, kao i uticaj hemijske strukture surfaktanata na indeks kristalizacije čestica. Pokazano je da u svim formulacijama dolazi do smanjenja indeksa kristalizacije lipida u nanočesticama u odnosu na lipid u „*bulk*” stanju, kao i da postoji dobro slaganje između hemijske strukture (tj. dužine alkil lanca surfaktanata) i indeksa kristalizacije lipidnog matriksa čestica.

Uočeno je dobro slaganje eksperimentalno određene rastvorljivosti model lekovite supstance (takrolimus) u lipidnom matriksu i teorijski izračunatih parametara rastvorljivosti.. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja brzine oslobađanja takrolimusa iz lipidnih nanočestica i nanoemulzije (poredbena formulacija) pokazano je da postoji mogućnost postizanja i trenutnog i usporenog oslobađanja leka iz lipidnih nanonosaa, promenom sastava lipidnog matriksa, tj. dodatkom različitih količina tečnog lipida (ulja), čime se otvara mogućnost razvoja panela nanonosaa sa željenim profilima oslobađanja lekovite supstance.

F. PREDLOG KOMISIJE ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

Uvidom u rezultate završene disertacije, može se konstatovati da je kandidat uspešno ostvario postavljene ciljeve, što je potkrepljeno objavljivanjem rezultata disertacije u tri rada u relevantnim međunarodnim časopisima (*International Journal of Pharmaceutics i Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*).

Na osnovu svega izloženog može se zaključiti da je kandidat ispunio ciljeve postavljene u okviru doktorske disertacije pod nazivom „**Lipidne nanočestice stabilizovane nejonskim polihidroksilnim surfaktantima: postupak dobijanja, karakterizacija, stabilnost i inkorporiranje lekovite supstance**”, te predlažemo Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta da prihvati Izveštaj i omogući kandidatu dipl. farm. Anđelki Kovačević da pristupi odbrani doktorske disertacije.

Beograd, 29.08.2014.

Članovi Komisije

Dr Snežana Savić, vanredni profesor, mentor, predsednik komisije
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr Gordana Vuleta, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Jela Milić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Cornelia M. Keck, redovni profesor (full professor)
Applied Pharmacy Division, University of Applied Sciences Kaiserslautern, Germany

Dr Rainer H. Müller, redovni profesor (full professor)
Institute of Pharmacy, Free University of Berlin, Germany