

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Ivana N. Pantelić

DERMALNA RASPOLOŽIVOST LEKOVA  
SA ANTIINFLAMATORNIM DELOVANJEM  
IZ PODLOGA SA ŠEĆERNIM  
EMULGATOROM: KOMPARATIVNA  
PRIMENA METODA *IN VITRO* / *IN VIVO*  
KARAKTERIZACIJE

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2013

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET



Ivana N. Pantelić

DERMALNA RASPOLOŽIVOST LEKOVA  
SA ANTIINFLAMATORNIM DELOVANJEM  
IZ PODLOGA SA ŠEĆERNIM  
EMULGATOROM: KOMPARATIVNA  
PRIMENA METODA *IN VITRO* / *IN VIVO*  
KARAKTERIZACIJE

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Ivana N. Pantelić

DERMAL BIOAVAILABILITY OF ANTI-  
INFLAMMATORY DRUGS FROM SUGAR  
EMULSIFIER STABILIZED BASES:  
COMPARATIVE APPLICATION OF *IN*  
*VITRO* / *IN VIVO* CHARACTERIZATION  
METHODS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta; deo rada urađen je na Institutu za farmaceutsku tehnologiju Eberhard-Karls Univerziteta u Tibingenu, Nemačka

MENTOR

\_\_\_\_\_  
Dr Snežana Savić, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

1. \_\_\_\_\_  
Dr Jela Milić, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

2. \_\_\_\_\_  
Dr Gordana Vuleta, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

3. \_\_\_\_\_  
Dr Rolf Daniels, redovni profesor,  
Eberhard Karls Univerzitet, Tibingen, Nemačka

4. \_\_\_\_\_  
Dr Sonja Vesić, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

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

Najiskrenije se zahvaljujem mentoru, *prof. dr Snežani Savić*, na svesrdnoj pomoći u svakoj fazi izrade ove doktorske disertacije, permanentnoj motivaciji i bezrezervnom ličnom angažovanju.

Veliku zahvalnost dugujem *prof. dr Jeli Milić* i *prof. dr Gordani Vuleta* čije je znanje i iskustvo doprinelo konačnom uobličavanju disertacije.

Neizmerno se zahvaljujem *prof. dr Rolfu Danielsu* na ukazanoj prilici da se deo eksperimentalnog rada sprovede na Institutu za farmaceutsku tehnologiju Eberhard Karls Univerziteta u Tibingenu, čime je značajno unapređen kvalitet ove disertacije i zajedničkih publikacija koje su iz nje proistekle. Iskreno se zahvaljujem i *Klausu Wayhingu* na stručnoj pomoći oko sprovođenja datih eksperimenata.

Zahvaljujem se *prof. dr Sonji Vesić* na iskrenoj saradnji tokom izrade ove doktorske disertacije.

Kolegama sa Katedre za farmaceutsku hemiju i Katedre za analitiku lekova, *doc. dr Bojanu Markoviću* i *doc. dr Anđeliji Malenović* dugujem veliku zahvalnost za pomoć u realizaciji dela eksperimentalnog rada.

Posebno se zahvaljujem svim kolegama sa Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, koji su se često našli i u ulozi mojih ispitanika, na razumevanju i podršci tokom izrade ove doktorske disertacije. Među njima, moram izdvojiti *asist. Milicu Lukić* koja je uvek bila tu da, kao pravi prijatelj, pomogne oko eksperimentalnog rada i diskusije dobijenih rezultata.

***Konačno, najveću zahvalnost dugujem svom suprugu i porodici koji su uvek bili tu da pruže bezrezervnu ljubav, podršku i motivaciju tokom mog celokupnog školovanja.***

# Dermalna raspoloživost lekova sa antiinflamatornim delovanjem iz podloga sa šećernim emulgatorom: komparativna primena metoda *in vitro/in vivo* karakterizacije

## SAŽETAK

**Uvod** Aktuelna farmakoekonomska situacija ima za posledicu čest nedostatak lekova u potrebnim dozama/jačinama, a za neke lekovite supstance nisu odabrani pogodni nosači. Značaj primene odgovarajućeg vehikuluma/podloge naročito je izražen u slučaju lekova koji se primenjuju na koži. Ova grupa lekova podložna je i uticajima koji dolaze iz kozmetičke industrije, a odnose se na zadovoljavajući izgled, teksturu i senzorne karakteristike nosača, što se direktno reflektuje u kojoj meri će se pacijenti pridržavati propisanoj terapiji. Nedostatak lekova na tržištu može se prevazići izradom lekova u apoteci čime se, čak i u zemljama sa veoma razvijenom farmaceutskom industrijom, ponovo potencira značaj znanja i veština farmaceuta u *ex tempore* izradi lekova. Iz tog razloga, prepoznata je potreba za inoviranjem sastava takvih lekova, pre svega uvođenjem formulacija sa savremenim farmaceutskim ekscipijensima. S druge strane, ostaje otvoreno pitanje procene dermalne raspoloživosti ovakvih lekova, s obzirom da regulatorno prihvaćene metode nisu univerzalno primenljive (poput ograničene primenljivosti vazokonstriktornog testa na lekove iz grupe kortikosteroida) ili se smatraju neracionalnim u fazi razvoja formulacije (podrazumevaju značajna ulaganja i veliki broj ispitanika).

**Cilj istraživanja** Cilj istraživanja ove disertacije bio je razvoj formulacije, fizičko-hemijska i biofarmaceutska karakterizacija emulzionih sistema (podloga) stabilizovanih prirodnim mešanim emulgatorom tipa alkil poliglukozida (APG), sastava cetostearil glukozid i cetostearil alkohol, koji je od skora sertifikiran kao farmaceutski ekscipijens. Razvijene formulacije poslužile su kao modeli za razvoj i optimizaciju protokola metode sa adhezivnim trakama (*tape stripping* metode) kao perspektivne *in vivo* tehnike za ispitivanje penetracije lekova kroz kožu, uz sprovođenje korelacije datih rezultata sa onim dobijenim prihvaćenim *in vitro* i *in vivo* metodama kroz nekoliko studija slučaja (ketoprofen, diklofenak dietilamin i hidrokortizon kao model lekovite supstance sa antiinflamatornim delovanjem, različitih fizičko-hemijskih karakteristika).

**Metode** Eksperimentalni rad sproveden je u tri faze: 1) U cilju procene fizičke stabilnosti i koloidne strukture model podloga stabilizovanih šećernim emulgatorom, sprovedena je sveobuhvatna karakterizacija primenom polarizacione mikroskopije, merenjem pH i električne provodljivosti, određivanjem saturacione koncentracije model lekovitih supstanci, primenom kontinualne reologije, diferencijalne skenirajuće kalorimetrije, termogravimetrijske analize, *in vitro* analizom liberacionih profila model lekovitih supstanci, procenom bezbednosnog profila model podloga: *in vitro* – citotoksičnim testom i *in vivo* – neinvazivnim tehnikama bioinženjeringa kože. U cilju objektivnog sagledavanja kvaliteta i bezbednosti primene podloga stabilizovanih šećernim emulgatorom, karakterizacija je izvršena i na referentnim podlogama koje su oficinalne, a stabilizovane su konvencionalnim nejonskim emulgatorima. 2) Razvoj i optimizacija protokola metode sa adhezivnim trakama, kao perspektivne tehnike za *in vivo* procenu dermalne raspoloživosti lekova, koja bi našla široku primenu u laboratorijama prosečne opremljenosti. Procena pogodnosti primene metode predloženog protokola, uporednom analizom sa rezultatima koje pružaju ustanovljene *in vitro/ex vivo* metode. 3) Komparativna evaluacija metode predloženog protokola sa vazokonstriktornim testom, kao (sa izuzetkom kliničkih ispitivanja) jedinom *in vivo* metodom prihvaćenom od strane regulatornih tela.

**Rezultati** Ispitani šećerni emulgator uslovio je zadovoljavajuću fizičku stabilnost model podloga, u koje su uspešno inkorporirani izabrani korastvarači (izopropanol, propilenglikol, glicerol) i model lekovite supstance. Pokazano je da je zadovoljavajuća stabilnost uzoraka posledica obrazovanja lamelarnih struktura koje okružuju kapi unutrašnje faze i formiraju trodimenzionalnu mrežu u kontinuiranoj fazi emulzionog sistema, čime se smanjuje mobilnost i koalescencija dispergovane faze. Prirodno poreklo ispitivanog emulgatora doprinosi dobrom *in vitro/in vivo* bezbednosnom profilu model podloga, čak i po dodatku korastvarača, posebno izopropanola. Nakon variranja određenih procesnih parametara, pokazano je da metoda sa adhezivnim trakama razvijenog protokola, može uspešno da se koristi za ispitivanje hidrofилnih kremova, kao oblika lekova koji su poznati po kompleksnoj koloidnoj strukturi. Iako regulatorno prihvaćena metoda, rezultat vazokonstriktornog testa bio je kompromitovan iritacionim potencijalom referentnog uzorka, čime se maskira očekivani farmakodinamski odgovor. S druge strane, uprkos činjenici da je metoda sa

adhezivnim trakama podložna uticaju brojnih faktora, pokazana je umerena korelacija rezultata koje pružaju ove dve *in vivo* metode.

**Zaključak** Formulirane podloge stabilizovane šećernim emulgatorom sastava cetearil glukozid i cetearil alkohol, pogodne su za široku upotrebu u izradi magistralnih lekova u obliku kremova sa antiinflamatornim delovanjem. Na objektivan način (karakterizacija sprovedena uporedo sa oficinalnim podlogama farmakopejskog kvaliteta), demonstrirana je mogućnost inkorporiranja lekovitih supstanci i korastvarača različite prirode u formulirane podloge, uz očuvanje zadovoljavajuće fizičke stabilnosti i podnošljivosti na koži. Iako su prikazani rezultati odraz kvaliteta i bezbednosti ispitivanih podloga, model podloge odlikuju i povoljne aplikativne osobine, što se smatra važnim svojstvom savremenih nosača za lekove koji se primenjuju na koži. Metoda sa adhezivnim trakama, sprovedena prema razvijenom protokolu, pruža podatke o penetracionim profilima lekova čiji nosači imaju realno kompleksnu strukturu. Ipak, rezultati su pokazali da se ne može smatrati alternativnom za vazokonstriktorni test, već pre korisnom komplementarnom metodom.

**Ključne reči** Alkil poliglukozidni emulgatori, lamelarni tečni kristali, podloge za *ex tempore* izradu kremova, ketoprofen, diklofenak dietilamin, hidrokortizon, metoda sa adhezivnim trakama, vazokonstriktorni test, veštački konstrukti kože, izolovani *stratum corneum*.

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmaceutska tehnologija

**UDK broj:** 615.273 : 665.584.22

615.011 : 665.584.22



# Dermal bioavailability of anti-inflammatory drugs from sugar emulsifier stabilized bases: comparative application of *in vitro/in vivo* characterization methods

## ABSTRACT

**Introduction** Current pharmacoeconomic situation has resulted in a frequent shortage in certain drug doses/strengths or suitable dosage forms. The importance of the appropriate choice of the vehicle/base is especially emphasized in case of topical drugs. These are prone to influences stemming from the cosmetic industry, relating to satisfactory appearance, texture and sensorial properties of the carrier, which directly reflects patient adherence. Such drug deficiencies may be overcome through compounding practice in pharmacies which is, even in countries with highly developed pharmaceutical industry, reevaluating the importance of pharmacist's knowledge and skills in extemporaneous drug preparation. Therefore, there is a need to innovate the composition of such drugs, particularly via introduction of formulations based on novel pharmaceutical excipients. On the other hand, the issue of dermal bioavailability assessment of these drugs remains, considering the regulatory accepted methods are not universally applicable (use of the skin blanching assay is limited to corticosteroid drugs) or their use is irrational in the formulation development phase (require substantial funds and a large number of volunteers).

**Aim** The aim of this work was the development, physicochemical and biopharmaceutical characterization of emulsion systems (bases) stabilized with natural-origin mixed alkyl polyglucoside (APG) emulsifier comprising cetostearyl glucoside and cetostearyl alcohol, recently given a status of pharmaceutical excipient. These formulations served as models for development and optimization of the tape stripping method protocol that could serve as a prospective *in vivo* technique for skin penetration studies, along with correlation of the obtained results with those provided through the acknowledged *in vitro* and *in vivo* methods via several case-studies (ketoprofen, diclofenac diethylamine and hydrocortisone as anti-inflammatory model drugs with diverse physicochemical characteristics).

**Methods** Experimental work was organized in three phases: 1) With the aim of assessing physical stability and colloidal structure of the model bases stabilized with the sugar emulsifier, a comprehensive characterization was performed using polarization

microscopy, pH and conductivity measurements, saturation concentration of model drugs, continual rheology, differential scanning calorimetry, thermogravimetric analysis, *in vitro* screening of model drugs liberation profiles, assessing the safety profiles of model bases: *in vitro* – cytotoxicity assay and *in vivo* – non-invasive skin bioengineering techniques. With the purpose to objectively evaluate both quality and safety of the samples based on the sugar surfactant, characterization was performed with reference bases of pharmacopoeial quality, stabilized with conventional non-ionic emulsifiers. 2) Development and optimization of the protocol of the tape stripping method as a prospective technique for *in vivo* dermal bioavailability assessment, which would find vast application in various settings. Applicability of the suggested protocol was evaluated in comparison to the results obtained by acknowledged *in vitro/ex vivo* methods. 3) Comparative evaluation of the tape stripping method and the skin blanching assay, as (with the exception of clinical trials) the only *in vivo* method accepted by the regulatory agencies.

**Results** Investigated sugar emulsifier has provided satisfactory physical stability of the model bases, and enabled the selected co-solvents (isopropanol, propylene glycol, glycerol) and model drugs to be successfully sustained. As a promoter of liquid crystalline phases surrounding the droplets and forming a three-dimensional network in the continual phase of the emulsion system, mobility and coalescence of the dispersed phase was reduced, hence, leading to the satisfactory system stability. Mild nature of the investigated emulsifier is responsible for the favourable *in vitro/in vivo* safety profile of the model bases, even after co-solvent addition, particularly isopropanol. After variation of several process parameters, the protocol of the tape stripping method was defined, and was successfully used for evaluation of drug penetration from hydrophilic creams, as dosage forms of real complexity. Although being a regulatory accepted method, results of the skin blanching assay were compromised by the irritation potential of the reference sample, thus masking the expected pharmacodynamic response. On the other hand, despite the fact that the tape stripping method is prone to diverse influences, a moderate correlation between the results of the two *in vivo* methods was found.

**Conclusion** Bases stabilized with the investigated sugar emulsifier (cetearyl glucoside and cetearyl alcohol) may find vast application in drug compounding. The possibility of

extemporaneous addition of several drugs and co-solvents to the formulated bases was objectively demonstrated (characterization performed in parallel with corresponding samples of pharmacopoeial quality), with preservation of satisfactory physical stability and skin performance. Although the presented results are both indication of quality and safety of the investigated bases, model samples were favoured with good applicative properties, which are considered equally important for any topical preparation. The tape stripping method performed according to the suggested protocol provides data on drug penetration profiles from complex dosage forms. Still, it cannot be considered as an alternative for the skin blanching assay, but rather a useful complementary method.

**Keywords** Alkyl polyglucoside emulsifiers, lamellar liquid crystals, drug compounding/extemporaneous drug preparation, ketoprofen, diclofenac diethylamine, hydrocortisone, tape stripping method, skin blanching assay, artificial skin constructs, isolated *stratum corneum*.

**Scientific field:** Pharmacy

**Specific scientific field:** Pharmaceutical technology

**UDK No.** 615.273 : 665.584.22

615.011 : 665.584.22

## SADRŽAJ

1	UVOD .....	1
1.1	Koncept individualizacije terapije.....	1
1.2	Gotove 'ready-to-use' podloge stabilizovane novim emulgatorima .....	5
1.3	Alkil poliglukozidi kao emulgatori .....	9
1.4	Metode za procenu dermalne raspoloživosti lekova .....	11
1.4.1	<i>In vitro</i> metode karakterizacije.....	15
1.4.2	<i>In vivo</i> metode karakterizacije.....	20
1.4.2.1	Vazokonstriktorni test.....	20
1.4.2.2	Metode karakterizacije u fazi ispitivanja .....	21
1.4.2.2.1	Mikrodijaliza kože.....	21
1.4.2.2.2	Spektroskopske metode (Raman spektroskopija i spektroskopija bliskog infracrvenog spektra).....	23
1.4.2.2.3	Biopsija kože.....	23
1.4.2.2.4	Metoda sa adhezivnim trakama (tape stripping, skin stripping) ...	24
1.4.2.3	Mogućnosti korelacije rezultata dermalne raspoloživosti lekova dobijenih različitim metodama .....	30
1.4.3	<i>In silico</i> modeli predviđanja dermalne raspoloživosti - mogućnosti primene	31
2	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	34
3	EKSPERIMENTALNI DEO .....	38
3.1	Materijali i metode .....	38
3.1.1	Materijali.....	38
3.1.2	Metode i oprema.....	38
3.1.2.1	Priprema uzoraka.....	38
3.1.2.2	Polarizaciona mikroskopija.....	41
3.1.2.3	Merenje pH i električne provodljivosti uzoraka.....	41
3.1.2.4	Određivanje koncentracije zasićenja/saturacione koncentracije leka u podlozi	41
3.1.2.5	Reološka merenja .....	42
3.1.2.6	Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC).....	43
3.1.2.7	Termogravimetrijska analiza (TGA) .....	43

3.1.2.8	<i>In vitro</i> ispitivanje liberacionih profila model lekovitih supstanci iz ispitivanih uzoraka ( <i>dissolution test</i> uz primenu inhenser ćelija).....	44
3.1.2.9	<i>In vitro</i> ispitivanje iritacionog potencijala model podloga – studija citotoksičnosti na ćelijskim kulturama.....	44
3.1.2.10	Procena bezbednosnog profila model podloga primenom <i>in vivo</i> tehnika bioinženjeringa kože.....	45
3.1.2.11	Statistička analiza.....	46
3.1.2.12	Razvoj i optimizacija protokola metode sa adhezivnim trakama.....	47
3.1.2.13	<i>In vitro/ex vivo</i> ispitivanje permeacionih profila primenom Franz-ovih difuzionih ćelija.....	53
3.1.2.14	Vazokonstriktorni test (eng. <i>skin blanching assay</i> ).....	55
3.1.2.15	Uporedna analiza primenjenih <i>in vivo</i> metoda za procenu dermalne raspoloživosti lekova.....	59
4	REZULTATI I DISKUSIJA.....	60
4.1	Rezultati i diskusija I faze eksperimentalnog rada.....	60
4.1.1	Mikroskopska analiza.....	60
4.1.2	Ispitivanje pH vrednosti i električne provodljivost uzoraka.....	68
4.1.3	Reološka merenja.....	70
4.1.4	Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC).....	77
4.1.5	Termogravimetrijska analiza (TGA).....	83
4.1.6	Određivanje koncentracije zasićenja/saturacione koncentracije model lekovitih supstanci u ispitivanim podlogama.....	88
4.1.7	<i>In vitro</i> ispitivanje liberacionih profila model lekovitih supstanci iz ispitivanih podloga.....	89
4.1.8	<i>In vitro</i> ispitivanje citotoksičnosti podloga stabilizovanih APG emulgatorom.....	92
4.1.9	<i>In vivo</i> procena bezbednosnog profila ispitivanih podloga.....	94
4.2	Rezultati i diskusija II faze eksperimentalnog rada.....	97
4.2.1	Razvoj protokola metode sa adhezivnim trakama.....	97
4.2.2	Ispitivanje potencijala primene metode sa adhezivnim trakama razvijenog protokola.....	103

4.2.3	Komparativno <i>in vitro/ex vivo</i> ispitivanje permeacionih profila primenom Franz-ovih difuzionih ćelija.....	108
4.3	Rezultati i diskusija III faze eksperimentalnog rada .....	115
4.3.1	Fizičkohemijaska karakterizacija model i referentnih uzoraka sa hidrokortizonom (HC) kao model lekovitom supstancom .....	115
4.3.2	Vazokonstriktorni test.....	120
4.3.3	Metoda sa adhezivnim trakama.....	124
5	ZAKLJUČAK.....	130
6	LITERATURA .....	138
7	Prilozi .....	151
7.1	Publikovani i saopšteni radovi koji čine deo doktorske disertacije .....	151
7.2	Biografija autora.....	154
7.3	Izjava o autorstvu .....	155
7.4	Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije ..	156
7.5	Izjava o korišćenju.....	157

# 1 UVOD

## 1.1 Koncept individualizacije terapije

Poslednjih godina, može se uočiti veliko interesovanje stručne javnosti za istraživanja u domenu vezikularnih nosača i nanotehnologija (Neubert, 2011). Razvoj naprednih sistema za isporuku lekova, pre svega nosača mikro i nano-veličina (10 - 1000 nm), tzv. koloidnih nanovektora, predstavlja uzbudljivo polje istraživanja, a dati nosači danas se smatraju *savremenim farmaceutskim oblicima* pred kojima su velika očekivanja (Beija i sar., 2012). Međutim, iako je za mnoge od ovih nosača dokazano da obezbeđuju unapređenu, pa čak i ciljanu isporuku lekovitih supstanci do mesta delovanja, prepoznati su i određeni nedostaci ovih sistema, poput nezadovoljavajuće fizičko-hemijske stabilnosti ili efikasnosti inkapsulacije model lekovitih supstanci. Takođe, prilikom procene biološke raspoloživosti, uprkos inicijalno obećavajućim rezultatima *in vitro* ispitivanja, ovi napredni sistemi za isporuku lekova obično pokazuju svoja ograničenja tek u kompleksnijim *in vivo* uslovima (Zhang i sar., 2013). Iz tog razloga, na tržištu lekova i dalje dominiraju konvencionalni oblici lekova, poznatog kvaliteta, efikasnosti i bezbednosti.

Usled trenutne farmakoekonomske situacije, farmaceutska industrija teži da racionalizuje svoju proizvodnju, čime će tržište biti uskraćeno za određen broj lekova, dok je izbor različitih doza/jačina ili farmaceutskih oblika već ograničen (Minghetti i sar., 2010). Shodno tome, sve više se ističe potreba za tzv. **individualizacijom/personalizacijom terapije** kojom bi se postigao ispravan izbor lekovite supstance, načina doziranja i optimalno oslobađanje iz primenjenog nosača (Florence i Lee, 2011; Nahata i Allen, 2008).

Tradicionalno, individualna terapija može se obezbediti izradom magistralnih lekova, što podrazumeva izradu leka u apoteci primenom supstanci farmaceutskog kvaliteta, po receptu (formuli) za datog pacijenta/korisnika (Zakon o lekovima i medicinskim sredstvima, Sl. glasnik RS 30/2010). Iako se XIX vek smatra zlatnim periodom izrade magistralnih lekova, sve do 50-ih godina prošlog veka čak 80 % recepata oslanjalo se na znanja i veštine farmaceuta u izradi magistralnih lekova, nakon čega je industrijska proizvodnja lekova postala dominantna (Marriott i sar., 2010). Ipak,

činjenica da je većina lekova na tržištu dostupna (registrovana) u jednoj dozi/jačini i farmaceutskom obliku, dovela je do redefinisanja značaja izrade magistralnih lekova, posebno u slučaju određenih populacija (npr. pedijatrijski i gerijatrijski pacijenti) i/ili vrsta bolesti (lekovi za tretman dermatoloških oboljenja), kada je neophodno prilagoditi lek specifičnim potrebama pacijenta, osigurati zadovoljavajuću komplijansu/adherencu i obezbediti željeni terapijski efekat. Ne treba zanemariti ni rastući broj pacijenata/korisnika osetljivih na određene supstance koje mogu biti prisutne u registrovanim lekovima/preparatima (npr. konzervansi, emulgatori, boje i dr). Iako je u nekim zemljama tradicija izrade magistralnih lekova negovana i unapređivana tokom godina, i zemlje sa razvijenom farmaceutskom industrijom poput SAD postaju svesne značaja koncepta individualizacije terapije što se ogleda u uvođenju novih dokumenata (USP publikacija pod nazivom *USP on Compounding: A Guide for the Compounding Practitioner*; FDA *Compliance Policy Guide Sec.460.200*) ili radnih tela (*Pharmacy Compounding Accreditation Board*) čiji je cilj da uredi ovaj segment farmaceutske prakse (McPherson i sar., 2006; US Pharmacopeial Convention, 2013). Iako sa stanovišta odgovarajućih regulatornih agencija magistralni lekovi ne prolaze iscrpna ispitivanja poput registrovanih lekova, ukoliko se izrada sprovodi *lege artis*, po važećim smernicama poput Dobre prakse u izradi magistralnih lekova (eng. *Good Compounding Practice*), smatraju se generalno bezbednim i jednostavnim rešenjem za pacijente sa posebnim potrebama (USP 34, 2011). Konačno, većina dostupnih dokumenata kojima se reguliše praksa izrade magistralnih lekova ističe značaj komunikacije na relaciji lekar - pacijent - farmaceut koji prima recept - farmaceut koji će izraditi magistralni lek (Allen, 2012).

Kvalitet lekova u zemljama EU, potpisnicama Konvencije o izradi Evropske farmakopeje, regulisan je monografijama Ph. Eur. i rezolucijama Komiteta za javno zdravlje (danas Komitet ministara). Poslednji dokument donet sa ciljem uređenja prakse izrade magistralnih lekova je Rezolucija Evropske komisije o obezbeđenju zahteva za kvalitet i bezbednost lekova izrađenih u apotekama za potrebe pojedinačnih pacijenata (eng. *Resolution CM/ResAP(2011)1 on quality and safety assurance requirements for medicinal products prepared in pharmacies for the special needs of patients*), usvojena od strane Komiteta ministara Veća Evrope na 1103. zasedanju održanom 19.1.2012. godine (Resolution CM/ResAP(2011)1, 2011).



**Tabela 1.1.** Pregled monografija farmakopeje SAD kojima se uređuje praksa *ex tempore* izrade lekova (USP 34, 2011).

Farmakopeja	Naziv monografije	Napomene
<b>USP 34</b>	<795> <i>Pharmaceutical Compounding</i> – <i>Nonsterile Preparations</i>	Predstavlja vodič za sprovođenje Dobre prakse u izadi magistralnih lekova kod kojih se ne zahteva sterilnost, a namenjeni su za primenu kod ljudi ili životinja. Poslednje revizije koje su stupile na snagu 1. maja 2011. godine obuhvataju kategorije magistralnih lekova (jednostavni, umereno složeni i složeni), definicije različitih pojmova (npr. rok upotrebe, stabilnost) i uslova izrade (prostorije, oprema).
	<797> <i>Pharmaceutical Compounding</i> – <i>Sterile Preparations</i>	Opisuje procedure i zahteve za izradu sterilnih preparata. Navodi uslove i način rada kojima se sprečava mikrobiološka kontaminacija, prisustvo bakterijskih endotoksina, varijabilnost u deklarisanosti jačini, hemijska ili fizička kontaminacija, ili primena sastojaka neodgovarajućeg kvaliteta.
	<1160> <i>Pharmaceutical Calculations in Prescription Compounding</i>	Vodič za farmaceute prilikom sprovođenja potrebnih proračuna/kalkulacija koje prethode izradi farmaceutskih preparata.
	<1163> <i>Quality Assurance in Pharmaceutical Compounding</i>	Opisuje program obezbeđenja kvaliteta kao sistem koraka koji se moraju sprovesti, kako bi se održavali odgovarajući standardi kvaliteta magistralnih lekova. Poslednje revizije (od 1. maja 2011. godine) uključuju pitanja obuke, fizičke karakterizacije farmaceutskih oblika, čišćenja, kontejnera, pakovanja, čuvanja i dr.
	<1176> <i>Prescription Balances and Volumetric Apparatus</i>	Pružuje informacije o vagama i priboru za merenje zapremine (birete, pipete, menzure, kapaljke), koji se mogu koristiti za odmeravanje lekovitih ili pomoćnih supstanci prilikom izrade magistralnih lekova.

**Tabela 1.2.** Monografija farmakopeje Velike Britanije kojom je definisana praksa *ex tempore* izrade lekova (BP 2009).

Farmakopeja	Naziv monografije	Napomene
<b>BP 2009</b>	<i>Unlicensed Medicines</i>	Monografija opisuje minimum zahteva za kvalitet lekova koji se izrađuju na zahtev ovlašćenog zdravstvenog radnika, kada se zdravstveno stanje pacijenta ne može poboljšati registrovanim lekovima.

**Tabela 1.3.** Monografija Ph. Eur. kojom je definisana praksa izrade lekova (Ph.Eur.7.7).

Farmakopeja	Naziv monografije	Napomene
<b>Ph.Eur.7.7</b>	<i>Pharmaceutical Preparations (04/2013/2619)</i>	Monografija navodi osnovne zahteve koje treba da ispune lekovite supstance, ekscipijensi i farmaceutski oblici koji će se koristiti prilikom izrade magistralnih (eng. <i>extemporaneous preparations</i> ) ili galenskih lekova (eng. <i>stock preparations</i> ). Ova monografija ne obuhvata izradu lekova za potrebe kliničkih ispitivanja.

**Tabela 1.4.** Monografije u pripremi koje se odnose na praksu *ex tempore* izrade lekova (US Pharmacopeial Convention, 2013).

Farmakopeja	Naziv monografije	Napomene
<b>USP monografije u pripremi</b>	<i>Compounding with Hazardous Drugs</i>	Monografija će pružiti preporuke kako da se zdravstveni radnici koji izrađuju lekove sa opasnim lekovitim supstancama zaštite od njihovih potencijalno štetnih efekata prilikom izrade.
	<i>Compounding for Clinical Drug Studies</i>	Monografija će biti namenjena farmaceutima koji se bave izradom novih lekova za potrebe ispitivanja u ranim fazama kliničkih studija.

Međutim, iako se individualizacija terapije može postići izradom magistralnih lekova, konvencionalni nosači (podloge i vehikulumi) za lekovite supstance koje se primenjuju na koži, danas često ne zadovoljavaju očekivanja pacijenata, što se neminovno odražava na komplijansu (Krochmal, 2009). U tom smislu, javlja se potreba za uvođenjem novih farmaceutskih ekscipijenasa i odgovarajućih nosača/podloga, sa ciljem uvođenja novih i/ili unapređenja postojećih formulacija.

## ***1.2 Gotove 'ready-to-use' podloge stabilizovane novim emulgatorima***

Dobro je poznato da izbor podloge/vehikuluma ima značajan uticaj na dermalnu ili transdermalnu isporuku lekovite supstance koja je u nju inkorporirana (Otto i sar., 2009). Stoga, prilikom formulacije leka koji se primenjuje na koži mora se razmotriti više kriterijuma, uobičajeno grupisanih kao: *i)* farmaceutsko-tehnološki, *ii)* biofarmaceutski i *iii)* kozmetološki (Surber i sar., 2001).

Prema aktuelnim farmakoekonomskim analizama, shodno individualnim potrebama pacijenata za farmakoterapijom, dermatološki preparati (prevažodno polučvrsti preparati za spoljašnju upotrebu/primenu na koži) su najčešće propisivani magistralni lekovi. U uslovima apoteke, gde je vrlo važno brzo i kvalitetno uslužiti pacijenta, lekovi koji se primenjuju na koži se izrađuju direktnim inkorporiranjem jedne ili više lekovitih supstanci u **gotove, tzv. ready to use podloge**, ili podloge koje su prethodno pripremljene prema propisima domaćih ili stranih farmakopeja, odnosno njihovih dodataka (magistralnih formula). Pored toga, ako je potrebno, gotove podloge ovog tipa mogu se koristiti i za razblaživanje registrovanih lekova u obliku krema (praksa naročito raširena u slučaju kortikosteroidnih kremova) (Vuleta i Savić, 2008; Winfield i sar., 2009).

Da bi neka podloga/baza dobila status podloge pogodne za *ex tempore* izradu magistralnih lekova ili bila odobrena (farmakopejski status, magistralne formule), odnosno široko prihvaćena u farmaceutskoj (apotekarskoj) praksi treba da zadovolji niz preduslova (Welin-Berger i sar., 2001; Winfield i sar., 2009):

- ✓ Da je u pitanju jednostavna formulacija u čiji sastav ulaze dostupni, odobreni farmaceutski ekscipijensi;

- ✓ Jednostavnog postupka izrade;
- ✓ Zadovoljavajuće fizičke stabilnosti;
- ✓ Kompatibilna sa velikim brojem lekovitih supstanci;
- ✓ Prihvatljivog bezbednosnog profila (*in vitro/in vivo* potvrđeno odsustvo neželjenih reakcija na koži);
- ✓ Omogućava adekvatnu isporuku lekovite supstance (zadovoljavajući *in vitro/in vivo* liberacioni profili, stepen i brzina penetracije i permeacije),
- ✓ Posедуje odgovarajuću supstantivnost (ostaje dovoljno dugo na mestu primene),  
i
- ✓ Optimalne kozmetološke (senzorne) karakteristike.

Fizičko-hemijske karakteristike lekovitih supstanci (naročito novih entiteta) sve češće zahtevaju da se u sastav podloge uključe i određeni **pojačivači/ubrzivači penetracije (penetracioni inhenseri)**, kako bi se osigurala zadovoljavajuća dermalna raspoloživost. Efikasan penetracioni inhenser može svoju ulogu ispuniti jednim od sledećih mehanizama: povećanjem koeficijenta difuzije leka u *stratum corneum*-u (SC; tj. narušavanjem barijerne funkcije površinskog sloja kože), povećanjem efektivne koncentracije lekovite supstance u podlozi/vehikulumu (smanjenjem rastvorljivosti leka u podlozi povećava se termodinamička aktivnost), poboljšanjem prelaska leka iz nosača u kožu (često uticajem na permeabilnost kože kao membrane) ili, ređe, privremenim stvaranjem novih, kraćih puteva za permeaciju (Williams i Barry, 2004). Prema tome, prospektivna 'gotova' podloga trebalo bi da omogući *ad hoc* dodatak različitih penetracionih inhensera, uz očuvanje stabilnosti i bezbednosti nakon primene na koži (Fang i sar., 2003; Moser i sar., 2001). Ipak, ne treba izgubiti iz vida da neodgovarajuća kombinacija inhensera i podloge, može u nekim slučajevima usporiti oslobađanje lekovite supstance iz nosača, čime se kompromituje dalja dermalna raspoloživost (Kaushik i Michniak-Kohn, 2010).

Prethodno pomenuta zadovoljavajuća fizička stabilnost izabranog nosača posebno je značajna kod podloga emulzionog tipa koje su generalno prihvaćene kao termodinamički nestabilni sistemi. Iako se od *ex tempore* izrađenih lekova generalno ne očekuje veoma dug rok upotrebe, s obzirom da su namenjeni za neposrednu primenu nakon izdavanja pacijentu (npr. konzervisani hidrofилni kremovi – približan rok

upotrebe od 1 do 12 meseci, zavisno od unutrašnje ambalaže) (DAC/NRF, 2007; FTM, 2010), ovi lekovi moraju ostati stabilni, bezbedni i efikasni tokom preporučenog vremena trajanja terapije (Allen, 2008). Iz tog razloga od izuzetne je važnosti izbor odgovarajućeg stabilizatora i njegova primena u optimalnoj koncentraciji.

**Surfaktanti, emulgatori ili površinski aktivne materije** nalaze široku primenu u mnogim oblastima. Međutim, kada je reč o farmaceutskim preparatima koji se primenjuju na koži, uglavnom vrše funkciju različitih stabilizatora (Lopez i sar., 2000; Shokri i sar., 2001). Dodatno, poznato je da emulgatori mogu modifikovati permeabilnost različitih bioloških membrana, čime mogu ispoljiti i efekat svojevrsnih penetracionih inhensera (Casiraghi i sar., 2012; Shokri i sar., 2001). Iako se danas dosta zna o strukturi kože, tačan mehanizam takve aktivnosti još uvek nije definisan. Navodi se mogućnost da do poboljšanja penetracije dolazi nakon penetracije molekula emulgatora u intercelularni matriks *stratum corneum*-a, praćeno njegovim vezivanjem za keratinske filamente što konačno rezultuje narušavanjem postojećeg uređenog rasporeda korneocita, čime se povećava koeficijent difuzije i permeabilnost kože uopšte (Subedi i sar., 2010).

Međutim, zadovoljavajuća fizička stabilnost farmaceutskih preparata obično zahteva prisustvo jednog ili više emulgatora u koncentracijama koje mogu kompromitovati bezbednost primene takvog leka. Primera radi, anjonski emulgatori poznati su po snažnom uticaju na ljudsku kožu. Među njima, natrijum-laurilsulfat (NaLS) ističe se kao efikasan emulgator, ali i potentan iritans kože, koji stoga nalazi primenu i za ciljano narušavanje integriteta kožne barijere koje se ogleda u povećanju vrednosti transepidermalnog gubitka vode (TEGV) na koži dobrovoljaca tokom *in vivo* studija bezbednosti (Williams i Barry, 2004). Štaviše, u slučaju *in vitro* testova na modelima humane kože, NaLS je ustanovljen kao referentni citotoksični marker od strane OECD Vodiča za procenu stepena iritacije kože (OECD Guideline 439, 2010). U poređenju sa prethodno navedenim grupama emulgatora, nejonski emulgatori se generalno smatraju bezbednijim. Štaviše, pregledom novije literature može se primetiti svojevrsno nastojanje da se i potencijalno štetni nejonski emulgatori zamene emulgatorima prirodnog porekla, kad god je to moguće (Jurado i sar., 2010). Ipak, često je zanemarena činjenica da do iritacije na koži dolazi ne usled prisustva jedne supstance,

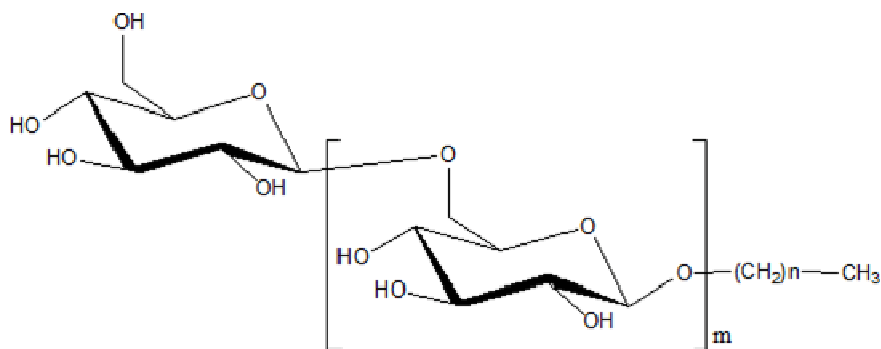
već kao rezultat kombinovane primene sastojaka u finalnoj formulaciji (Hall-Manning i sar., 1998).

Na tržištu je dostupan ograničen broj gotovih (komercijalnih) podloga sa prethodno opisanom namenom. Takođe, najveći broj podloga koje propisuju farmakopeje ili dodaci farmakopejama, a koriste se u izradi magistralnih lekova za primenu na koži, koncipiran je na bazi tradicionalnih jonskih (obično anjonskih) ili etoksilovanih nejonskih emulgatora, odnosno njihovih mešavina sa masnim alkoholima dugog lanca (BP 2009; DAB 2006; DAC/NRF 2007; FTM 2010; MF 2008; Ph. Eur. 7.0; USP34/NF29). Iako podloge stabilizovane tradicionalnim emulgatorima (sulfati masnih alkohola, polisorbati, estri sorbitana, makrogolni estri i dr), ispunjavaju većinu prethodno navedenih zahteva, njihova upotreba u velikom broju slučajeva povezana je sa pojavom neželjenih reakcija na koži (Bárány i sar., 2000; Fluhr i sar., 2001). Svakako, ne treba zanemariti ni slabu biorazgradivost konvencionalnih emulgatora koji su mahom sintetskog porekla. Pored toga, emulziona podloge bazirane na kombinaciji nejonskih etoksilovanih emulgatora i masnih amfifila ispoljavaju odloženo strukturiranje sistema (usporeno formiranje finalne koloidne strukture), koje može trajati i do dva meseca nakon izrade, što se značajno odražava na reološke karakteristike podloga, a time i na dermalnu raspoloživost inkorporiranih lekovitih supstanci (Eccleston, 1997).

Kada je reč o razvoju novih emulgatora, izraženi su uticaji kozmetičke industrije na farmaciju. Važeći trendovi u formulaciji kozmetičkih proizvoda doveli su do toga da pacijenti imaju jednako velika očekivanja i od farmaceutskih preparata koji se primenjuju na koži, koja se prevashodno odnose na željenu teksturu preparata i odgovarajuće senzorne atribute. Dodatno, i farmaceutska industrija i korisnik/pacijent svesni su da primena konvencionalnih, sintetskih surfaktanata ima štetan uticaj na životnu sredinu (Piispanen i sar., 2004). Uz ovakvu ekološku prosvećenost, raste interesovanje za razvojem i primenom biodegradabilnih emulgatora prirodnog porekla, koji bi ujedno bili i blagi za kožu. Među njima, već izvesno vreme, veliku pažnju privlači grupa šećernih emulgatora poput šećernih estara, šećernih amida, glikozida i sličnih derivata.

### 1.3 Alkil poliglukozi kao emulgatori

Pregledom novije literature može se uočiti da su se na polju stabilizatora emulzionih sistema posebno izdvojili nejonski mešani emulgatori prirodnog porekla iz grupe alkil poliglukozi (APG) koje odlikuje biodegradabilnost i povoljan dermatološki profil (Hoffmann i Platz, 2001; Holmberg, 2001; Metzger i Eissen, 2004; Savic i sar., 2010). APG predstavljaju grupu nejonskih emulgatora koji se sastoje iz šećerne komponente i masnih alkohola. Iako je prvi postupak dobijanja APG emulgatora opisan pre više od 100 godina, ovi emulgatori nisu našli širu primenu sve do 1980-ih godina kada je postignuta racionalna proizvodnja većih količina (Iglauer i sar., 2009). Industrijska proizvodnja se zasniva na Fišerovoj sintezi i konvertuje prirodne masne komponente (npr. biljna ulja) ili sintetske masne alkohole s jedne strane, i skrob ili glukozu s druge strane, u APG emulgator (Stubenrauch, 2001; Zgola-Grzeskowiak i sar., 2008). S obzirom da su takvim procesom sintetisane smeše različitih sastojaka i stereoizomera, nazvani su *alkil poliglukozi* (slika 1.1).



Slika 1.1. Shematski prikaz strukture APG emulgatora

Razvoj stereospecifičnih procedura uz primenu odgovarajućih zaštitnih grupa rezultovao je u proizvodnji konkretnih sastojaka. APG koji su danas u upotrebi među sobom se razlikuju u dužini alkil lanca i prosečnom broju monosaharidnih jedinica koje su za njega vezane (Kühn i Neubert, 2004). APG se od konvencionalnih emulgatora razlikuju i po tome što se njihova **sinteza odigrava bez etoksilovanja** (tzv. *PEG-free* emulgatori) (Konya i sar., 2004), zbog čega im se pripisuje bolja podnošljivost od strane

kože, tj. značajno manji iritacioni potencijal. Kao što je prethodno napomenuto, za rastuće interesovanje za APG emulgatorima odgovorna je činjenica da su biodegradabilni i proizvedeni iz obnovljivih sirovina, zbog čega se često označavaju i kao 'prijatelji životne sredine' (Garcia i sar., 1997).

Pored pomenute biokompatibilnosti i biorazgradivosti, pokazano je da APG poseduju i interesantne međufazne karakteristike, koje omogućavaju njihovu uspešnu primenu u svojstvu farmaceutskih ekscipijenasa (Jurado i sar., 2010). Iz tog razloga, pojedini autori idu tako daleko da spekulisu kako bi ova grupa prirodnih emulgatora mogla da postepeno zameni ostale nejonske emulgatore poreklom iz derivata petrohemijske industrije (Castro i sar., 2006). Dosad sprovedena preformulaciona i formulaciona ispitivanja APG emulgatora ukazala su da emulzione sisteme stabilizuju građenjem **kompleksnih struktura tipa lamelarnih tečnih kristala**. Uočena sličnost datih koloidnih sistema stabilizovanih lamelarnim mezofazama, sa intercelularnim lipidnim membranama ćelija kože, otvara mogućnost razvoja sistema sa poboljšanim aplikativnim karakteristikama, produženim vlažećim efektom na koži i/ili modifikovanim oslobađanjem aktivnih supstanci iz takvih nosača (Makai i sar., 2003; Savić, 2004). Takođe, u stručnim publikacijama mogu se pronaći i tvrdnje da ove strukture poseduju inherentan potencijal da poboljšaju isporuku lekova kroz kožu, kao i da obezbeđuju zadovoljavajuću stabilnost lekova koji se primenjuju na koži što bi omogućilo inkorporiranje različitih penetracionih inženjera (Hosmer i sar., 2011).

Da bi nova, jednostavna podloga na bazi prirodnog APG emulgatora bila prihvaćena kao nosač za različite lekovite supstance koje se primenjuju na koži, neophodno je sprovesti iscrpno istraživanje njenih ključnih karakteristika. Ovo uključuje:

- fizičko-hemijsku karakterizaciju koloidne strukture i studiju fizičke stabilnosti niza model formulacija (variranje vrste sastojaka i koncentracija u kojima su uključene u formulaciju),
- ispitivanje uticaja formulacionih parametara na *in vitro* oslobađanje/permeaciju i *in vivo* efikasnost model lekova, i takođe
- *in vitro/in vivo* procenu bezbednosnog profila same podloge (tzv. placebo uzoraka) i odgovarajućih aktivnih uzoraka (prospektivnih magistralnih lekova).



Dodatni zahtev koji se nameće tokom formulacionih istraživanja emulzione podloge za *ex tempore* izradu magistralnih lekova jeste pronalaženje rešenja za slabu rastvorljivost većine lekovitih supstanci u vodi/vodenoj fazi sistema. Iz tog razloga, potrebno je razmotriti mogućnost uključivanja izvesnih korastvarača ili solubilizatora, uz istovremeno očuvanje fizičke stabilnosti podloge. Penetracioni inhenseri, koji istovremeno mogu imati ulogu korastvarača, su različiti alkoholi (etanol, izopropanol), alkilmetilsulfoksidi (dimetilsulfoksid, decilmetilsulfoksid, tetradecilmetilsulfoksid), piroolidoni, laurokapram, polioli (glicerol, propilenglikol), oleinska kiselina i dr (Ashton i sar., 1992; Remington, 2012).

Jedan od do sada najbolje ispitanih emulgatora iz ove grupe svakako je mešani emulgator sastava **cetearil glukozid i cetearil alkohol**. Nakon dugogodišnje uspešne primene u stabilizaciji kozmetičkih proizvoda, i povoljnih rezultata brojnih studija sa različitim model lekovitim supstancama (Baudonnet i sar., 2004; Savic i sar., 2005; 2006; 2007; 2008; 2009; Vucinic-Milankovic i sar., 2007), 2010. godine dodeljen mu je status farmaceutskog ekscipijensa od strane FDA, pod nazivom *Alkyl Glucoside* (Savic i sar., 2010). Ovaj mešani nejonski emulgator predstavlja savremenu samoemulgujuću podlogu, s obzirom da su ispitivanja binarnih sistema ukazala da može da obrazuje podloge i bez dodatka masne faze. Takođe, može se uspešno koristiti i kao stabilizator anhidrovanih emulzionih sistema, što je od posebnog značaja u slučaju lekovitih supstanci osetljivih u prisustvu vode (Seppic, 2011). Pokazana stabilnost emulzionih sistema stabilizovanih ovim mešanim emulgatorom pri različitim pH vrednostima i u prisustvu elektrolita, pripisuje se prisustvu jake glukozidne veze između hidrofilnog i lipofilnog dela molekula, što ga, pretpostavka je, čini pravim kandidatom za stabilizaciju gotovih farmaceutskih podloga savremenog sastava.

#### ***1.4 Metode za procenu dermalne raspoloživosti lekova***

Mnoge supstance/preparati se ciljano nanose na kožu ili pak neplanirano dolaze u kontakt sa njom. Stoga, potreba za ispitivanjem njihove dermalne raspoloživosti može biti u vezi sa (Escobar-Chavez i sar., 2008):

- a) Lokalnim efektima u dermatologiji (npr. primena lekova iz grupe kortikosteroida kod različitih dermatitisa);

- b) Efektima u dubljim tkivima/regionalno delovanje (npr. nesteroidni antiinflamatorni lekovi);
- c) Transportom kroz kožu (transdermalna resorpcija) u cilju postizanja sistemskog efekta (npr. nikotinski transdermalni flasteri);
- d) Efektima na površini kože (npr. proizvodi za zaštitu od sunca, drugi kozmetički proizvodi, antiinfektivi);
- e) Neželjenom perkutanom resorpcijom (npr. kontakt sa rastvaračima na radnom mestu, pesticidima ili alergenima).

Poznavanje lokalne i sistemske farmakokinetike leka koji je namenjen primeni na koži, jedan je od uobičajenih zahteva regulatornih agencija. U EU, zakonske osnove i zahtevi za registraciju definisani su Direktivom EU 2001/83, koja je od tada doživela brojne izmene. Detaljnija uputstva o vrsti i dizajnu kliničkih studija koje treba sprovesti, i odgovarajućim parametrima koje treba prikupiti, navode se u drugim dokumentima (CPMP/EWP/239/95, 1995; CPMP/EWP/QWP/1401/98 rev. 2010), a zavise od toga da li je u pitanju nova lekovita supstanca (eng. *New Chemical Entity*), lekovita supstanca koja do sada nije bila registrovana za primenu na koži ili je u pitanju nova formulacija, u kom slučaju se podnosiocima zahteva za registraciju obično preporučuje konsultacija sa odgovarajućim savetodavnim telima, poput *Scientific Advice Working Party* Evropske agencije za lekove (Mugglestone i sar., 2012).

U navedenim dokumentima **biološka raspoloživost** (eng. *bioavailability*) definiše se kao brzina i stepen kojim se aktivna supstanca ili njen derivat resorbuje iz farmaceutskog oblika i postaje dostupna na mestu delovanja. S obzirom da u najvećem broju slučajeva ovaj termin podrazumeva merljivo prisustvo leka u sistemskej cirkulaciji, kada se govori o primeni lekova na kožu, poželjno je koristiti precizniji termin **dermalna raspoloživost**. S druge strane, ispitivanje **biološke ekvivalentnosti** (eng. *bioequivalence*) praktično predstavlja komparativnu studiju biološke raspoloživosti, dizajniranu tako da proceni ekvivalentnost ispitivanog i referentnog preparata. U slučaju preparata koji se primenjuju lokalno (bilo da je reč o dermalnoj, oralnoj, nazalnoj, inhalacionoj, okularnoj, rektalnoj ili vaginalnoj primeni), pristupi za procenu raspoloživosti i ekvivalentnosti ne mogu biti isti kao za lekove kod kojih dolazi do sistemske resorpcije, i obično podrazumevaju odgovarajuće farmakodinamske ili

komparativne kliničke studije (tabela 1.5). Međutim, nije uvek lako napraviti jasnu distinkciju među prikazanim kategorijama. Primera radi, dodatak penetracionog inhensera u neki dermatološki lek formalno odgovara situaciji označenoj kao III-b, ali regulatorne agencije ipak mogu da zahtevaju ispitivanje efikasnosti i bezbednosti leka kroz odgovarajuće kliničke studije (opisano pod II-d). U svakom slučaju, eventualno izostavljanje rezultata ovih ispitivanja u konačnoj registracionoj dokumentaciji mora biti opravdano i obrazloženo dostavljenim ekspertskim mišljenjem.

**Tabela 1.5.** Sumarni prikaz zahteva regulatornih tela za ispitivanje lekova za lokalnu primenu (CPMP/EWP/239/95, 1995).

<b>Situacija</b>	<b>Zahtev regulatornih tela</b>
<b>I</b> Poznata lekovita supstanca koja do sada nije primenjivana lokalno	Kompletna dokumentacija je obično potrebna; eventualno skraćeni postupak (eng. <i>abridged application</i> ), uz odgovarajuće ekspertsko mišljenje.
<b>II</b> Poznata lekovita supstanca:	
<b>a)</b> Nova indikacija	Kliničke studije
<b>b)</b> Promena u režimu doziranja	Kliničke studije
<b>c)</b> Promena jačine/doze, ali uobičajena učestalost primene	Farmakodinamske studije (ako je primenljivo) ili ispitivanje lokalne raspoloživosti; u određenim slučajevima <i>in vitro</i> studije (npr. kapi za oči) ili ekspertsko mišljenje u slučaju malih promena. U ostalim slučajevima, neophodno je sprovođenje kliničkih studija.
<b>d)</b> Nova formulacija (npr. krem vs. mast; aerosol vs. prašak za inhalaciju)	Kliničke studije da pokažu efikasnost/bezbednost i/ili farmakodinamske studije (ako je moguće).
<b>e)</b> generički lekovi	Kao za II-c
<b>III</b> Tzv. varijacije tip II	
<b>a)</b> promene lekovite supstance koje se odnose na specifikaciju supstance (fizičke karakteristike)	Kao za II-c
<b>b)</b> promene koje se odnose na pomoćne materije	Kao za II-c
<b>c)</b> promene koje se odnose na primenu leka (npr. promena vrste uređaja za inhalaciju)	Kao za II-c

Najnoviji dokument koji se bavi problematikom perkutane resorpcije supstanci je *OECD Draft Guidance Notes on Dermal Absorption* iz 2010. godine, koji se ovim pitanjem bavi sa bezbednosnog aspekta, a oslanja se na set dokumenata donetih 2004. godine (OECD Test Guidelines 427 i 428, 2004; OECD Guidance, 2004). Potreba za ovakvim dokumentom javila se nakon spoznaje da je za većinu profesija pokazano da su respiratorni organi i koža osnovni putevi ekspozicije različitim supstancama (pesticidi, biocidi, veterinarski lekovi i druge supstance). Ipak, kada je reč o dermalnoj raspoloživosti lekova, očigledan je nedostatak integralnog dokumenta koji bi pružio univerzalne smernice za ispitivanje lekova koji se primenjuju na koži.

Američki FDA, u svom vodiču koji se odnosi na nesterilne polučvrste farmaceutske oblike, navodi da se za potrebe procene dermalne raspoloživosti i ekvivalentnosti lekova, osim skupih i dugotrajnih **kliničkih studija**, može primeniti i **vazokonstriktorni test** (karakterističan za kortikosteroide) ili drugo validirano ispitivanje, poput dermatofarmakokinetičkog metoda (US FDA Guidance for Industry, 1997). Značajno je istaći da se, u slučaju ispitivanja lekova iz drugih farmakoloških grupa, mora pristupiti odgovarajućoj kliničkoj studiji koja je često nezadovoljavajuće osetljivosti, a zahteva uključivanje više stotina ispitanika (N'Dri-Stempfer i sar., 2008). Nadalje, nakon primene leka na koži, koncentracije lekovite supstance (ili odgovarajućeg biomarkera) u krvi ili urinu često su reda veličine pikograma, i stoga ispod limita detekcije ili kvantifikacije dostupnih analitičkih metoda (Piacquadio i Kligman, 1998).

Konačno, potrebno je naglasiti da su svi prethodno pomenuti dokumenti zapravo vodiči/smernice, te da je mnogo toga prepušteno iskustvu istraživača.

Prema tome, ispitivanje permeacije u ili penetracije kroz kožu važno je, kako za procenu efikasnosti lekova koji se primenjuju na koži, tako i za potrebe poređenja različitih formulacija (Russell i Guy, 2009). U narednim poglavljima dat je pregled najznačajnijih metoda koje nalaze primenu u ispitivanju dermalne raspoloživosti lekova, uz kritički osvrt na prednosti i nedostatke koje ih prate.

### 1.4.1 *In vitro* metode karakterizacije

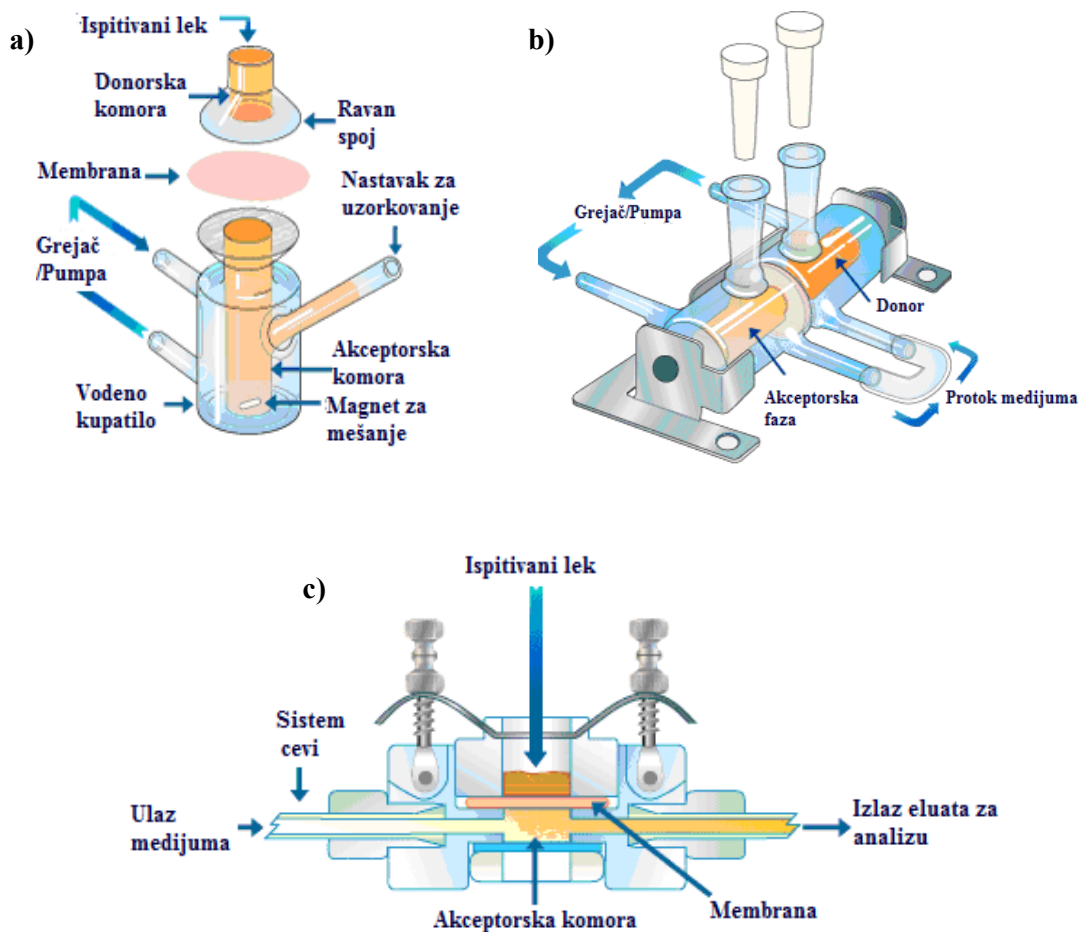
Za potrebe procene dermalne raspoloživosti lekova mogu se primeniti različite *in vitro* i *in vivo* metode. Iako mnoge regulatorne agencije širom sveta imaju različite stavove po pitanju opravdanosti primene *in vitro* podataka u tu svrhu, neosporno je da *in vitro* tehnike imaju mnoge prednosti u poređenju sa *in vivo* metodama. Osnovna prednost svakako je jednostavnost, ekonomičnost i izbegavanje potrebe za pribavljanjem kompleksne dokumentacije prilikom aplikovanja za dobijanje dozvole odgovarajućeg Etičkog komiteta, što je korak koji prethodi svakom *in vivo* ispitivanju.

Većina *in vitro* ispitivanja oslanja se na primenu različitih **difuzionih ćelija**, koje se među sobom razlikuju od dvokomponentnih "statičnih" do višeslojnih "protočnih" (eng. *flow-through*) ćelija (slika 1.2) (Sanghvi i Collins, 1993). Statične difuzione ćelije su uglavnom vertikalnog tipa (Franz-ova ćelija) ili "jedna-do-druge" (eng. *side-by-side*) tipa (Walters i Brain, 2009).

Vertikalne difuzione ćelije smatraju se posebno pogodnim za ispitivanje polučvrstih preparata koji se primenjuju na koži (kremovi, gelovi i masti), a dugogodišnja uspešna primena u ispitivanju perkutane resorpcije lekova rezultovala je uključivanjem vertikalnih difuzionih ćelija u novo izdanje Američke farmakopeje (Brown i sar., 2011; Hanson i Heaney, 2013). Naime, uvedena su dva nova poglavlja koja se odnose na ispitivanje lekova koji se primenjuju na koži:

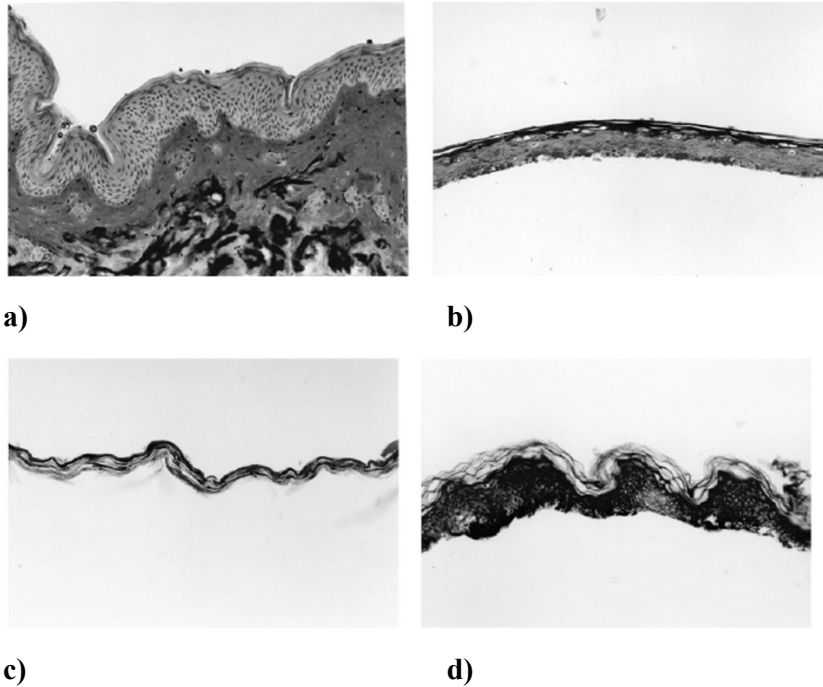
- poglavlje <3> *Topical and Transdermal Drug Products: Quality Tests* (u USP 35), i
- poglavlje <1724> *Semisolid Drug Products – Performance Tests* (u USP 36) (Marques i sar., 2012).

Poglavlje <3> obuhvata ispitivanje prividnog viskoziteta i ujednačenosti sadržaja lekovite supstance, kao i ispitivanja svojstava poput adhezivnosti i propustljivosti koja se odnose na transdermalne sisteme (flastere). *In vitro* ispitivanje oslobađanja lekovite supstance iz datih farmaceutskih oblika primenom vertikalnih difuzionih ćelija deo je poglavlja <1724>.



**Slika 1.2.** Shematski prikaz osnovnog dizajna difuzionih ćelija: **a)** statična vertikalna ćelija, **b)** *side-by-side* ćelija i **c)** protočna ćelija (modifikovano sa PermeGear Inc, 2012).

Iako se kao važna prednost primene *in vitro* metoda često navodi precizna kontrola eksperimentalnih uslova (dugo se smatralo da su jedine značajne promenljive ispitivani lek/formulacija i priroda membrane koja odvaja donorski od receptorskog dela ćelije) (Shah i sar., 2002), pokazano je da su i ispitivanja pomoću difuzionih ćelija podložna varijacijama na različitim nivoima: počevši od sastava receptorske faze, primenjene količine/doze ispitivanog leka (*finite* ili *infinite dose*), dužine trajanja eksperimenta i definisanog vremena uzorkovanja (značajno sa aspekta očuvanja integriteta primenjene membrane) (OECD Guideline 428, 2004).



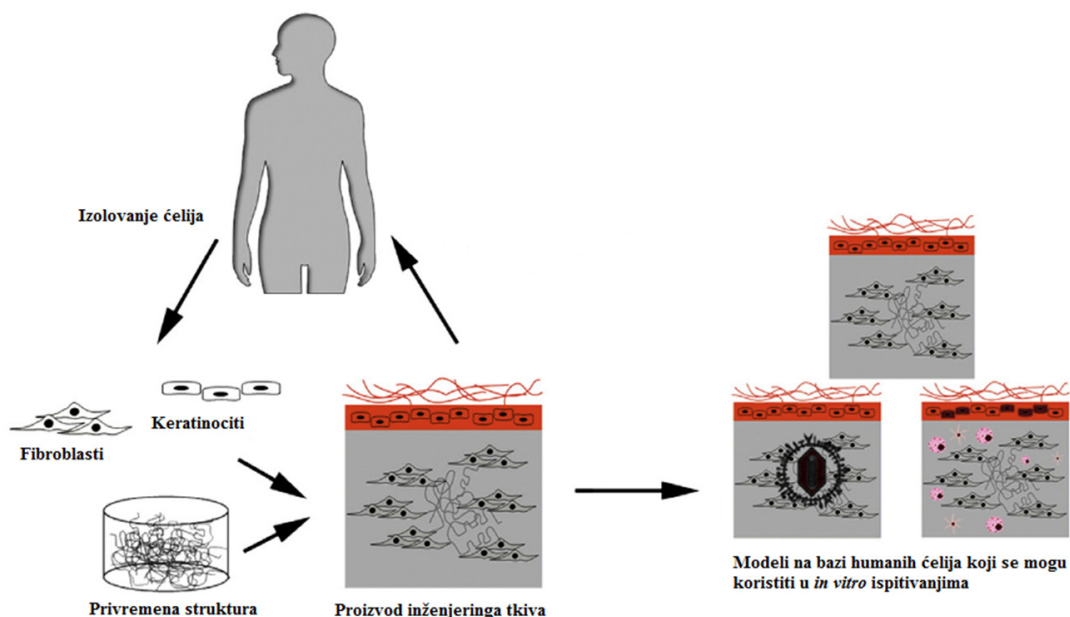
**Slika 1.3.** Uporedni prikaz različitih karakteristika: **a)** kože pune debljine, **b)** rekonstruisanog ekvivalenta kože (EpiDerm<sup>®</sup>), **c)** *stratum corneum*-a izolovanog tripsinom i **d)** *stratum corneum*-a izolovanog pod uticajem toplote, kao potencijalnih membrana za ispitivanje permeacije lekova (Wagner i sar., 2001).

Iako je u *in vitro* ispitivanjima moguće primeniti različite **membrane sintetskog, životinjskog ili humanog porekla**, očigledna mana ove metode jeste nedostatak vijabilnog tkiva, potkožnih/potpornih struktura, metaboličke aktivnosti i opšte cirkulacije (Godin i Touitou, 2007; Zatz, 1995). Stoga, treba biti oprezan prilikom tumačenja rezultata koji se odnose na lekove koji ekstenzivno podležu metabolizmu u koži. Iako bi se prethodno pomenuti nedostaci na prvi pogled mogli prevazići upotrebom **kože pune debljine** (slika 1.3.a), pokazano je da to uslovljava niske vrednosti apsorpcionih parametara lekova koji su slabo rastvorni u vodi. S obzirom da lekovite supstance ulaze u sistemsku cirkulaciju u početnim slojevima dermisa, prisustvo kompletnog hidrofilnog derma u uslovima *in vitro* ispitivanja ponaša se poput veštačke barijere za lekove slabo rastvorne u vodi. Ovo bi se moglo rešiti primenom tzv. **dermatomed kože** (sloj kože sa redukovanom debljinom derma, dobijen primenom istoimenog uređaja koji prvenstveno nalazi primenu u estetskoj hirurgiji), ili **izolovanog epidermisa** u kom slučaju je eliminisano prisustvo dermisa (Narkar, 2010).

Isečki kože (eng. *excised skin*) kao model membrane u *in vitro* ispitivanjima mogu biti humanog ili životinjskog porekla. Iako je poželjno kad god je to moguće primeniti isečke humane kože, takav materijal nije uvek lako obezbediti, s obzirom da se dobijaju od donora koji se podvrgnu plastičnoj hirurgiji. Iz tog razloga, ispitana je pogodnost primene različitih animalnih modela. U literaturi se mogu naći studije koje u ovu svrhu koriste kožu primata, svinje, glodara (miševi, pacovi, zamorci), pa čak i reptila (zmije). Pokazano je da je brzina penetracije značajno viša kod glodara nego kod humane kože (koža pacova je oko 10 puta permeabilnija). Koža svinje smatra se relevantnim i lako dostupnim modelom za *in vitro* studije, histoloških karakteristika sličnih humanoj koži (Meyer i sar., 2007). U poređnom analizom rezultata *in vitro* ispitivanja permeacije lekova kroz humanu i kožu svinje, dobijen je Pirsonov koeficijent korelacije od 0,88, što ukazuje na zadovoljavajuću korelaciju podataka dobijenih primenom dva modela ( $p < 0,0001$ ). Ipak, uprkos manjim koeficijentima varijacije (21% za kožu svinje, u poređenju sa 35% za humanu kožu), uočene su značajne razlike u izračunatom vremenu odlaganja (eng. *lag time*) (Barbero i Frasch, 2009).

S obzirom da nije jednostavno obezbediti isečke humane kože za potrebe istraživanja, kao potencijalna alternativa ponuđeni su različiti proizvodi inženjeringa tkiva (slika 1.4). Dve osnovne vrste ovakvih ćelijskih kultura su: 1) **ekvivalenti kože** koji sadrže dermis, epidermis i delimično diferenciran dermis, ali ne i adneksa kože, i 2) **humani rekonstruisani epidermis** sastavljen od keratinocita na odgovarajućem supstratu (poput komercijalno dostupnih EpiSkin<sup>®</sup>, L'Oreal, Francuska; SkinEthic<sup>®</sup>, SkinEthic Laboratories, Francuska; ili EpiDerm<sup>®</sup>, MatTek Corporation, SAD). Komparativne studije pokazale su da je permeacija kroz humani rekonstruisani epidermis reproducibilna, ali značajno viša od realne. Stoga se obično koriste prilikom poređenja formulacija sa ciljem njihove optimizacije, pod uslovom da prisutni ekscipijensi ne narušavaju integritet membrane tokom ispitivanja, što bi rezultovalo lažno visokim rezultatima permeacije. Uprkos većoj sličnosti sa humanom kožom, i ekvivalente kože karakteriše prenaplašena permeacija supstanci. Zbog toga se ove membrane još uvek ne smatraju pogodnim modelima za kvantitativnu procenu percutane permeacije lekova (Groeber i sar., 2011; Russell i Guy, 2009).





**Slika 1.4.** Shematski prikaz dobijanja membrana postupcima inženjeringa tkiva (prilagođeno iz Groeber i sar., 2011).

Uprkos brojnim istraživanjima u sferi *in vitro* metoda, regulatorne agencije još uvek ne prihvataju *in vitro* ispitivanje oslobađanja leka kao adekvatnu zamenu za *in vivo* ispitivanje dermalne raspoloživosti i ekvivalentnosti. Međutim, ova metoda, uz primenu polusintetskih membrana prihvaćena je kao koristan test za procenu kvaliteta preparata koji podležu izvesnim promenama tokom *scale-up* procesa, s obzirom da uspešno ukazuje na promene koje mogu nastati kao posledica različitih fizičko-hemijskih karakteristika poput rastvorljivosti, veličine čestica lekovite supstance ili reoloških osobina podloge (US FDA Guidance, 1998). Promenama koje mogu značajno uticati na formulaciju smatraju se promene u sastavu ( $> 5\%$  i  $< 10\%$  količine ekscipijensa, promena dobavljača ili kvaliteta stabilizatora, ili promena u distribuciji veličina čestica lekovite supstance), proizvodne opreme, proizvodnog procesa, desetostruka promena veličine šarže i drugo (Narkar, 2010; US FDA Guidance, 1997b).

## 1.4.2 *In vivo* metode karakterizacije

### 1.4.2.1 Vazokonstriktorni test

Kortikosteroidi su jedna od retkih grupa lekovitih supstanci koji, kada se nanesu na kožu, dovode do merljivog izbeljivanja kože kao posledica vazokonstrikcije dermalne mikrovaskulature, nakon što molekuli leka permeiraju kroz epidermis. FDA je procenila da se ovaj farmakodinamski efekat može uspešno iskoristiti za ispitivanje dermalne raspoloživosti i ekvivalentnosti kortikosteroida koji se primenjuju na koži (US FDA Guidance, 1995). Razvoj uređaja poput hromametra omogućio je objektivno merenje promena u boji kože zadovoljavajuće osetljivosti, čime je napuštena praksa vizuelne ocene od strane iskusnih, treniranih istraživača (Montenegro i sar., 1996). Instrumentalna merenja mogu biti zasnovana na tzv. L-skali (svetlo-tamno), a-skali (crveno-zelena) i/ili b-skali (žuto-plavo). Iako FDA u svom vodiču navodi primenu Minoltinih hromametara 200 i 300 serije, u mnogim publikacijama primenjivani su uređaji drugih proizvođača (Clarys i sar., 2000; Russell i Guy, 2009).

Protokol predložen od strane FDA uključuje dve faze. Najpre je neophodno sprovesti **pilot studiju** kojom se bliže određuje uticaj vremena izloženosti kože leku na stepen izbeljenja kože. Potom se pristupa samoj **studiji bioraspoloživosti** kojom se prati farmakodinamski odgovor tokom 24-28 sati. Ne treba izgubiti iz vida da na stepen izbeljivanja kože utiče i potentnost samog kortikosteroida. Uprkos činjenici da je u pitanju regulatorno prihvaćena metoda ispitivanja, nedostaci koje sa sobom nosi odnose se na način primene hromametra (pritisak kojim se sonda hromametra nanosi na kožu može uticati na boju kože), neujednačenost bazalne boje kože istog ispitanika (značajne intraindividualne varijacije svojstvene većini *in vivo* ispitivanja) ili drugim cirkadijalnim varijacijama. Takođe, pokazalo se da na stepen izbeljivanja kože kao praćeni farmakodinamski odgovor mogu uticati i drugi biofizički parametri kože poput vlažnosti SC (Haigh i Kanfer, 1984), ili pak inherentni kapacitet mikrovaskulature za vazokonstrikciju kod nekih ispitanika može biti lako zasićen (eliminacija takvih ispitanika tokom pilot studije), u kom slučaju bi se teško mogle uočiti razlike među ispitivanim formulacijama (Russell i Guy, 2009).

### **1.4.2.2 Metode karakterizacije u fazi ispitivanja**

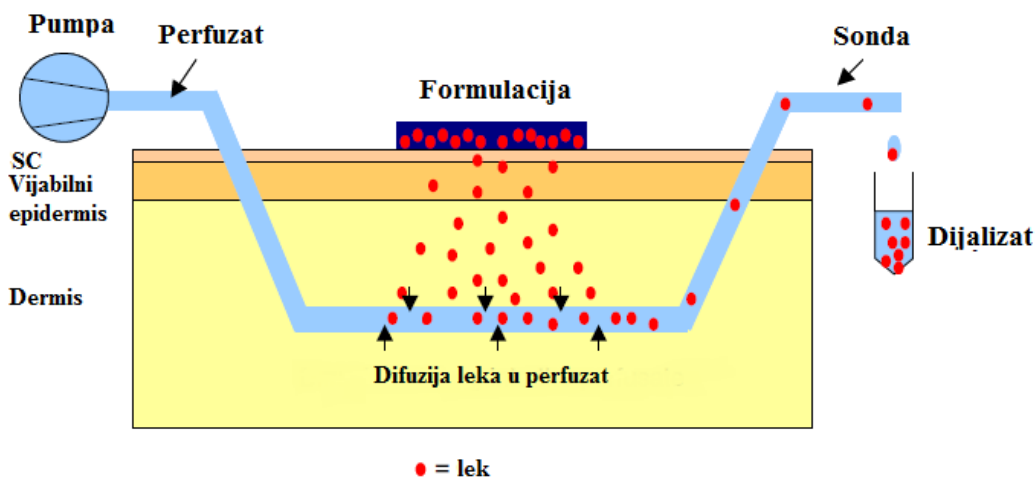
Kao posledica prirode rezultata koje pružaju kliničke studije lekova koji se primenjuju na koži (značajne intra- i interindividualne varijacije), broj ispitanika koji se mora uključiti u kliničke studije sa ciljem postizanja potrebne statističke značajnosti podataka, može biti reda veličine nekoliko stotina. Iz tih razloga, regulatorne agencije su pokazale interesovanje za razvojem alternativnih metoda ispitivanja lekova koji se primenjuju na koži, koje bi mogle zameniti duge, skupe, a neretko i nedovoljno osetljive kliničke studije. S obzirom da različite lekovite supstance ispoljavaju svoj efekat na različitim ciljnim mestima, teško je pretpostavili da će se u tu svrhu razviti jedan univerzalan metod.

U oblasti istraživanja biofarmaceutskih karakteristika lekova koji se primenjuju na koži, vlada veliko interesovanje za razvojem i standardizacijom pogodne *in vivo* metode koja bi dovoljno verno odražavala realne uslove primene (Au i sar., 2010; Darlenski i sar., 2009; Narkar, 2010). Kako bi se pojednostavilo ispitivanje lekovitih supstanci iz različitih terapijskih grupa, poslednjih godina ispituje se mogućnost primene nekoliko *in vivo* metoda: mikrodijaliza kože, primena spektroskopije bliskog infracrvenog spektra (NIR), biopsija kože i *tape stripping* (TS) tehnika.

#### **1.4.2.2.1 Mikrodijaliza kože**

Mikrodijaliza kože kao tehnika za ispitivanje dermalne raspoloživosti lekova uvedena još 1994. godine. Zasniva se na uvođenju ultratanke šuplje sonde u dermis. Sonda mora biti polupropustljiva što omogućava perfuziju sterilnog pufera, malom brzinom koju kontroliše odgovarajuća pumpa. Sonda na neki način vrši ulogu veštačkog krvnog suda, i omogućava razmenu malih difuzibilnih molekula iz ekstracelularne tečnosti u sondu, i obratno (Narkar, 2010). Na taj način, određuje se frakcija slobodnog (rastvorenog) leka u ekstracelularnoj tečnosti tkiva, i dobijaju profili zavisnosti koncentracije od vremena (Muggleston i sar., 2012; Russell i Guy, 2009). Pored lekovitih supstanci, koje obično moraju biti relativno male molekulske mase i rastvorne u vodi, i biomarkeri koji nastaju kao odgovor na primenu lekova na koži takođe se mogu pratiti ovom metodom. Prednost metode leži i u tome da se ispitivane i referentne

formulacije mogu simultano ispitivati na istom ispitaniku, čime se značajno redukuju intraindividualne varijacije. To omogućava angažovanje manjeg broja ispitanika prilikom procene dermalne raspoloživosti ili ekvivalentnosti lekova koji se primenjuju na koži (Narkar, 2010).



**Slika 1.5.** Shematski prikaz opšteg principa mikrodijalize kože kao *in vivo* metode za ispitivanje dermalne raspoloživosti lekova: kroz sondu koja se insertuje u dermis protiče perfuzat kontrolisanom brzinom (pumpa). Lek iz primenjenog nosača permeira kroz SC i vijabilni epidermis, do dermisa. Dijalizat se uzorkuje u definisanim vremenskim intervalima (prilagođeno iz Wiedersberg i sar., 2008).

Pored brojnih prednosti, prepoznati su i određeni nedostaci metode. Najpre, *recovery* je nizak u slučaju veoma lipofilnih lekovitih supstanci, ili onih koje pokazuju afinitet za vezivanje za proteine ili materijal od koga je sonda izrađena. To se donekle može prevazići dodatkom solubilizatora poput albumina, Intralipid<sup>®</sup>-a, Encapsin<sup>®</sup>-a, ciklodekstrina, ili pak korastvarača poput etanola, propilenglikola ili dimetilsulfoksida. Dalje, precizna kalibracija sonde, uz optimizaciju brzine perfuzije i vremena uzorkovanja, neophodni su pre primene osetljive analitičke metode za određivanje malih koncentracija leka koji će se naći u perfuzatima. U svakom slučaju, u pitanju je donekle invazivna metoda koja može prouzrokovati traumu tkiva praćenu inflamacijom. Zbog toga metodu treba da sprovodi samo obučeno osoblje, kako bi se insertovanje sonde u kožu obavljalo uvek na istoj dubini (slika 1.5). Konačno, kao najveća zamerka metodi navodi se značajna varijabilnost dobijenih rezultata, što se ogleda u koeficijentima varijacije od 50 do 100 % (Narkar, 2010; Russell i Guy, 2009).

#### **1.4.2.2.2 Spektroskopske metode (Raman spektroskopija i spektroskopija bliskog infracrvenog spektra)**

Raman spektroskopija i spektroskopija bliskog infracrvenog spektra (eng. *Near Infra-Red*, NIR spektroskopija) smatraju se naprednim, neinvazivnim *in vivo* tehnikama za ispitivanje difuzije lekovitih supstanci kroz kožu. Osnovni preduslov za primenu svake spektroskopske metode, pa i ovih, ali i prvi nedostatak koji ograničava njihovu univerzalnu primenu, jeste da ispitivana molekula mora posedovati specifične spektralne osobine dovoljnog intenziteta, kako bi se diferencirala od složenog spektra kože. Naime, na snimljenom spektru, na čiji izgled će uticati kako složena struktura kože, tako i različiti sastojci primenjenog leka (formulacije), istraživač mora prepoznati signal analita (Narkar, 2010).

U literaturi se mogu naći podaci o primeni konfokalne Raman spektroskopije za *in vivo* istraživanje molekularne strukture kože, efekata vlažećih agenasa na nivo hidratacije kože, ili penetracije supstanci poput uree i dimetilsulfoksida u kožu (Gotter i sar., 2010). Nedostatak metode ogleda se u činjenici da je semi-kvantitativna, tj. omogućava određivanje prividne, a ne apsolutne koncentracije lekovite supstance u koži (Narkar, 2010).

Što se NIR spektroskopije tiče, može se reći da je primena ove metode u svrhu ispitivanja dermalne raspoloživosti još uvek u začetku. NIR talasi mogu penetrirati u kožu do dubine od nekoliko centimetara, zavisno od primenjene talasne dužine, a primenom odgovarajućih matematičkih metoda dolazi se do podatka o sadržaju analita tokom njegove difuzije kroz kožu. Iako se u literaturi može naći više primera *in vitro* primene (kadaver), NIR spektroskopija se može koristiti i tokom *in vivo* studija uz primenu odgovarajućih sondi od optičkih vlakana (eng. *fiber-optic probes*).

#### **1.4.2.2.3 Biopsija kože**

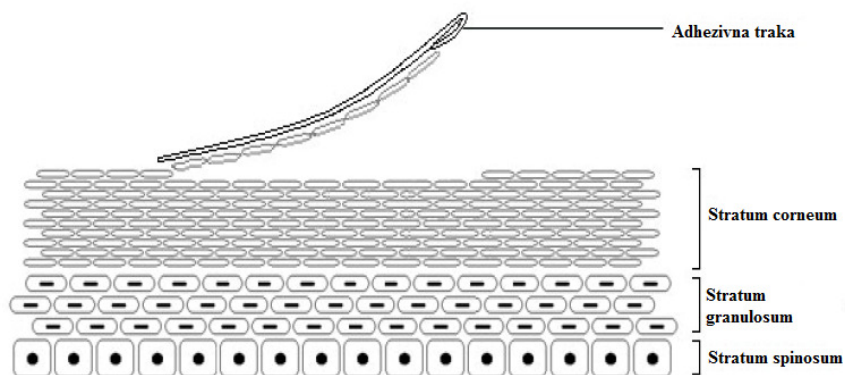
Tehnika biopsije površinskih slojeva kože zasniva se na primeni cijanoakrilatnog lepka koji se nanosi na staklene pločice. U kontaktu sa kožom dolazi do polimerizacije adheziva, što omogućava da se zajedno sa pločicom ukloni i deo kože. S obzirom da se ovim putem uklanjaju i folikuli dlake, nije moguće razlikovati transepidermalni i

transfolikularni put resorpcije leka (Teichmann i sar., 2005). Imajući u vidu izrazito invazivnu prirodu metode, prevashodno nalazi primenu prilikom dijagnostike i istraživanja površinskih mikoza (Rosado i Rodrigues, 2003).

#### 1.4.2.2.4 Metoda sa adhezivnim trakama (*tape stripping, skin stripping*)

S obzirom da su prethodno navedene metode ili izrazito invazivne ili zahtevaju primenu skupih i sofisticiranih uređaja, *tape stripping* (TS) metod izdvojio se kao neinvazivna i ekonomična opcija (Narkar, 2010). TS ili metoda sa adhezivnim trakama predstavlja tzv. **dermatofarmakokinetički pristup** procene penetracionih profila lekovite supstance kroz *stratum corneum* kao osnovnu barijeru kože koju lekovita supstanca mora da prođe kako bi dospela do dubljih tkiva, a u nekim slučajevima i do sistemske cirkulacije (Russell i sar., 2008). Ukratko, metoda se zasniva na sukcesivnom uklanjanju slojeva SC adhezivnim trakama, sledstvenoj ekstrakciji i određivanju koncentracije lekovite supstance iz uklonjenih slojeva tretirane kože (slika 1.6) (Russell i Guy, 2009).

Iako se protokol zasniva na uklanjanju slojeva SC, metoda jeste u osnovi neinvazivna, s obzirom da se 80 - 90 % barijernog svojstva kože regeneriše nakon 3 dana, a vrednosti TEGV se vraćaju na bazalne za 8 do 11 dana (Russell i sar., 2008).



**Slika 1.6.** *Tape stripping* metoda: uklanjanje slojeva SC sa test-mesta primenom adhezivnih traka.

Interesovanje za ovu metodu pokazale su i regulatorne agencije. Radna grupa FDA je 1998. godine objavila nacrt vodiča sa predloženim protokolom ispitivanja (US FDA

Draft Guidance for Industry, 1998). Ukratko, kako bi se opravdao koncept dermatofarmakokinetike, protokol predložen od strane FDA predviđao je procenu faza resorpcije i eliminacije (klirensa) nakon što se ispitivani lek nanese na definisanu površinu kože. Nakon odabranih vremenskih intervala, višak neresorbovanog leka se ukloni sa kože, a slojevi SC se prikupljaju sukcesivnom primenom 12 adhezivnih traka. Prve dve trake se odbacuju, a narednih 10 se (zajedno) analiziraju, kako bi se odredio sadržaj leka u SC u različitim vremenskim tačkama tokom faza resorpcije i eliminacije, čime se generiše profil zavisnosti koncentracije leka u SC od vremena, i farmakokinetički parametri poput površine ispod krive (eng. AUC), maksimalne koncentracije ( $C_{max}$ ) i vremena postizanja najviše koncentracije ( $T_{max}$ ).

Međutim, ovaj vodič je povučen maja 2002. godine, nakon što su dobijeni varijabilni rezultati ispitivanja tretinoin gela od strane dve nezavisne laboratorije, a zainteresovani istraživači pozvani su na dalji rad na optimizaciji date metode (N'Dri-Stempfer i sar., 2008; Russell i Guy, 2009).

Dosadašnja ispitivanja fokusirala su svoju pažnju na brojne faktore (tabela 1.6) koji potencijalno mogu uticati na dobijene rezultate.

Jedna od prvih stvari koju su istraživači osporili u prvobitnom protokolu odnosila se na opravdanost odbacivanja prve dve trake. Rezon ponuđen od strane FDA bio je da se na taj način uklanja rezidualni sloj leka koji do tog momenta nije penetrirao, zajedno sa inače deskvamiranim slojem korneocita sa površine kože. Ipak, značaj analize koncentracije leka i u prvim uklonjenim adhezivnim trakama povezan je sa boljom reproducibilnosti rezultata, s obzirom da se analizom svih upotrebljenih traka može dobiti uvid u ukupnu količinu leka (Russell i Guy, 2009). Takođe, FDA vodič predviđao je upotrebu fiksnog broja traka, dok neki istraživači predlažu praćenje povećanja transepidermalnog gubitka vode (TEGV). Naime, osmostruko povećanje bazalne vrednosti ovog biofizičkog parametra smatra se dovoljnim pokazateljem da je trakama uklonjen kompletan SC. Dalje, postavljeno je pitanje lateralne difuzije leka, i da li površina kože koja će biti tretirana ispitivanim lekom treba da se razlikuje od površine primenjenih adhezivnih traka (Narkar, 2010). Ovaj momenat mnogi istraživači smatraju odgovornim za razlike u rezultatima prethodno pomenutih ispitivanja tretinoin gela, koja su dovela do povlačenja nacrtu vodiča FDA 2002. godine (Russell i Guy, 2009). Konačno, kako bi se rešio problem limita kvantifikacije lekovite supstance tokom

analize sadržaja leka u pojedinim trakama, neki istraživači pribegavaju određivanju sadržaja lekovite supstance u nekoliko traka istovremeno (Lau i sar., 2010).

**Tabela 1.6.** Prikaz kritičnih parametara koji mogu značajno uticati na rezultate dobijene metodom sa adhezivnim trakama.

Faktori koji mogu uticati na rezultate ispitivanja	Napomene	Reference
Anatomsko mesto	ruka, abdomen, leđa, čelo (pokazana razlika u permeabilnosti kože)	Tokumura i sar., 2006
Priroda i količina uzorka koji se nanosi	tačno definisana ( <i>finite dosing</i> ) <i>infinite dosing</i>	Jacobi i sar., 2003; Weigmann i sar., 1999
Vreme izlaganja tretiranog mesta uzorku	15 min – 24 h	Löffler i sar., 2004
Način uklanjanja viška uzorka	pamučni tuferi etanol odbacivanje prvih traka (1-2)	Reddy i sar., 2002
Vrsta traka	okluzivna vs. neokluzivna traka	Tokumura i sar., 1999a
Broj traka koji se sakuplja	od 5 do 100 traka	Löffler i sar., 2004; Breternitz i sar., 2007
Pritisak koji se vrši na traku	uređaj kojim se pritisak vrši (roler, teg) vreme izlaganja pritisku	Breternitz i sar., 2007
Količina korneocita koja se trakama uklanja	/	Jacobi i sar., 2005; Russell i sar., 2008
Broj ispitanika	starost stanje kože	Lademann i sar., 2009
Klimatski uslovi ispitivanja	godišnje doba ambijentalni uslovi (t, RV)	Tokumura i sar., 1999b
Način uklanjanja traka	smer i ugao pod kojim se trake uklanjaju	Ghadially i sar., 1995

U svakom slučaju, očigledan je značaj razmatranja debljine SC svakog individualnog ispitanika kako bi se smanjila varijabilnost rezultata. Poznato je da



debljina SC kože ventralne strane podlaktica, kao najčešćeg mesta ispitivanja, varira od 5 do 20  $\mu\text{m}$  kod zdravih dobrovoljaca. Prema tome ukupna debljina SC uklonjena primenom istog broja adhezivnih traka razlikovaće se među ispitanicima. Stoga, u cilju umanjenja uticaja inter- i intraindividualnih razlika na rezultate ispitivanja, neophodno je odrediti ukupnu debljinu sloja SC uklonjenog tokom ispitivanja (Narkar, 2010).

Nakon što su definisani nedostaci originalnog protokola iznetog u nacrtu vodiča FDA, među istraživačima su se izdvojile dve osnovne postavke TS metode.

Prvi, tzv. **two-time metric koncept** zasniva se na tome da se i faza resorpcije i faza eliminacije ispituju u jednoj vremenskoj tački po formulaciji, za razliku od nacrtu FDA vodiča koji predviđa po 4 vremenska intervala za svaku fazu. Smatra se da je time omogućena veća statistička značajnost rezultata dobijenih na manjem broju ispitanika. Ovakav metod ne odbacuje prve dve trake, ali praktikuje grupisanje traka u cilju pripreme eluata sa višim koncentracijama praćene lekovite supstance, uz određivanje i ukupne količine leka u SC svakog test-mesta. Na ovaj način uspešno je ispitana bioekvivalentnost retinoida i ekonazola (Navidi i sar., 2008; N'Dri-Stempfer i sar., 2008).

Drugi pristup zasniva se na dobijanju **profila koncentracije lekovite supstance duž SC**. U tom slučaju neophodno je odrediti: *i*) koncentraciju lekovite supstance i *ii*) količinu/debljinu uklonjenog sloja SC, u svakoj primenjenoj adhezivnoj traci i dovesti ih u vezu sa dubinom kožne barijere na kojoj je ispitivana penetracija leka (Russell i Guy, 2009). Kvantifikaciji sloja SC koji se trakama uklanja može se pristupiti na različite načine (Weigmann i sar., 2003):

1) **Gravimetrijski pristup** (merenje traka pre i posle primene): na osnovu izmerene mase uklonjenog sloja SC i njegove gustine, dobija se uvid u volumen uklonjenog tkiva. Dalje, ukoliko je površina kože poznata i kontrolisana, može se izračunati prosečna debljina SC ( $x$ ) po traci. Ukoliko je simultano sa uklanjanjem traka meren i TEGV (Zhai i sar., 2007), ukupna debljina SC ( $H$ ) može se izračunati iz nelinearnog modela prikazanog sledećom jednačinom (Russell i sar., 2008):

$$TEGV = B + D \cdot K \cdot AC / (H - x) \quad (1)$$

gde je  $B$  konstanta,  $D$  difuzivnost vode u SC,  $K$  je particioni koeficijent vode između SC i vijabilnog tkiva, a  $\Delta C$  koncentracioni koeficijent vode duž SC. Kada se registruje 4- ili 5-ostruko povećanje TEGV, tj. kada je oko 75 % SC uklonjeno, smatra se da je prikupljeno dovoljno informacija za izračunavanje  $H$ . Poznavanje vrednosti  $H$  omogućava da se koncentracioni profili leka izraze u odnosu na  $x/H$ , odnosno relativnu dubinu uklonjenog SC (pri čemu  $x/H = 0$  odgovara površini kože, a  $x/H = 1$  međupovršini SC i *stratum granulosum*-a). Ipak, nedostaci prikazanog gravimetrijskog pristupa su što je postupak zametan, preciznost može biti diskutabilna s obzirom na malu masu SC u poređenju sa masom trake, a podložan je i uticaju faktora poput stepena hidratisanosti kože ili atmosferskim uslovima ispitivanja (Russell i Guy, 2009; Wiedersberg i sar., 2009).

2) Iako se **merenje zasnovano na UV pseudo-apsorpciji korneocita** čini interesantnom alternativom, korelacija između ovakvog merenja i mase SC je nezadovoljavajuća, osim ukoliko se iz ispitivanja isključe trake kojima je uklonjen nehomogen sloj SC (Lindemann i sar., 2003).

3) **Određivanje proteina kože ekstrahovanih sa traka** takođe može biti iskorišćeno u svrhu određivanja dubine penetracije leka, s obzirom da je uočena zadovoljavajuća korelacija apsorbance izmerene spektroskopski primenom infra-crvenog zračenja i mase proteina uklonjenog sloja SC (Bashir i sar., 2001; Mohammed i sar., 2012; Voegeli i sar., 2007).

4) U poslednje vreme, istražuje se i mogućnost primene određenih mikroskopskih metoda za određivanje SC na trakama. Mikrografije visoke rezolucije upotrebljenih traka snimaju se pri kontrolisanim uslovim: mikrografija se sastoji od oko 64000 piksela, od kojih svaki ima određenu *grayscale* vrednost dodeljenu od strane odgovarajućeg softvera. Statistička analiza distribucije tih piksela pruža srednju *grayscale* vrednost na osnovu koje se dobija relativna vrednost sadržaja SC na trakama. Ukoliko se zanemari činjenica da zahteva primenu sofisticiranog uređaja, ovaj pristup je generalno brz, jednostavan, osetljiv i precizan (Russell i Guy, 2009).

Koji god da je od predstavljenih pristupa primenjen, koncentracioni profili leka u funkciji relativnog položaja u SC ( $x/H$ ) obično odgovaraju sledećoj modifikaciji drugog Fikovog zakona difuzije:

$$C_x = KC_v [(1 - x/H) - 2/\pi \sum_{n=1}^{\infty} \sin(n\pi x/H) \exp(-Dn^2\pi^2 t/H^2)] \quad (2)$$

kojim se podrazumeva da je primenjena *infinite dose* leka, da u SC inicijalno nije bilo leka, da je SC homogena barijera i da vijabilni epidermis pruža odgovarajuće *sink* uslove. Pod ovim uslovima, koncentracija leka  $C_x$  u funkciji vremena  $t$  i položaja  $x$  u SC ukupne debljine  $H$  data je jednačinom 2, pri čemu je  $C_v$  koncentracija leka u vehikulumu,  $K$  je SC-vehikulum particioni koeficijent leka, a  $D/H^2$  karakterističan difuzioni parametar izražen u recipročnim jedinicama vremena. Smatra se da primena ovakvog koncepta može da omogući prikupljanje dovoljno informacija i na malim populacijama od svega 4 - 6 ispitanika (Russell i Guy, 2009).

Određivanje koncentracije lekovite supstance sa adhezivnih traka u najvećem broju slučajeva sprovodi se primenom odgovarajuće HPLC metode, kojoj mora prethoditi korak ekstrakcije leka sa primenjenih traka. U cilju racionalizacije celokupnog protokola, određeni istraživači rade na razvoju direktne metode koja bi simultano određivala lekovitu supstancu i količinu uklonjenog SC. Ovakav direktan spektroskopski metod razvijen je za svega nekoliko model supstanci, poput UV filtera 4-metilbenzilidenkamfora od strane Fässler Tassopoulos (2006).

Istraživanje potencijala primene TS metode za potrebe procene dermalne raspoloživosti i ekvivalentnosti lekova započeto je kao mehanicističko sagledavanje predloženih protokola primenom jednostavnih binarnih i ternarnih sistema (lekovita supstanca u jednom ili više rastvarača) (Boix-Montanes, 2011; Lademann i sar., 2009). S druge strane, poznato je da se savremeni lekovi koji se primenjuju na koži obično sastoje od kompleksnih nosača, i u tom kontekstu treba napomenuti da primena TS tehnike u ispitivanju penetracionih profila lekovitih supstanci iz takvih nosača još uvek nije šire ispitana.

Kao i u slučaju prethodno opisanih *in vivo* metoda, i TS metodu odlikuju određeni nedostaci. Osim činjenice da, zavisno od definisanog protokola, metoda može biti zametna i duga, možda najznačajniji nedostatak metode leži u tome da se ovim putem ne može diferencirati frakcija leka koja je rastvorena u koži od frakcije koja je kristalizovala u koži, i stoga više nije dostupna za ispoljavanje terapijskog efekta (Muggleston i sar., 2012). Iako je diferencijacija pomenutih frakcija leka za sada

moguća samo primenom dermalne mikrodijalize, neki istraživači ovo ne smatraju značajnim ograničenjem TS metode, s obzirom da, u određenim slučajevima, i deo leka koji je kristalizovao *in situ* može doprineti ukupnoj raspoloživosti sporim rastvaranjem tokom vremena.

Osim primene *in vivo*, TS metoda se može kombinovati sa drugim *in vitro* metodama radi prikupljanja podataka o distribuciji leka u različitim slojevima kože (epidermis, dermis), u različitim vremenskim intervalima, čime se koncentracija leka u određenom tkivu može izraziti u funkciji vremena (Narkar, 2010).

Konačno, trenutni stav istraživačkih grupa koje se bave TS metodom jeste da je u pitanju korisna tehnika. Značajna prednost metode leži u mogućnosti simultanog ispitivanja test i referentnih formulacija na istom ispitaniku. Na taj način, smanjuju se intraindividualne varijacije, uz regrutovanje manjeg broja ispitanika za dobijanje statistički značajnih rezultata (Narkar, 2010).

Nakon povlačenja nacrta vodiča 2002. godine, a do uspostavljanja novog zvaničnog protokola, FDA preporučuje primenu TS metode za ispitivanje bioekvivalentnosti lekova čije je ciljano mesto sam SC (poput antimikotika), dok se za lekove koji ispoljavaju delovanje u dubljem, supkutanom tkivu dosta očekuje od dermalne mikrodijalize. U svakom slučaju, ističe se značaj dermatofarmakokinetičkog pristupa i motiviše svaki nezavisni istraživački doprinos koji bi vodio ka uspostavljanju konačnog protokola ispitivanja TS metodom (Narkar, 2010).

#### **1.4.2.3 Mogućnosti korelacije rezultata dermalne raspoloživosti lekova dobijenih različitim metodama**

*In vitro-in vivo* korelacija (IVIVC) definisana je od strane FDA kao matematički model (koji može biti i nelinearan), koji opisuje odnos između neke *in vitro* karakteristike (obično brzina ili stepen oslobađanja lekovite supstance iz farmaceutskog oblika) i određenog *in vivo* odgovora (US FDA Guidance, 1997a). Ova definicija, namenjena farmaceutskim oblicima za *per os* primenu, doneta je sa ciljem da se pogodnim *in vitro* testom zamene određene *in vivo* studije na humanim dobrovoljcima čime bi se smanjio broj neophodnih kliničkih studija tokom različitih faza regulatornog procesa (Narkar, 2010).

U slučaju lekova koji se primenjuju na koži, u poslednje vreme ističe se pogodnost primene isečaka humane kože (eng. *excised human skin*) kao membrane za difuzione ćelije radi pokazivanja biološke ekvivalentnosti preparata koji se primenjuju na koži. Dobra korelacija pokazana je na primeru hloramfenikola, nikotinamida, acetilsalicilne kiseline, salicilne kiseline, benzojeve kiseline i dinitrohlorobenzena, i to ukoliko je tokom protokola korišćena *finite dose* ispitivanog leka (više odgovara realnim uslovima primene), dok je značajna razlika u vrednostima dobijenim *in vitro* i *in vivo* metodama (4 - 10 puta) dobijena za nikotinsku kiselinu, tioureu i kofein (Franz i sar., 2009). Dobijeni nalazi ukazuju da se *in vitro* metoda univerzalnog protokola ne može još uvek primeniti za potrebe pouzdane IVIVC, te da se ispitivanja dermalne raspoloživosti i ekvivalentnosti lekova koji se primenjuju na koži još uvek moraju koncipirati shodno specifičnostima date lekovite supstance (od slučaja do slučaja).

Uprkos činjenici da je uspostavljanje *in vitro-in vivo* korelacije u slučaju lekova koji se primenjuju na koži veliki izazov, očekuje se više uspeha sa parametrima dobijenim TS metodom i njihovom korelacijom sa *in vitro* ispitivanjima oslobađanja/permeacije (Shah, 2005).

### **1.4.3 *In silico* modeli predviđanja dermalne raspoloživosti - mogućnosti primene**

Jasno je da *in silico* predviđanje raspoloživosti lekova ima brojne prednosti nad sprovođenjem *in vivo* ispitivanja, pre svega sa ekonomskog aspekta, etičkih razloga i utrošenog vremena. U tu svrhu intenzivno se ispituje primena različitih matematičkih modela, zasnovana na empirijskim merenjima ili mehanicističkoj dedukciji, koji kao najčešće parametre koriste lipofilnost i molekulsku masu date lekovite supstance, uz rezultate sprovedenih *in vitro* ispitivanja primenom difuzionih ćelija (Naegel i sar., 2013). Ipak, realno je očekivati da će razvoj takvih modela eventualno dovesti do smanjenja broja potrebnih *in vivo* studija, ali ne i njihovo potpuno izostavljanje.

Među **empirijskim modelima**, najintenzivnije istraživane oblasti su QSPR studije (eng. *Quantitative Structure Permeability Relationships*), koje koreliraju podatke dobijene ispitivanjem permeacije sa fizičko-hemijskim svojstvima ili molekulskom strukturom permeanta (Hansen i sar., 2013). U tu svrhu, kreirane su čitave baze

podataka poput Flynn-ove baze koeficijenata permeabilnosti koja za sada sadrži 97  $K_p$  vrednosti za 94 supstance, širokog spektra molekulskih masa ( $M_r$  od 18 do 765) i oktanol-voda particionih koeficijenata (od -3 do 6) (Brown i sar., 2012; Russell i Guy, 2009). Međutim, važno je istaći da su ovi podaci mahom dobijeni *in vitro* ispitivanjima permeacije lekovitih supstanci iz vodenih rastvora, što svakako nije realan vehikulum/nosač za savremene lekove koji se primenjuju na koži.

Studija pod nazivom EDETOX (*Evaluations and Predictions of Dermal Absorption of Toxic Chemicals*) finansirana od strane EU, omogućila je stvaranje baze podataka za oko 300 supstanci. Podaci koji su proistekli iz ovog projekta ocenjeni su od zainteresovanih istraživača kao pouzdaniji, s obzirom da su rezultat dobro postavljenih studija u kojima su pored fizičko-hemijskih karakteristika supstanci varirani i parametri poput porekla kože (animalna/humana), dizajna difuzione ćelije (statična/protočna), načina primene leka (*finite/infinite dose*), debljine membrane/kože, sastava vehikuluma/nosača, i dr. Iz pomenutih baza podataka razvijeni su brojni novi modeli čijim se matematičkim jednačinama može postići predviđanje *in vivo* ponašanja različite značajnosti (tabela 1.7) (Chen i sar., 2013; Russell i Guy, 2009).

**Tabela 1.7.** Pregled razvijenih modela za predviđanje permeabilnosti (Chen i sar., 2013).

<i>Model</i>	<i>Koeficijent determinacije (<math>R^2</math>)</i>
Mitragotri-jev model četiri putanje	0,53*
Cigla-i-malter model Chen i saradnika	0,60*
Model Potts-a i Guy-a	0,45
Cigla-i-malter model Wang i saradnika	0,54
Model Abraham-a i Martins-a	0,49

\* smatra se da modeli pružaju dobro predviđanje.

S druge strane, QRPR studije (eng. *Quantitative Retention Permeability Relationships*) koreliraju hromatografske parametre sa eksperimentalno dobijenim koeficijentima permeabilnosti. Bioparticiona micelarna hromatografija (eng. *biopartitioning micellar chromatography*) primenjuje modifikovane kolone za HPLC (poput fosfolipida na površini od silicijum dioksida, čime se imitira ćelijska membrana) kao surogate za biološke barijere (Russell i Guy, 2009).

Iako se dosta očekivalo od veštačkih neuronskih mreža koje pružaju mogućnost kako linearne tako i nelinearne korelacije podataka, za razliku od QSPR modela koji se zasnivaju na multiploj linearnoj regresiji (Brown i sar., 2012), u literaturi se može naći ograničen broj publikacija u kojima su se ovi algoritmi pokazali korisni u slučaju lekova koji se primenjuju na koži.

## 2 CILJ ISTRAŽIVANJA

U uslovima trenutne farmakoekonomske situacije uočava se nedostatak lekova u potrebnim dozama/jačinama, a za neke lekovite supstance nisu odabrani pogodni nosači. Značaj primene odgovarajućeg vehikuluma/podloge naročito je izražen u slučaju lekova koji se primenjuju na koži. Ova grupa lekova je podložna uticajima koji dolaze iz kozmetičke industrije, a odnose se na zadovoljavajući izgled, teksturu i senzorne karakteristike nosača, što se direktno reflektuje na očekivanja pacijenata, i u kojoj meri će se pridržavati propisanoj terapiji. Pomenuti nedostatak lekova na tržištu može se prevazići izradom lekova u apoteci čime se, čak i u zemljama sa veoma razvijenom farmaceutskom industrijom, ponovo potencira značaj znanja i veština farmaceuta u *ex tempore* izradi lekova. Kada je reč o emulzionim sistemima koji se primenjuju na koži, posebno kremovima, očekivanja pacijenta od leka se poistovećuju sa kozmetičkim proizvodima, što tradicionalne recepture lekova za kožu, uobičajeno ne mogu da zadovolje. Iz tog razloga, prepoznata je potreba za inoviranjem sastava takvih lekova, pre svega uvođenjem formulacija baziranih na savremenim farmaceutskim ekscipijensima. S druge strane, ostaje otvoreno pitanje procene dermalne raspoloživosti ovakvih lekova, s obzirom da regulatorno prihvaćene metode nisu univerzalno primenljive (poput ograničene primenljivosti vazokonstriktornog testa na lekove iz grupe kortikosteroida) ili se smatraju neracionalnim u fazi razvoja formulacije (podrazumevaju značajna ulaganja i veliki broj ispitanika).

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je razvoj, fizičko-hemijska i biofarmaceutska karakterizacija emulzionih sistema (podloga) stabilisanih prirodnim mešanim emulgatorom tipa alkil poliglukozi (od skora je sertifikovan od FDA kao farmaceutski ekscipijens - cetostearil glukozid i cetostearil alkohol), koje bi našle primenu kao savremeni nosači lekova za primenu na koži. Nakon sveobuhvatne karakterizacije, razvijene formulacije kremova poslužile su kao modeli za razvoj i optimizaciju protokola *tape stripping* metode kao perspektivne *in vivo* tehnike za ispitivanje penetracije lekova kroz kožu, uz sprovođenje korelacije datih rezultata sa onim dobijenim prihvaćenim *in vitro* i *in vivo* metodama kroz nekoliko studija slučaja



(ketoprofen, diklofenak dietilamin i hidrokortizon kao model lekovite supstance sa antiinflamatornim delovanjem, različitih fizičko-hemijskih karakteristika).

U skladu sa navedenim, eksperimentalni rad u okviru doktorske disertacije podeljen je u tri faze, sa sledećim pojedinačnim ciljevima:

### **I faza eksperimentalnog rada:**

- da se formulišu model podloge stabilisane šećernim mešanim emulgatorom iz grupe alkil poliglukozida (cetostearil glukozid i cetostearil alkohol). U skladu sa opštim principima farmaceutske prakse, poželjno je da model podloga bude jednostavnog sastava, kako bi potencijalno odgovarala uslovima izrade magistralnih lekova. U sastavu osnovne podloge biće variran dodatak korastvarača i potencijalnih pojačivača/ubrziavača penetracije dostupnih u uslovima *ex tempore* izrade lekova: izopropanol u koncentraciji od 10 % (m/m), glicerol 20 % (m/m) i propilenglikol 20 % (m/m), čijim dodatkom bi se na jednostavan način mogla modifikovati termodinamička aktivnost, a sledstveno i dermalna raspoloživost, različitih lekovitih supstanci;
- da se model formulacije podloga ispituju kao potencijalni nosači za ketoprofen i diklofenak dietilamin, kao model lekovite supstance različitih fizičko-hemijskih osobina. Izabrane model lekovite supstance biće inkorporirane suspendovanjem u izrađene podloge, kako bi se procenio potencijal same podloge (specifične koloidne strukture) i/ili dodatog korastvarača da rastvori suspendovani lek i time utiče na njegovu termodinamičku aktivnost (što će biti procenjeno deskriptivno – polarizacionom mikroskopijom, i precizno - izračunavanjem saturacione koncentracije/koncentracije zasićenja model lekovitih supstanci u formulisanim podlogama);
- da se pripremljeni uzorci (same podloge i aktivni uzorci) podvrgnu fizičko-hemijskoj karakterizaciji primenom sledećih metoda: polarizaciona mikroskopija; merenje pH i električne provodljivosti; kontinualna reologija; termalna analiza: diferencijalna skenirajuća kalorimetrija i termogravimetrijska analiza, sa ciljem sveobuhvatne karakterizacije uzoraka. U cilju procene fizičke stabilnosti uzoraka, relevantna ispitivanja biće ponovljena nakon 1, 3 i 6 meseci čuvanja na sobnoj temperaturi ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ );

- da se nakon potvrđene preliminarne fizičke stabilnosti uzoraka pristupi analizi biofarmaceutskih karakteristika (*in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja model lekovitih supstanci kroz sintetske membrane uz karakterizaciju dobijenih profila oslobađanja zasnovanu na različitim matematičkim modelima) i *in vitro/in vivo* ispitivanju bezbednosnih profila (*in vitro* ispitivanje citotoksičnosti upotrebom modela rekonstruisanog humanog epidermisa i *in vivo* merenje eritema indeksa, TEGV, pH kože i vlažnosti *stratum corneum*-a primenom savremenih tehnika bioinženjeringa kože);
- da se u cilju objektivnog sagledavanja rezultata, paralelno sa podlogama stabilisanim šećernim emulgatorom, pripreme i ispitaju: kao referentna podloga Nejonski hidrofilni krem (Deutsches Arzneibuch 2006), potvrđenog, farmakopejskog kvaliteta i podloga istog sastava koja sadrži i 10 % (m/m) izopropanola u vodenoj fazi.

### **II faza eksperimentalnog rada:**

- da se pristupi razvoju protokola *tape stripping* metode kao neinvazivne i ekonomične tehnike *in vivo* procene dermalne raspoloživosti lekova, uz variranje vrste primenjenih adhezivnih traka (vrsta adheziva, nosača adheziva i dimenzije traka) i procesa ekstrakcije lekovite supstance sa primenjenih traka (vreme sonifikacije i centrifugiranja traka u etanolu 70 % (V/V)) u cilju optimizacije protokola ispitivanja, sa krajnjim ciljem da se umanjí uticaj intra- i interindividualnih razlika unutar seta ispitanika;
- da se proceni potencijal primene razvijenog protokola TS metode za ispitivanje penetracionih profila model lekovitih supstanci iz uzoraka formulisanih i ispitanih u okviru prve faze eksperimentalnog rada, kao farmaceutskih oblika realne kompleksnosti. Od interesa je ispitati potencijal TS metode da ukaže na uticaj same mikrostrukture primenjenog emulzionog nosača i/ili dodatog ubrzivača penetracije, na stepen dermalne raspoloživosti leka u realnim uslovima primene;
- da se paralelno sa primenom TS metode, sprovedu biofarmaceutska ispitivanja kojima se uobičajeno vrši procena dermalne raspoloživosti lekova: ispitivanja

permeacije primenom Franz-ovih difuzionih ćelija (i) *in vitro* - kroz veštačke konstrukte kože, i (ii) tzv. *ex vivo* - kroz izolovani humani *stratum corneum*;

- da se dobijeni rezultati razmotre i proceni moguća korelacija sprovedenih *in vitro* testova sa *in vivo* podacima koje pruža TS metoda razvijenog protokola.

### **III faza eksperimentalnog rada**

- da se sa model i referentnim uzorcima sa hidrokortizonom kao model lekovitim supstancom sprovede vazokonstriktorni test kao, sa izuzetkom kliničkih studija, jedinim *in vivo* ispitivanjem dermalne raspoloživosti i ekvivalentnosti prihvaćenim od strane regulatornih tela;
- da se proceni mogućnost korelacije rezultata dobijenih vazokonstriktornim testom sa rezultatima TS metode, sa ciljem da simultana primena dve *in vivo* metode ukaže da li se TS metoda datog protokola može smatrati alternativnom ili komplementarnom metodom prihvaćenom vazokonstriktornom testu.

## **3 EKSPERIMENTALNI DEO**

### ***3.1 Materijali i metode***

#### **3.1.1 Materijali**

Za izradu model podloga stabilizovanih izabranim APG emulgatorom – cetearil glukozid i cetearil alkohol (Sepineo SE<sup>®</sup>68, Seppic, Francuska) korišćeni su sledeći ekscipijensi: cetostearil alkohol (Sigma-Aldrich, Nemačka), trigliceridi srednje dužine lanca (Saboderm TCC, Sabo S.R.L., Italija), izopropanol (Brenntag, Austrija), glicerol i propilenglikol (Sigma-Aldrich, Nemačka).

Za potrebe izrade referentnih podloga stabilizovanih tradicionalnim nejonskim emulgatorima, korišćeni su i Polisorbat 60 (Tween<sup>®</sup> 60, Sigma-Aldrich, Nemačka) i beli vazelin/beli meki parafin (Sigma-Aldrich, Nemačka).

Kao model lekovite supstance izabrani su ketoprofen (Merck KGaA, Nemačka), diklofenak dietilamin (Labochim, Italija) i hidrokortizon (Tianjin Tianyao Pharmaceuticals Co, Ltd., Kina). Svi uzorci konzervisani su rastvorom sledećih konzervanasa: fenoksietanol, metilparaben, etilparaben, propilparaben, butilparaben, izobutilparaben (Euxil<sup>®</sup> K300, Schülke & Mayr, Nemačka). Voda, prečišćena koja je ključala najmanje 5 minuta, a potom ohlađena na sobnu temperaturu, korišćena je prilikom izrade svih uzoraka (DAC/NRF, 2007). Kvalitet ispitivanog APG emulgatora odgovara specifikaciji proizvođača, dok je kvalitet ostalih ekscipijenasa u skladu sa zahtevima Ph. Eur.

#### **3.1.2 Metode i oprema**

##### ***I faza eksperimentalnog rada***

##### **3.1.2.1 Priprema uzoraka**

Uzorci stabilizovani cetearil glukozidom i cetearil alkoholom kao osnovnim emulgatorom pripremljeni su u skladu sa postupkom razvijenim od strane Savić i

saradnika (2005). Sastav model podloga stabilizovanih APG emulgatorom i referentnih podloga prikazan je u tabeli 3.1.

**Tabela 3.1.** Sastav ispitivanih (model) podloga stabilizovanih emulgatorom iz grupe APG (oznake S1-S4) i referentnih (R1 i R2), na bazi farmakopejske podloge poznatog kvaliteta.

Sastojak	S1	S2	S3	S4	R1	R2
	% (m/m)					
Cetearil glukozid i cetearil alkohol	8,0	8,0	8,0	8,0	-	-
Cetostearil alkohol	1,0	1,0	1,0	1,0	10,0	10,0
Trigliceridi srednje dužine lanca	10,0	10,0	10,0	10,0	-	-
Konzervans	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Izopropanol	-	10,0	-	-	-	10,0
Propilenglikol	-	-	20,0	-	-	-
Glicerol (85 % m/m)	-	-	-	20,0	10,0	10,0
Polisorbat 60	-	-	-	-	5,0	5,0
Parafin, beli meki	-	-	-	-	25,0	25,0
Voda, prečišćena	80,5	70,5	60,5	60,5	49,5	39,5

APG emulgator je zagrevan zajedno sa masnom fazom na 70°C. Kada je temperatura postignuta, masna faza dodaje se vodenoj fazi zagrejanom na 72-75°C, i započinje mešanje propelerskom laboratorijskom mešalicom (Heidolph RZR2020, Nemačka), precizno definisanom dinamikom. S obzirom na značaj postepenog hlađenja emulzionih sistema na bazi APG emulgatora, mešanje otpočinje na ugašenoj, ali još uvek zagrejanom ploči magnetne mešalice (IKA® RH basic2, Nemačka), 3 min pri brzini od 700 obrt/min, a zatim 3 min pri 500 obrt/min. Uz održavanje date brzine, stakleni sud u kome se uzorak izrađuje se sklanja sa zagrejane ploče (1 min), nakon čega se nastavlja mešanje brzinom od 300 obrt/min do hlađenja uzorka na sobnu temperaturu.

U slučaju uzoraka sa glicerolom i propilenglikolom, ovi korastvarači su odmeravani i zagrevani sa prečišćenom vodom, dok je dodatak izopropanola u podlogu sproveden pažljivo, u kapima, nakon hlađenja uzorka na 35°C, imajući u vidu isparljivost datog korastvarača. Referentna podloga, *Nejonski hidrofилni krem*, označena kao uzorak R1,

pripremljena je po propisu DAB 2006, a uzorak R2 sadrži i 10 % (m/m) izopropanola u vodenoj fazi Nejonskog hidrofilnog krema.

Model lekovite supstance su u pripremljene podloge inkorporirane suspendovanjem, kako bi se procenila pogodnost model podloga kao tzv. univerzalnih, *ready-to-use* podloga za inkorporiranje različitih lekovitih supstanci sa antiinflamatornim delovanjem u uslovima izrade magistralnih lekova. Takođe, s obzirom da su u eksperimentalnom radu korišćene tri model lekovite supstance različite rastvorljivosti u prečišćenoj vodi, na taj način procenjen je potencijal same podloge (koloidne strukture i/ili dodatka korastvarača) da rastvori suspendovani lek i utiče na termodinamičku aktivnost date lekovite supstance.

**Tabela 3.2.** Sastav aktivnih uzoraka K-, D- i H-serije.

Uzorci	K-serija	D-serije	H-serije
	% (m/m)		
Podloga	97,50	98,84	99,00
Ketoprofen	2,50	-	-
Diklofenak dietilamin	-	1,16	-
Hidrokortizon	-	-	1,00

**Tabela 3.3.** Pregled načina obeležavanja aktivnih uzoraka, u kojima je suspendovana jedna od model lekovitih supstanci.

LEKOVITA SUPSTANCA	PODLOGA					
	<i>S1</i>	<i>S2</i>	<i>S3</i>	<i>S4</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>
<i>Ketoprofen</i>	S1K	S2K	S3K	S4K	R1K	R2K
<i>Diklofenak dietilamin</i>	S1DDA	S2DDA	S3DDA	S4DDA	R1DDA	R2DDA
<i>Hidrokortizon</i>	S1HC	S2HC	S3HC	S4HC	R1HC	R2HC

S obzirom na poznatu karakteristiku emulzionih sistema stabilizovanih nejonskim emulgatorima da uslovljavaju odloženo strukturiranje sistema (Eccleston, 1997), karakterizacija svih pripremljenih uzoraka započeta je 7 dana nakon njihove izrade.

### **3.1.2.2 Polarizaciona mikroskopija**

Mikroskopska analiza uzoraka sprovedena je primenom Carl Zeiss ApoTome Imager Z1 mikroskopa (Zeiss, Nemačka), integrisanog sa digitalnom AxioCam ICc1 kamerom i AxioVision 4.6 softverskim paketom, i  $\lambda$ -pločicom. Uvid u mikrografije snimljene pri uveličanjima 200× i 400× pružaju uvid u specifičnu koloidnu strukturu podloga stabilizovanih APG emulgatorima, kod kojih se očekuje obrazovanje liotropnih lamelarnih tečnokristalnih struktura. Dodatno, procenjen je potencijal same mikrostrukture ovih nosača i/ili variranih korastvarača da rastvore suspendovanu model lekovitu supstancu i na taj način utiču na termodinamičku aktivnost leka.

### **3.1.2.3 Merenje pH i električne provodljivosti uzoraka**

Nezaobilazne tehnike karakterizacije emulzionih sistema svakako su i merenje pH, što je sprovedeno primenom pH-metra HI 9321 (Hanna instruments, SAD), i električne provodljivosti, konduktometrom CDM 230 (Radiometer, Danska). Iako naizgled jednostavne metode, prilikom ponovljenih merenja tokom dužeg vremenskog perioda, rezultati dobijeni ovim tehnikama predstavljaju pouzdanu indikaciju o fizičko-hemijskoj (ne)stabilnosti uzoraka. Takođe, izmerene pH vrednosti mogu pružiti informacije o pogodnosti primene datih uzoraka na koži, dok vrednosti električne provodljivosti mogu ukazati na tip emulzionog sistema (u/v, v/u ili mešoviti) kao i o načinu distribucije lekovitih supstanci koje su elektroliti.

Stoga, vrednosti pH i električne provodljivosti ispitivanih i referentnih uzoraka izmerene su inicijalno (7 dana nakon izrade), posle 1, 3 i 6 meseci čuvanja uzoraka na sobnoj temperaturi.

### **3.1.2.4 Određivanje koncentracije zasićenja/saturacione koncentracije leka u podlozi**

Saturaciona koncentracija,  $C_s$ , model lekovitih supstanci u ispitivanim podlogama određena je uz pomoć Carl Zeiss ApoTome Imager Z1 mikroskopa (Zeiss, Nemačka).

Pripremljene su serije uzoraka, tako što su u ispitivane podloge suspendovane različite (rastuće) koncentracije model lekovitih supstanci. Tri dana nakon pripreme (period ekvibracije), uzorci su pod mikroskopom ispitani na prisustvo kristala nerastvorenog leka. Najniža koncentracija lekovite supstance pri kojoj su kristali leka mogli biti uočeni, uzeta je kao vrednost  $C_s$  za datu podlogu (Savic i sar., 2007). Na taj način dobija se uvid u najvišu koncentraciju lekovite supstance koja može biti rastvorena/solubilizirana od strane specifične koloidne strukture ispitivane podloge.

Uparedno ispitivanje vrednosti  $C_s$  ispitivanih podloga sprovedeno je u cilju objektivnog sagledavanja potencijala variranih korastvarača i/ili same koloidne strukture podloga stabilizovanih APG emulgatorom, da rastvore inicijalno suspendovane lekovite supstance različitih fizičko-hemijskih karakteristika, i time utiču na termodinamičku aktivnost leka, a sledstveno i uticaj istih korastvarača na rezultate studija penetracije/permeacije.

### **3.1.2.5 Reološka merenja**

Reološka merenja sprovedena su u cilju ispitivanja preliminarne fizičke stabilnosti, kao i uvida u koloidnu strukturu uzoraka i promene koje mogu nastati nakon dodatka variranih korastvarača. Osim uvida u fizičku stabilnost, rezultati dobijeni kontinualnom reologijom mogu se povezati sa liberacijom lekovite supstance iz nosača, kao i estetskim/aplikativnim karakteristikama sistema, koje su od izuzetne važnosti za krajnjeg korisnika – pacijenta.

Ispitivanje reoloških parametara sprovedeno je primenom reometra Rheolab MC 120 (Paar Physica, Nemačka) inicijalno (7 dana nakon izrade), posle 1, 3 i 6 meseci čuvanja uzoraka na sobnoj temperaturi. Merenja su vršena uz primenu kupa/ploča sistema dijametara 50 mm, pod uglom od  $1^\circ$  i debljinom uzorka od 0,05 mm, na temperaturi od  $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Tokom kontinualnih merenja, primenjen je postupak sa kontrolisanom brzinom smicanja od 0 do  $200 \text{ s}^{-1}$  i obratno, pri čemu svaki stupanj traje po 120 s. Kao osnovni parametri od interesa, praćeni su profili proticanja/tečenja, minimalni i maksimalni prividni viskozitet i vrednost histereznih površina.



### **3.1.2.6 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)**

DSC merenja uključena su u prvu fazu eksperimentalnog rada kako bi se ispitala i poredile entalpije faznih prelaza model i referentnih uzoraka. Očekuje se da dobijeni DSC skenovi pruže dodatne informacije o koloidnoj strukturi ispitivanih emulzionih sistema, pre i posle dodatka model lekovitih supstanci.

Male količine uzoraka (između 10 i 12 mg) precizno su izmerene na analitičkoj vagi XP205 DeltaRange<sup>®</sup> (Mettler Toledo, Nemačka) u aluminijumskim posudicama, koje su zatim hermetički zatvorene. S obzirom na značajan udeo vode u ispitivanim sistemima, pre merenja izvršena je punktura poklopca posudice, kako bi se omogućilo pravovremeno registrovanje promena prilikom zagrevanja uzoraka. Analogno pripremljena prazna aluminijumska posudica poslužila je kao referentna. Primenom uređaja Mettler DSC 820 (Mettler Toledo, Nemačka) uzorci su zagrevani od sobne temperature (25°C) do 105°C, brzinom od 2 K/min. Ispitivanje je ponovljeno najmanje dva puta za svaki uzorak.

### **3.1.2.7 Termogravimetrijska analiza (TGA)**

Termogravimetrijska analiza farmaceutskih podloga sprovodi se u cilju procene načina inkorporiranja vode u emulzionom sistemu, što potencijalno može ukazati na složenost njihove koloidne strukture i sledstveno njen potencijal za povećanje vlažnosti kože.

Mala količina uzoraka precizno je izmerena u otvorenim aluminijumskim posudicama i analizirana primenom uređaja za simultanu termalnu analizu Netzsch STA 409PG (Netzsch, Nemačka). Uzorci su podvrgnuti zagrevanju od 30 do 110°C uz primenu izotermalnih segmenata na početku i kraju svakog merenja. Brzina zagrevanja podešana je na 5 K/min, a svaki uzorak je analiziran dva puta. Dobijeni rezultati obrađeni su primenom pratećeg Proteus<sup>®</sup> Thermal Analysis softvera.

### **3.1.2.8 *In vitro* ispitivanje liberacionih profila model lekovitih supstanci iz ispitivanih uzoraka (*dissolution test* uz primenu inhenser ćelija)**

Preliminarna analiza liberacionih profila model lekovitih supstanci iz uzoraka sproveden je u uređaju za *dissolution test* sa mini-lopaticama (Erweka DT 600, Nemačka), uz primenu VanKel Enhancer<sup>®</sup> ćelija (VanKel Industries Inc., SAD), kroz inertne, sintetske membrane od celulozaacetata. Iako ovo ispitivanje nije prvi izbor kada su u pitanju polučvrsti preparati koji se primenjuju na koži, prihvaćeno je da se može koristiti za poređenje formulacija u fazi razvoja ili kontrole kvaliteta (Özsoy i sar., 2004).

Oslobađanje model lekovitih supstanci je praćeno tokom 6 h, u 300 ml fosfatnog pufera pH 7,4 (propis USP30), kao akceptorskog medijuma, uz održavanje konstantne temperature medijuma od  $32,0 \pm 0,5$  °C, pri 50 obrt/min. Donorska faza je od akceptorske odvojena membranom od celulozaacetata (Cuprophan tip 80M, Centar za separacione tehnologije, Srbija). Pre svakog ispitivanja membrane su aktivirane potapanjem u fosfatni pufer pH 7,4 u trajanju od 12 h, kako bi se vazduh unutar pora zamenio akceptorskim medijumom. Svi uzorci su ispitani u triplikatu, 7 dana nakon izrade. Određivanje sadržaja model lekovitih supstanci u eluatima vršeno je UV spektrofotometrijski (Evolution 300, Thermo Fisher Scientific, Velika Britanija).

Analizom dobijenih rezultata može se dobiti uvid u liberacionu kinetiku aktivnih uzoraka primenom više matematičkih modela koji potencijalno mogu odgovarati polučvrstim emulzionim sistemima (kinetika nultog reda, prvog reda, Higuchi i Hixon-Crowell model) pomoću softverskog paketa OriginPro 8 (OriginLab Corporation, Northampton, UK).

### **3.1.2.9 *In vitro* ispitivanje iritacionog potencijala model podloga – studija citotoksičnosti na ćelijskim kulturama**

U studiji je korišćen modifikovani Mosmanov MTT metod (Faller i sar., 2002; Mosmann, 1983), koji je prihvaćen kao pouzdana *in vitro* metoda za procenu bezbednosti primene supstanci ili njihovih mešavina (preparata), na određenim

ćelijskim modelima humane kože. Zasniva se na izlaganju modela ispitivanom supstancom/preparatom kao potencijalnim iritansom, i sledstvenim praćenjem određenih biohemijskih parametara iritacije (Netzlaff i sar., 2005). Modeli veštačke kože (rekonstruisani humani epiderm) uronjeni su u disperzije ispitivanih podloga sledećih koncentracija: 0,25 %, 2,5 % i 25 % (m/m), s obzirom da je barijerna funkcija modela takva da će i niže koncentracije potencijalnog iritansa prouzrokovati odgovarajuću reakciju. Kao medijum za dispergovanje ispitivanih podloga korišćen je Krebs-Ringerov (KR) pufer. Modeli kože uronjeni u čist KR pufer (vijabilnost ćelija 100 %), odnosno KR pufer sa 1 % natrijum-laurilsulfata (NaLS) (vijabilnost ćelija 0 %), korišćene su kao kontrola. Nakon 2 h inkubacije pod navedenim uslovima, modeli veštačke kože su isprani KR puferom, a zatim im je dodato 900 µl minimalno suplementovanog bazalnog medijuma i 100 µl vodenog rastvora boje MTT (0,5 %), pa inkubirano pri 37°C i 5 % CO<sub>2</sub> još 2 h. Supernatant je zatim dekantovan, a obojeni modeli veštačke kože obezbojeni dodatkom 500 µl lizirajućeg rastvora koji sadrži NaLS, hlorovodoničnu kiselinu, vodu i izopropanol. Apsorbanca tako obojenog rastvora merena je na 570 nm. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri merenja.

### **3.1.2.10 Procena bezbednosnog profila model podloga primenom *in vivo* tehnika bioinženjeringa kože**

Aspekt bezbednosti ispitivanih podloga sa i bez dodatka izabranih korastvarača/potencijalnih ubrzivača penetracije dodatno je procenjen primenom objektivnih *in vivo* tehnika bioinženjeringa kože, kojima će se dobiti uvid u sledeće parametre: a) **stepen hidratisanosti (vlažnosti) SC** i b) **pH kože** primenom uređaja Cutometer<sup>®</sup> MPA 580, c) **transepidermalni gubitak vode (TEGV)** uređajem Tewameter<sup>®</sup> TM210 i d) **eritema indeks** primenom aparata Mexameter<sup>®</sup> MX18 (svi proizvođača Courage+Khazaka, Nemačka).

*In vivo* procena iritacionog potencijala uzoraka sprovedena je tokom 24-časovne studije pod okluzijom. U studiji je učestvovalo 10 zdravih dobrovoljaca (24,9 ± 1,8 godina) koji su pre početka detaljno informisani o mogućim efektima tretmana i pravilima ponašanja za vreme ispitivanja. Ispitanici su bili u obavezi da dva dana pre početka, kao i u toku ispitivanja na tretirana područja kože ne nanose druge lekove ili

kozmetičke proizvode za negu i čišćenje. Studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, uz strogo pridržavanje protokola odobrenog od strane Etičkog komiteta za klinička ispitivanja Farmaceutskog fakulteta u Beogradu (odluka br. 305/1 od 24.2.2012. godine). Svi ispitanici su potpisali odgovarajući informisani pristanak.

Ispitanici su, u skladu sa protokolom, pre početka merenja proveli najmanje 30 min u prostoriji u kojoj je ispitivanje vršeno kako bi se adaptirali na kontrolisane atmosferske uslove (temperatura  $23 \pm 1$  °C i relativna vlažnost vazduha  $50 \pm 5$  %), nakon čega su izvršena merenja bazalnih vrednosti. Prethodno opisani biofizički parametri mereni su na volarnim stranama podlaktica, na test-mestima površine  $16 \text{ cm}^2$ , definisanim pomoću kartonskih šablona. Nakon sprovedenih inicijalnih merenja, na označena mesta ravnomerno su naneti ispitivani uzorci podloga, preko kojih je postavljena okluzija u vidu Parafilm<sup>®</sup> M (Brand GmbH, Nemačka), fiksirana hipoalergijskim adhezivnim trakama (Sensifix<sup>®</sup>, Galenika, Srbija).

### **3.1.2.11 Statistička analiza**

Statistička procena izvedena je primenom testa jednofaktorska ANOVA uz *post hoc* Tukey test, kada je to bilo moguće, u statističkom programu SigmaStat 3.11 verzije za Windows (Systat, SAD). Statistička značajnost podešena je na  $p < 0,05$ .

S obzirom da podaci dobijeni *in vivo* ispitivanjem često nisu normalno distribuirani, vrednosti biofizičkih parametara praćenih tokom prethodno opisane studije, najpre su izraženi kao procentne promene vrednosti izmerenih nakon okluzije (1 h posle uklanjanja), u odnosu na bazalne vrednosti. Efekti ispitivanih uzoraka poređeni su na dva nivoa: poređenje rezultata dobijenih nakon uklanjanja okluzije u odnosu na bazalne vrednosti i poređenje rezultata ispitivanih uzoraka u odnosu na netretiranu kontrolu sa i bez okluzije (oznake NKO i NK).

## **II faza eksperimentalnog rada**

### **3.1.2.12 Razvoj i optimizacija protokola metode sa adhezivnim trakama**

Iako TS metoda može pružiti podatke o perkutanoj resorpciji i eliminaciji (klirensu) leka (Nicoli i sar., 2009), u ovom radu TS tehnika će biti razmatrana sa aspekta definisanja protokola koji bi bio dovoljno osetljiv da pruži podatke o stepenu penetracije lekovitih supstanci iz primenjenih nosača, prilikom njihovog poređenja. Shodno opštem principu metode opisanom u uvodnom delu (odjeljak 1.4.2.2.4.), TS metoda može se podeliti u tri ključne faze: faza primene leka, faza ekstrakcije lekovite supstance sa adhezivnih traka tj. slojeva kože, i faza određivanja leka iz dobijenih eluata. Pogodnost predloženog protokola *tape stripping* metode ispitan je variranjem nekoliko procesnih parametara, na dva nivoa:

**I** Variranjem vrste primenjenih adhezivnih traka:

- D-squame<sup>®</sup> (CuDerm, SAD) i
- 3M<sup>™</sup> Transpore<sup>™</sup> (3M HealthCare, Velika Britanija).

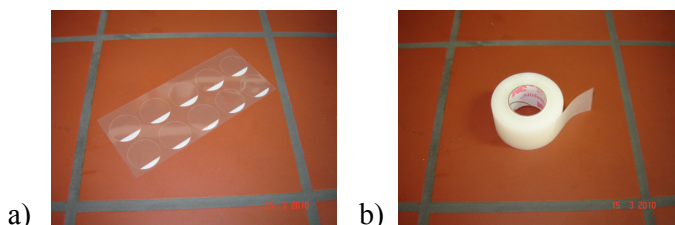
**II** U fazi ekstrakcije lekovite supstance sa traka varirani su sledeći procesni parametri:

- vreme izlaganja traka sa medijumom za ekstrakciju u ultrazvučnom kupatilu Sonorex RK102H (Bandelin, Nemačka) i
- vreme/brzina centrifugiranja eluata u centrifugi Tehnica (Zelezniki, Slovenija).

Nakon detaljnog pregleda literature posvećene ovoj tematici, izabrane su navedene adhezivne trake kao često korišćene za tu namenu, koje se između ostalih spominju i u originalnom nacrtu vodiča FDA (US FDA Draft Guidance for Industry, 1998). Ipak, varirane trake razlikuju se u mnogim karakteristikama (sastav adheziva, nosača adheziva, oblik i veličina adhezivne površine).

D-squame<sup>®</sup> trake (slika 3.1.a), dostupne su u vidu prethodno isečenih kružnih diskova, konstantne površine od 3,8 cm<sup>2</sup>, sa adhezivom od poliakrilatnog estera medicinskog kvaliteta. Potpuna transparentnost polimernog nosača (film PE debljine 100 μm) i sloja adheziva omogućava i vizuelnu kontrolu traka nakon primene. S druge strane, 3M<sup>™</sup> Transpore<sup>™</sup> trake (slika 3.1.b) dostupne su u vidu rolne dimenzija 2,5 cm

× 9,1 m što omogućava istraživaču da veličinu trake prilagodi potrebama istraživanja. Prema specifikaciji proizvođača, primenjeni adheziv je hipoalergijski, a po sastavu predstavlja kopolimer izooktilakrilata i metakrilne kiseline, dok je nosač adheziva izrađen od etilenvinilacetat-polietilen kopolimera.



**Slika 3.1.** Izgled variranih vrsta adhezivnih traka: a) D-squame® trake i b) Transpore™ trake.

S obzirom da je među postavljenim ciljevima istaknut razvoj i optimizacija jednostavne metode koja bi našla široku primenu u praksi, izabran je koncept metode koji se zasniva na generisanju profila koncentracije lekovite supstance duž *stratum corneum*-a. Ovakva postavka metode, uz korišćenje gravimetrijskog pristupa određivanja dostignute dubine SC, jedina omogućava sprovođenje metode uz primenu opreme dostupne u prosečnoj laboratoriji.

Imajući u vidu da se radi o *in vivo* ispitivanju na ljudima, pre započinjanja studije dobijena je saglasnost Etičkog komiteta Farmaceutskog fakulteta u Beogradu<sup>1</sup>.

- Faza primene leka

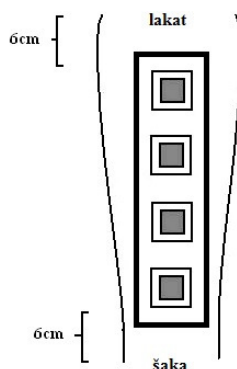
Svaki uzorak ispitan je na najmanje 6 zdravih dobrovoljaca ( $n \geq 6$ ) koji su, u skladu sa Helsinškom deklaracijom, detaljno upoznati sa protokolom ispitivanja i dali su pismenu saglasnost za učešće u studiji (potpisani informisani pristanak). Ispitanici ne smeju na volarnim stranama podlaktice koristiti kozmetičke proizvode ili druge preparate najmanje 24 h pre početka ispitivanja. Na dan ispitivanja, ispitanici su proveli 30-60 min u laboratoriji u kojoj je studija izvođena, u cilju aklimatizacije kože.

U ovoj fazi ispitivanja, korišćeni su uzorci stabilizovani APG emulgatorom sa DDA kao model lekovitom supstancom, razvijeni i ispitani tokom prve faze eksperimentalnog rada. Uz primenu kartonskog šablona (slika 3.2), na mestima gde će biti naneti

---

<sup>1</sup> Odluka broj 305/1, Etičkog komiteta za klinička ispitivanja Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

ispitivani uzorci, izmerene su bazalne (inicijalne) vrednosti transepidermalnog gubitka vode (TEGV) neinvazivnom sondom uređaja Tewameter<sup>®</sup> TM210 (Courage+Khazaka, Nemačka). TEGV je biofizički parametar koji meri gubitak vode kroz intaktni SC, na osnovu kog se može proceniti integritet kožne barijere.



**Slika 3.2.** Shematski prikaz nanošenja uzoraka na volarne strane podlaktica tokom TS metode: u ispitivanju je korišćena površina kože udaljena najmanje 6 cm od pregiba lakta i šake.

Nakon toga, uz primenu istih kartonskih šablona plastičnim špricem naneti su ispitivani uzorci u količini od  $5 \text{ mg/cm}^2$  i ravnomerno raspoređeni po definisanoj površini kože. S obzirom na delovanje model lekovitih supstanci, uzorci su ostavljeni u kontaktu sa kožom tokom 2 h. Po isteku predviđenog vremena, višak preparata pažljivo je uklonjen sa kože pamučnim tuferima (uvek na isti način), i započeto je sukcesivno nanošenje i uklanjanje po 12 adhezivnih traka sa svakog test-mesta.

Masa pojedinačnih traka je pre i posle primene izmerena na analitičkoj vagi Sartorius BP210D (Sartorius, Nemačka), kako bi se dobili podaci o masi uklonjenih korneocita (gravimetrijski pristup). Adhezivnim trakama se manipuliše pažljivo, pomoću pincete, kako se tokom odmeravanja i primene adheziv traka ne bi kontaminirao korneocitima istraživača. Svaka adhezivna traka pojedinačno je postavljena na tretirano mesto na koži, nakon čega je na nju izvršen konstantan pritisak od  $140 \text{ g/cm}^2$  uređajem na bazi opruge, u trajanju od 10 sekundi. Traka je zatim uklonjena pincetom i izmerena na analitičkoj vagi. Na prethodno opisan način uklonjeno je 12 slojeva SC-a sa svakog test-mesta. Merenje TEGV se ponavlja nakon uklanjanja 4., 8. i 12. trake.

- Faza ekstrakcije lekovite supstance

Svaka adhezivna traka posebno preneti je pincetom u kivete za centrifugiranje u koje je odmereno po 5 ml etanola, 70 % (V/V), kao rastvarača za ekstrakciju. Pripremljene kivete su najpre podvrgnute sonifikaciji na ultrazvučnom kupatilu Sonorex RK102H (Bandelin, Nemačka), pri čemu je varirano vreme izlaganja ultrazvuku od 5 do 15 min. Sledeći korak koji je variran jeste centrifugiranje dobijenih eluata 5 min pri 4000 obrt/min (MPW-56, MPW Instruments, Poljska), i njihovo filtriranje kroz membranske filtre promera 0,45 µm. Dobijeni eluati su preneti u staklene epruvete sa zatvaračem, zbog isparljivosti primenjenog rastvarača za ekstrakciju.

- Faza određivanja lekovite supstance

Sadržaj DDA kao model lekovite supstance u eluatima precizno je određen primenom ultra visokoeфикаsne tečne hromatografije sa masenom spektroskopijom (UHPLC-MS).

Oprema

- UHPLC sistem sa MS detektorom
- Accela sistem za automatsko uzorkovanje sa pratećom pumpom (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- TSQ Quantum Access MAX maseni detektor sa trostrukim kvadropolskim analizatorom sa izvorom elektrosprej jonizacije (ESI) (Thermo Fisher Scientific, SAD)

Reagensi

- metanol, LC-MS čistoće
- mravlja kiselina, LC-MS čistoće
- voda, HPLC čistoće
- azot visoke čistoće kao nebulizator u ESI izvoru
- argon kao fragmentacioni gas u Q2 ćeliji

Hromatografski uslovi

Kolona:	Hypersil Gold C <sub>18</sub> , 50 x 2,1 mm, 1,9 µm
Protok:	300 µl/min
Temperatura:	25°C
Mobilna faza:	metanol:0,1% mravlja kiselina (80:20 V/V)



Vreme analize: 1,5 min

Retenciono vreme DDA: 0,99 min

Za procenu specifičnosti metode pripremljeni su sledeći rastvori:

**Rastvor 1:** eluat nekorišćene adhezivne trake u 5 ml etanola;

**Rastvor 2:** eluat adhezivne trake sa slojem netretiranog SC u 5 ml etanola;

**Rastvor 3:** rastvor standarda DDA u etanolu koncentracije 42 µg/ml.

Poređenjem dobijenih hromatograma nisu uočene interferencije sa pikom DDA što potvrđuje specifičnost metode.

Parametri ESI izvora optimizovani su injektovanjem rastvora DDA sa mobilnom fazom pri 300 µl/min. Praćenje odabrane tranzicije (*selected-reaction monitoring (SRM) scan mode*) primenjeno je za prikupljanje podataka. Optimizovani parametri masenog spektrometra su: elektron sprej jonizacioni napon 5000 V; temperatura grejača jonske probe 350 °C, protok gasa kroz jonsku probu (direktan) 30 jedinica; pritisak gasa u jonskom izvoru 0 jedinica; protok gasa kroz jonsku probu (kružni) 5 jedinica; temperatura kapilare 275 °C; podešavanje jonske optike 113 jedinica; energija fragmentacije 32 V; širina pika 0,7 za Q1 i Q3; sken sa (m/z) 0,4; vreme skeniranja 100 ms. Xcalibur softver v 2.1.0.1139 (Thermo Fisher Scientific, SAD) korišćen je za prikupljanje i obradu podataka.

Masena spektrometrija je korišćena za detekciju specifičnih jona u cilju identifikacije analita. Specifičnost metode postignuta je odabirom SRM tranzicije jona od m/z 296 → 214, pri čemu je moguće određivanje diklofenaka bez interferencije sporednih supstanci iz uzorka.

Pripremljen je osnovni rastvor standarda rastvaranjem 2,1 mg DDA u 30 ml etanola u odmernom sudu od 50 ml i dopunjeno je do crte etanolom (rastvor a<sub>D</sub>). Pripremljeno je pet rastvora standarda pipetiranjem 0,1; 0,2; 0,4, 1 i 10 ml od osnovnog rastvora standarda a<sub>D</sub> u odmerne sudove od 10 ml. Odmerni sudovi dopunjeni su etanolom do oznake. Linearnost metode ispitana je snimanjem hromatograma za navedenih pet rastvora u koncentracionom opsegu od 0,42 do 42 µg/ml. Regresionom analizom određena je linearna zavisnost površina pikova od koncentracije DDA ( $Y = 2,76 \cdot 10^6 + 3,11 \cdot 10^6 \cdot X$ ) sa koeficijentom korelacije  $R = 0,9994$ , gde je: Y – površina pika DDA, a X – koncentracija DDA u µg/ml.

Faza razvoja TS metode sprovedena je uz primenu uzoraka sa DDA kao model lekovitom supstancom, koji su formulisani i ispitani u okviru I faze eksperimentalnog rada. Nakon definisanja protokola, TS metodom ispitana je i dermalna raspoloživost uzoraka sa ketoprofenom i hidrokortizonom.

**Određivanje HC** u svakom uklonjenom sloju SC takođe je sprovedeno primenom prethodno opisanog UHPLC-MS uređaja. Kao mobilna faza upotrebljena je mešavina acetonitrila i mravlje kiseline (0,1 %) u odnosu 50:50. Protok mobilne faze podešen je na 300 µl/min, što je omogućilo da analiza traje 1,7 min. Parametri ESI izvora optimizovani su injektovanjem rastvora HC 20 µl/min sa mobilnom fazom pri 300 µl/min. *Single ion monitoring (SIM) positive scan mode* primenjen je za prikupljanje podataka, uz sledeće parametre ESI izvora i masene spektrometrije: elektron sprej jonizacioni napon 5000V; temperatura grejača jonske probe 400 °C, protok gasa kroz jonsku probu (direktan) 50 jedinica; pritisak gasa u jonskom izvoru 0 jedinica; protok gasa kroz jonsku probu (kružni) 45 jedinica; temperatura kapilare 300 °C; podešavanje jonske optike 114 jedinica; širina pika 0,4 za Q1; sken sa (m/z) 0,1; vreme skeniranja 1000 ms. Masena spektrometrija je korišćena za detekciju specifičnih jona u cilju identifikacije analita. Skeniranjem kompletnog spektra identifikovan je [M+H]<sup>+</sup> kao dominantan jon za HC u ESI izvoru (m/z 363,1).

S obzirom da većina laboratorija poseduje konvencijalne HPLC uređaje, **određivanje ketoprofena** sprovedeno je primenom HPLC uređaja Agilent serije 1100, (sa DA detektorom i kvaternernom pumpom; Agilent, SAD), sa ciljem procene pogodnosti ove metode da odredi veoma male koncentracije lekovite supstance ekstrahovane sa adhezivnih traka. Primenjena je kolona Luna C<sub>18</sub> sledećih karakteristika: 100 Å, 250 mm × 4,6 mm, sa česticama veličine 5 µm. Uzorci su injektovani u zapremini od 20 µl, uz protok mobilne faze od 1,5 ml/min i temperaturu kolone od 25 °C. UV detekcija sprovedena je na 254 nm. Primenjena je mobilna faza sastava acetonitril/metanol/0,5 % m/V amonijum-acetat (pH = 5,9) (u odnosu 27:18:55). pH vrednost podešena je nitritnom kiselinom (10% V/V). Dobijene kalibracione krive bile su linearne u ispitivanom opsegu koncentracija (R = 0,9996), uz limite detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) od 3,18, odnosno 10,61 ng/ml.

### 3.1.2.13 *In vitro/ex vivo* ispitivanje permeacionih profila primenom Franz-ovih difuzionih ćelija

Uvid u permeacione profile lekovitih supstanci iz ispitivanih uzoraka izvršen je primenom modifikovanih Franz-ovih difuzionih ćelija u kojima je donorska (ispitivani uzorak) od akceptorske faze (fosfatni pufer pH 7,4 (USP)) odvojena:

- ❖ veštačkim konstruktima kože (*in vitro* pristup) i
- ❖ izolovanim humanim *stratum corneum*-om (tzv. *ex vivo* pristup).

Veštački konstrukti kože kultivisani su prema proceduri opisanoj od strane Winkler i Müller-Goymann (2002). Ekvivalent dermisa dobijen je primenom humanih dermalnih fibroblasta iz uzorka kože novorođenčeta, prema prethodno standardizovanim uslovima. Dermis je zatim pokriven ekvivalentom epidermisa, primenom keratinocita dobijenih iz stabilne HaCaT ćelijske linije (skraćeno od eng. *Human adult, low Calcium, elevated Temperature*) (Mitriakina i Müller-Goymann, 2009).

U *ex vivo* modelu, SC je izolovan iz kože abdomena 37-godišnjeg ženskog donora koji je bio podvrgnut plastičnoj hirurgiji. Izolacija je sprovedena primenom vodenog rastvora tripsina 0,5 mg/ml (Carl Roth, Nemačka). Nakon uklanjanja masnog tkiva, uzorci kože su preneti (dermalnom stranom nadole) u Petri šolju sa rastvorom tripsina. Posle 48 h inkubacije na 37 °C, SC je pažljivo uklonjen pincetom. Uzorci izolovanog SC su jednom isprani vodenim rastvorom inhibitora tripsina (0,4 mg/ml, tip II-O: *chicken egg white*, Sigma Aldrich, Nemačka), a zatim još tri puta prečišćenom vodom. SC je čuvan u eksikatoru, do upotrebe.

Nezavisno od primenjene membrane, permeacija model lekovitih supstanci iz ispitivanih uzoraka je praćena tokom 30 h. Ispitivanje je sprovedeno na modifikovanim Franz-ovim ćelijama. U donorski deo ćelije nanet je ispitivani uzorak (*infinite dose*; površina dostupna za permeaciju od 0,418–0,494 cm<sup>2</sup>), dok je u akceptorskom delu (zapremine 5,21–6,33 ml) fosfatni pufer konstantno mešan brzinom od 300 obrt/min. Akceptorski delovi ćelije uronjeni su u vodeno kupatilo termostirano na 37 °C, kako bi temperatura primenjenih membrana bila 32 °C. Eluati zapremine 250 µl uzorkovani su tokom 30 h, u prethodno definisanim vremenskim intervalima. Nakon svakog uzorkovanja, u sistem je dodata ista zapremina čistog fosfatnog pufera, kako bi se

održali *sink* uslovi. Koncentracija lekovitih supstanci u eluatima određena je primenom odgovarajuće HPLC metode (Waters, Nemačka). Kumulativna količina leka koji je permeirao po jedinici površine primenjene membrane ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), prikazana je u zavisnosti od vremena.

### **III faza eksperimentalnog rada**

#### **3.1.2.14 Vazokonstriktorni test (eng. *skin blanching assay*)**

U ispitivanju je primenjen modifikovan protokol važećeg FDA vodiča (US FDA Guidance, 1995). Osnovna odstupanja od zvaničnih smernica odnose se na broj ispitanika uključenih u studiju (regulatorna tela zahtevaju učešće 12 ispitanika u pilot studiji, a 40-60 ispitanika u konačnoj studiji bioekvivalentnosti), i primenu uređaja čiji se princip merenja razlikuje od preporučenog.

#### ***Izbor ispitanika***

S obzirom na specifičnost praćenog farmakodinamskog odgovora, pre pristupanja ispitivanju posebna pažnja posvećena je odabiru pogodnih ispitanika.

Kriterijumi za uključivanje ispitanika u studiju bili su sledeći:

- ✓ Zdrave osobe, bez istorije dermatoloških bolesti;
- ✓ Pokazuju merljiv farmakodinamski odgovor nakon jednokratne lokalne primene kortikosteroida (potvrđeno u toku pilot studije);
- ✓ Na volarnim stranama podlaktica nema vidljivih hipo- ili hiperpigmentacija.

Što se tiče kriterijuma za isključivanje ispitanika, u studiju nisu bili uključeni:

- ✗ Trudnice i dojilje;
- ✗ Osobe sa dijagnozom hipertenzije ili drugih bolesti kardiovaskularnog sistema;
- ✗ Osobe koje su imale neželjene reakcije na primenu lekova iz grupe kortikosteroida (dermatološka ili sistemska primena);
- ✗ Osobe koje primenjuju bilo koji vazoaktivni lek ili medicinsko sredstvo koji mogu uticati na protok krvi (vazokonstrikcija ili vazodilatacija);
- ✗ Osobe koje konzumiraju veće količine kafe (unos kofeina > 500 mg/dnevno).

Ispitanici su bili u obavezi da se 24 h pre početka studije, kao i tokom njenog trajanja:

- ne izlažu intenzivnoj fizičkoj aktivnosti (vežbanje);

- ispitivana test-mesta na koži ne kvase vodom (kupanje, tuširanje)
- na kožu podlaktica ne nanose kozmetičke proizvode ili druge lekove.

Na dan ispitivanja, ispitanici su najpre morali provesti 30-60 min u laboratoriji u kojoj je studija izvođena, u cilju aklimatizacije kože.

### ***Pilot studija vazokonstriktornog testa***

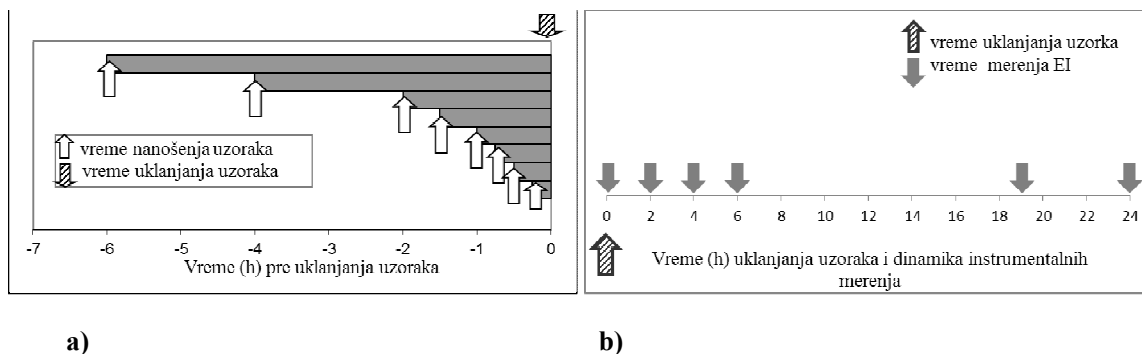
Cilj pilot studije je:

- potvrda pogodnosti ispitanika za učešće u studiji:
  - da li koža ispitanika pruža dobar farmakodinamski odgovor na lokalnu primenu kortikosteroida?
- dobijanje podataka neophodnih za ispitivanje permeacije leka iz datog nosača:
  - da li ispitivana formulacija dovodi do linearnog odgovora?
  - koje je minimalno vreme izloženosti kože ispitivanom uzorku koje dovodi do pouzdane i reproducibilne vazokonstrikcije?

U pilot studiji učestvovalo je 10 ispitanika ( $26 \pm 3,4$  godina starosti). Tretirana mesta definisana su primenom kartonskog šablona sa otvorima kvadratnog oblika, dužine stranice 1,5 cm, na međusobnoj udaljenosti od 2 cm. Jedan sat pre nanošenja uzorka koji će najduže ostati u kontaktu sa kožom izmerene su bazalne vrednosti eritema indeksa (EI) kao parametra datog farmakodinamskog odgovora primenom neinvazivne sonde uređaja Mexameter<sup>®</sup> MX18 (Courage+Khazaka, Nemačka). Uređaj emituje svetlost tri talasne dužine (zelena:  $\lambda = 568$  nm, crvena:  $\lambda = 660$  nm i infra-crvena:  $\lambda = 870$  nm), specifične za apsorpcioni spektar hemoglobina, i registruje svetlost reflektovanu sa kože.

Na označena mesta naneti su ispitivani uzorci sa hidrokortizonom u količini od 25 mg/cm<sup>2</sup> pomoću plastičnog šprica i ostavljeni u kontaktu sa kožom tokom osam definisanih vremenskih intervala: 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 4 h i 6 h (slika 3.3.a). Kako bi se potencirao vazokonstriktorni efekat hidrokortizona kao model kortikosteroida male jačine, odmah po nanošenju definisane količine uzorka svako test-mesto prekriveno je okluzivnom oblogom od Parafilm<sup>®</sup>-a (Brand GmbH, Nemačka) istih dimenzija, i fiksirano hipoalergijskim flasterom Sensifix<sup>®</sup> (Galenika, Srbija).

Po isteku predviđenog vremena izloženosti uzorku, sa kože je pažljivo uklonjen višak formulacija primenom pamučnih tufera i nastavljeno sa merenjem EI, i to odmah nakon uklanjanja uzorka (0 h), nakon 2, 4, 6, 19 i 24 h (slika 3.3.b).



**Slika 3.3.** Shematski prikaz: **a)** dinamike nanošenja i uklanjanja uzoraka sa test-mesta, i **b)** sprovođenja instrumentalnih merenja eritema indeksa. Primenjen je protokol sa simultanim uklanjanjem uzoraka (eng. *staggered application with synchronized removal*).

Kao što je prethodno navedeno, pilot studija ima za cilj da proceni stepen očekivanog farmakodinamskog odgovora izazvanog od strane lekovite supstance iz grupe kortikosteroida (hidrokortizon (HC) kao model lekovita supstanca), iz ispitivanog nosača/formulacije. Od izmerenih vrednosti EI najpre je potrebno oduzeti odgovarajuće bazalne vrednosti, nakon čega se od tako korigovanih vrednosti EI metodom trapezoida računaju odgovarajuće površine ispod krive (eng. *area under the curve*,  $AUC_{0-24h}$ ). Rezultati pilot studije grafički se prikazuju kao zavisnost  $AUC_{0-24h}$  od vremena izloženosti kože uzorcima (vreme ekspozicije). Iako je očekivano da stepen izbeljivanja kože varira od ispitanika do ispitanika, mora se uočiti progresivno smanjenje boje kože sa povećanjem dužine kontakta uzorka sa kožom. Zavisnost registrovanog farmakodinamskog odgovora od vremena procenjuje se statistički.

Iz dobijene zavisnosti doza-odgovor, maksimalne vrednosti  $AUC_{0-24h}$  i odgovarajućih vremena ekspozicije, primenom sledeće jednačine izračunavaju se podaci potrebni za ispitivanje permeacije:

$$E = (E_{max} \cdot D) / (ED_{50} + D) \quad (3)$$

pri čemu  $E$  predstavlja  $AUC_{0-24h}$ ,  $E_{max}$  je najveća izračunata vrednost AUC,  $D$  je odgovarajuće vreme izloženosti kože uzorku, a  $ED_{50}$  predstavlja vreme ekspozicije potrebno za postizanje farmakodinamskog odgovora koji je jednak polovini maksimalnog (Tsai i sar., 2004).

Na osnovu dobijene vrednosti  $ED_{50}$ , lako se izračunavaju sledeći parametri:

$$D_1 = 0,5 \cdot ED_{50} \quad (4)$$

$$D_2 = 2 \cdot ED_{50} \quad (5)$$

kao granične vrednosti osetljivog dela krive zavisnosti farmakodinamskog odgovora od vremena ekspozicije, tj. 33 % i 67 % od izračunate vrednosti  $ED_{50}$ . Prema tome, na osnovu rezultata pilot studije dobijaju se podaci neophodni za izvođenje same studije dermalne raspoloživosti, tokom koje treba ispitati sledeće tri vremenske tačke:  $D_1$ ,  $ED_{50}$  i  $D_2$ , kako se ne bi prevazišla sposobnost kože da pruži linearan farmakodinamski odgovor.

### ***Studija dermalne raspoloživosti primenom vazokonstriktornog testa***

Opšti princip izvođenja konačne studije permeacije sličan je prethodno opisanoj pilot studiji i zahteva primenu slične opreme. Na ovaj način, merenjem efekta izbeljivanja kože procenjuje se brzina i obim difuzije/permeacije leka u dermalnu vaskulaturu, što je u direktnoj korelaciji sa dermalnom raspoloživosti leka.

Na označenim mestima kože podlaktice 12 ispitanika ( $28 \pm 2,7$  godina starosti) najpre su izmerene bazalne vrednosti EI, 1 h pre nanošenja uzoraka. Shodno prethodno opisanom protokolu, definisane količine uzoraka nanete su na označena test-mesta, i postavljena je odgovarajuća okluzija koja je ostavljena u kontaktu sa kožom tokom vremena  $D_1$ ,  $ED_{50}$  i  $D_2$ . Nakon isteka predviđenog vremena ponovo su izmerene vrednosti EI (0 h), kao i nakon 2, 4, 6, 19 i 24 h od uklanjanja okluzije. Dodatno, u cilju eliminisanja potencijalnog uticaja okluzije na dobijene rezultate, na podlaktici svakog ispitanika definisana su dva test-mesta koja su poslužila kao kontrole: netretirana kontrola (NK) i netretirana kontrola pod okluzijom (NKO).





**Slika 3.4.** Prikaz nanošenja uzoraka prilikom procene dermalne raspoloživosti vazokonstriktornim testom.

Praćenje vrednosti EI u prethodno definisanim vremenskim tačkama tokom 24 h omogućava uvid u stepen izbeljenja kože nezavisno od cirkadijalnog ritma (uticaj lučenja kortizola). Iz istog razloga, eksperimentalni rad je organizovan tako da i pilot studija i studija dermalne raspoloživosti otpočnu u isto vreme (8 h ujutru).

### 3.1.2.15 Uporedna analiza primenjenih *in vivo* metoda za procenu dermalne raspoloživosti lekova

Konačno, procenjena je mogućnost uspostavljanja korelacije između rezultata dobijenih ispitivanjem permeacije preko farmakodinamskog odgovora (vazokonstriktorni test) i ispitivanjem penetracije primenom razvijene metode sa trakama. Iako se pitanje korelacije dve metode prevashodno povezuje sa mogućnošću da određena *in vitro* metoda (Lehman i sar., 2011; Shah, 2005) ili matematički model (tzv. *in silico*; Brown i sar., 2012) pruži podatke o očekivanoj *in vivo* situaciji, u ovom slučaju ideja je bila da se dodatno uporede regulatorno prihvaćena *in vivo* metoda sa potencijalno alternativnom/komplementarnom tehnikom. Korelacija dve *in vivo* metode procenjena je primenom proste i multiple linearne regresije, uz populacije podataka koje su netransformisane i logaritamski transformisane (SigmaStat 3.11, Systat, SAD). U nedostatku zvaničnih smernica za lekove koji se primenjuju na koži, dobijena korelacija je ocenjena kao 'dobra' ukoliko je dobijen koeficijent determinacije  $R^2 > 0,90$ , odnosno 'umerena' u slučaju  $R^2 < 0,90$  (Petro i sar., 2011).

Prema našim saznanjima, uporedna analiza TS metode i vazokonstriktornog testa do danas je pokušana samo na primeru kortikosteroida veoma velike (klobetazolpropionat) (Au i sar., 2010; Tsai i sar., 2004) i velike potentnosti (triamcinolonacetamid) (EMA Guideline, 1987; Pershing i sar., 2002).

## 4 REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1 Rezultati i diskusija I faze eksperimentalnog rada

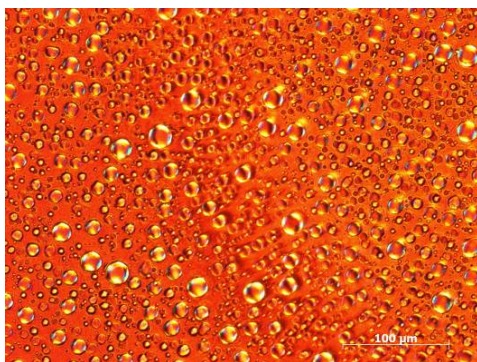
Nakon formulacionih ispitivanja koja su obuhvatala variranje vrste i količine sastojaka, definisan je konačan sastav formulacija (tabela 3.1). Koncentracija APG emulgatora izabrana je na osnovu rezultata ispitivanja sprovedenih od strane Savić (2004), koja su ukazala da je u slučaju mešanog emulgatora sastava cetearil glukozid i cetearil alkohol reprezentativan odnos emulgator/voda 1:10,43, tj. oko 7 % (m/m), uz preporučen dodatak određenih lipofilnih koemulgatora kao kostabilizatora u koncentraciji 0,5 - 1,5 % (m/m). S obzirom da je jedan od osnovnih ciljeva ovog rada bila formulacija podloge jednostavnog sastava koji bi se mogao brzo, *ex tempore* menjati dodatkom korastvarača različitih karakteristika, za stabilizaciju osnovne podloge primenjeno je 8 % (m/m) mešanog APG emulgatora. Kostabilizacija podloge izvršena je dodatkom cetostearil alkohola u koncentraciji od 1 % (m/m). Na ovaj način, dobijene su podloge jednostavnog sastava koje su uspešno podnosile dodatak 10 % (m/m) izopropanola (IPA), 20 % (m/m) glicerola, odnosno 20 % (m/m) propilenglikola. Iako je osnovna APG podloga zadržala zadovoljavajuću fizičku stabilnost i nakon dodatka 20 % (m/m) IPA, prisustvo ovog alkohola u navedenoj koncentraciji uslovalo je pojavu znakova nestabilnosti prilikom inkorporiranja lekovitih supstanci iz grupe elektrolita, poput diklofenak-natrijuma (podaci nisu prikazani). Nasuprot glicerolu i propilenglikolu, kao poliolima koji su čest sastojak lekova koji se primenjuju na koži, od značaja je istaći da u literaturi nije bilo dostupnih podataka o mogućnostima inkorporiranja IPA u podloge sa APG emulgatorima, i potencijalnim interakcijama koje bi se odrazile na kvalitet, efikasnost i bezbednost takvih nosača.

#### 4.1.1 Mikroskopska analiza

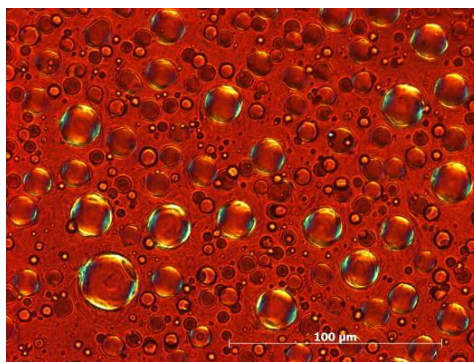
Uvidom u snimljene mikrografije prikazane na slici 4.1.1, može se zapaziti karakteristična anizotropna tekstura pod polarizovanom svetlosti, čime je potvrđena početna hipoteza da su podloge sa šećernim emulgatorom sastava cetearil glukozid i

cetearil alkohol, stabilizovane obrazovanjem liotropnih tečnih kristala. Na snimljenim mikrografijama uočene su:

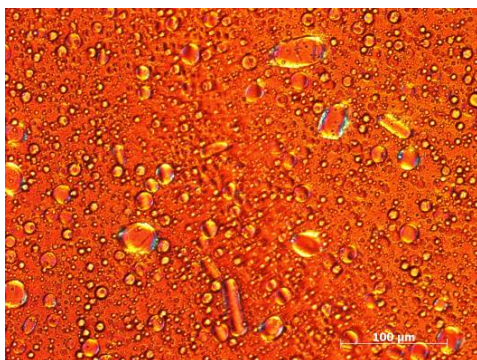
- a) *lamelarna tečnokristalna faza* koja se manifestuje brojnim deformisanim Malteškim krstovima i
- b) *lamelarna gel faza* u vidu regiona velikog viskoziteta koji poput koncentričnih krugova okružuju kapi unutrašnje faze (Lashmar i sar., 1995; Nesseem, 2001).



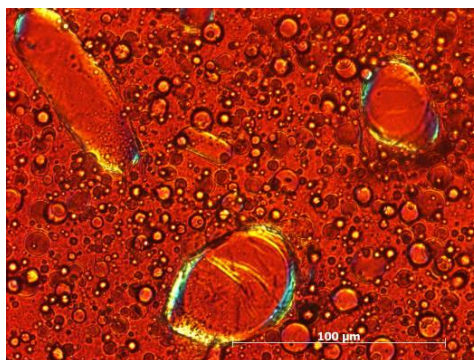
a)



b)

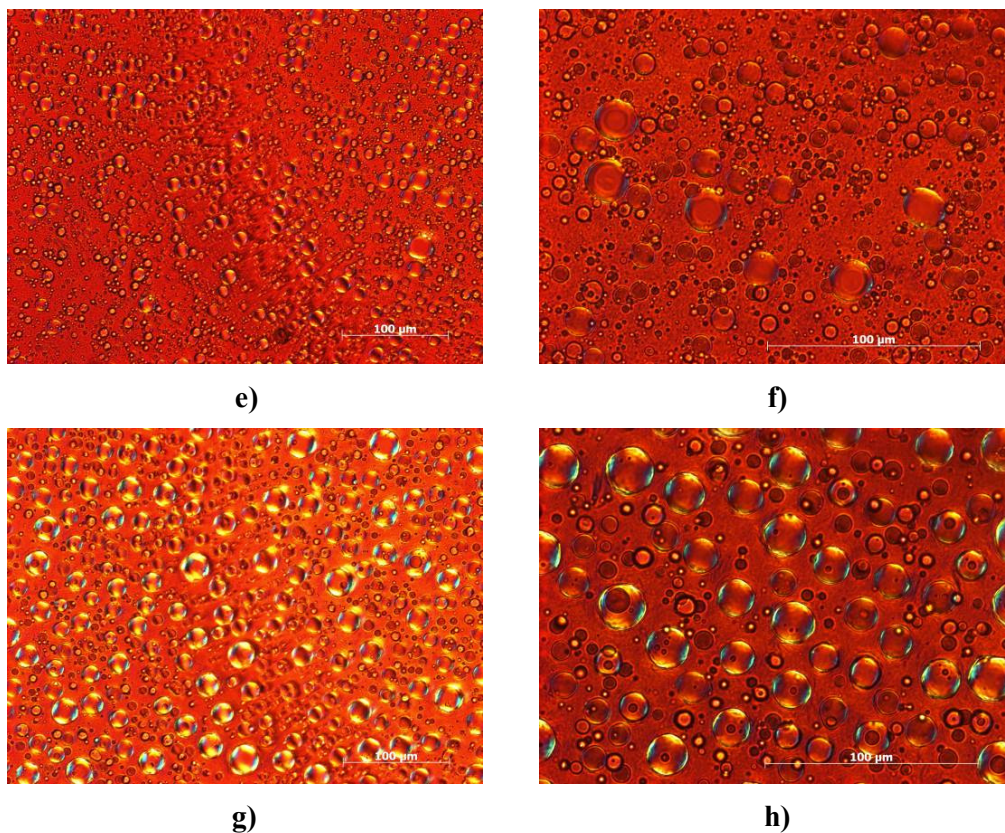


c)



d)

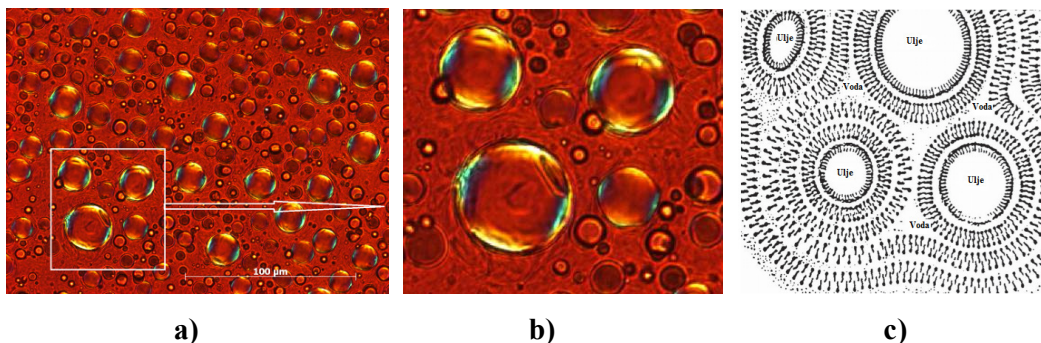
*Slika 4.1.1.* (legenda na sledećoj strani)



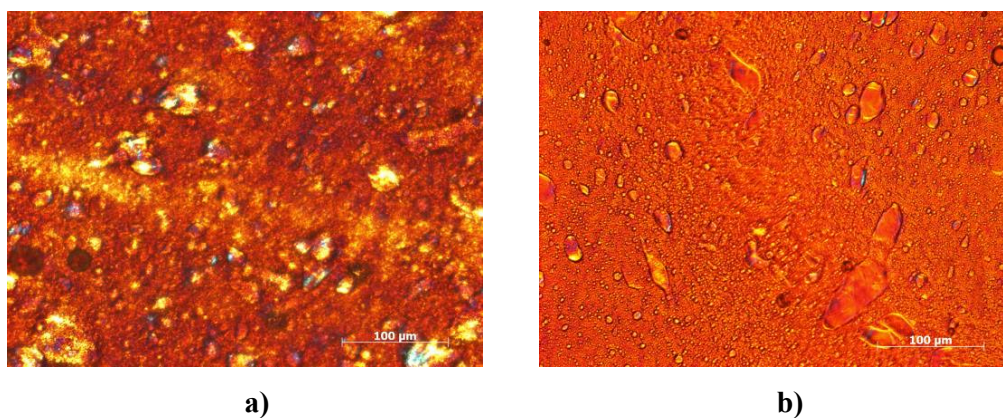
**Slika 4.1.1.** Polarizacione mikrografije model podloga stabilizovanih APG emulgatorom snimljene 7 dana nakon izrade pod uveličanjem 200× i 400×, bar 100 µm: **a)** S1, 200×; **b)** S1, 400×; **c)** S2, 200×; **d)** S2, 400×; **e)** S3, 200×; **f)** S3, 400×; **g)** S4, 200×; **h)** S4, 400×.

Komparativnom analizom snimljenih mikrografija osnovne APG podloge (uzorak S1; slika 4.1.1 a i b), sa uzorcima u kojima je variran dodatak korastvarača, najmanje promene se mogu uočiti u slučaju uzorka sa glicerolom (S4) kod koga je očuvan intenzitet anizotropne teksture, uz relativno male promene veličine kapi dispergovane faze. S druge strane, iako se na prvi pogled može reći da je dodatak propilenglikola uzrokovao značajno redukovanje anizotropije uzorka S3, umereni intenzitet prelamanja polarizovane svetlosti može se pripisati manjem dijametru kapi unutrašnje faze datog uzorka, s obzirom da je pokazano da je anizotropija koja se može uočiti pod polarizacionim mikroskopom obično izraženija oko kapi unutrašnje faze većeg dijametra (Liu i Friberg, 2009). Kao što je bilo i očekivano, model podloga pretrpela je najveće promene po dodatku 10 % (m/m) izopropanola. Velike kapi, nepravilnog oblika, koje dominiraju mikrografijama uzorka S2, očigledno su posledica inkorporiranja alkohola u međusloju, što je rezultovalo tranzicijom malih sferičnih kapi

u kratke cilindrične, i konačno, velike cilindrične strukture (Stubenrauch, 2001). Ipak, anizotropija koja se u određenoj meri može uočiti po obodu i površini ovih struktura, navodi na zaključak da takva morfologija uzorka ne mora obavezno biti i odraz fizičke nestabilnosti sistema.



**Slika 4.1.2.** Lamelarna gel faza: **a)** osnovna APG podloga (uzorak S1), uvećanje 400×; **b)** uvećan prikaz strukture uzorka S1; **c)** uobičajeni shematski prikaz lamelarne gel mreže oko kapi dispergovane faze (preuzeto iz Klein, 2008).



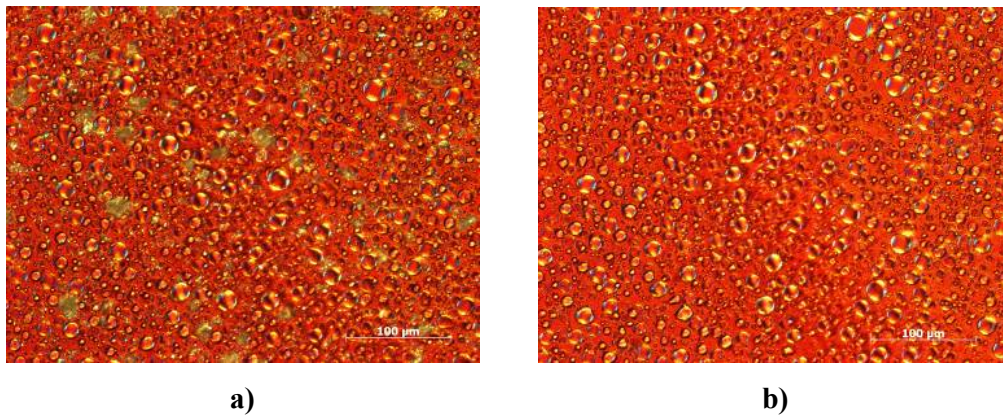
**Slika 4.1.3.** Polarizacione mikrografije: **a)** referentne podloge R1 (DAB 2006) i **b)** istog krema sa 10 % m/m IPA (R2), pri uvećanju 200×, bar 100 µm.

Nasuprot podlogama stabilizovanim šećernim emulgatorom, struktura podloga R1 i R2 podseća na relativno gust matriks. Uz činjenicu da je udeo vode u ovim emulzionim sistemima značajno niži (oko 50 % u uzorku R1, odnosno 40 % u R2), u poređenju sa APG uzorcima (oko 80 % u osnovnoj APG podlozi – S1), za uočenu matriks strukturu svakako je odgovoran i sastav masne faze. Naime, u literaturi postoje podaci da prisustvo cetostearil alkohola u većim količinama (10 % m/m u referentnim

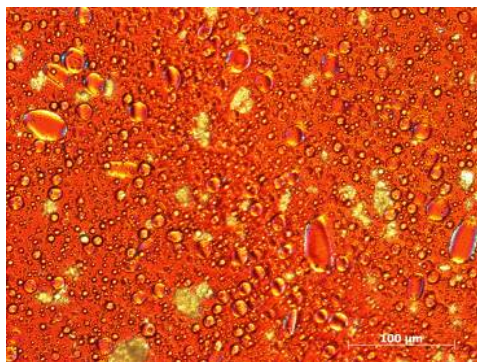
podlogama) može dovesti do obrazovanja lipofilne gel faze koja snažno imobilizuje dispergovanu fazu (Junginger, 1992), u ovom slučaju sastavljenu dominantno od belog vazelina. S obzirom da izabrana referentna podloga u svom sastavu već sadrži glicerol, u cilju objektivnog sagledavanja uticaja dodatka IPA, analogno uzorku S2, izvršena je ista varijacija sastava referentne podloge. Uočene longitudinalne kapi u mikrostrukturi uzorka R2, navode na zaključak da dolazi do sličnog mehanizma inkorporiranja IPA u emulzioni sistem stabilizovan konvencionalnim emulgatorom (Polisorbat 60).

Mikroskopska analiza ponovljena je nakon 30 dana čuvanja uzoraka na sobnoj temperaturi, kao i nakon 10 ciklusa čuvanja na povišenoj (40°C) i sniženoj (4°C) temperaturi. Uporednom analizom snimljenih mikrografija nisu uočene značajne promene u veličini i distribuciji veličine kapi unutrašnje faze, u poređenju sa mikrografijama uslikanim 7 dana nakon izrade.

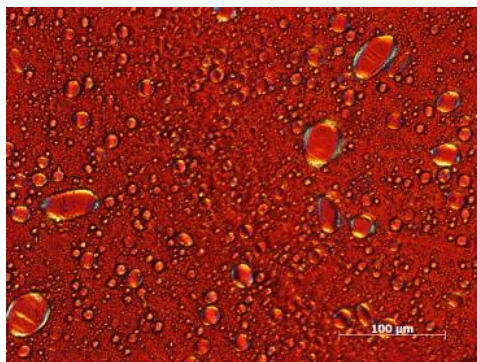
Rezultati dobijeni posredstvom polarizacione mikroskopije navode na zaključak da model APG podloge odlikuje zadovoljavajući solubilizacioni kapacitet za varirane korastvarače, za šta su verovatno odgovorne uočene strukture lamelarne tečnokristalne i gel faze.



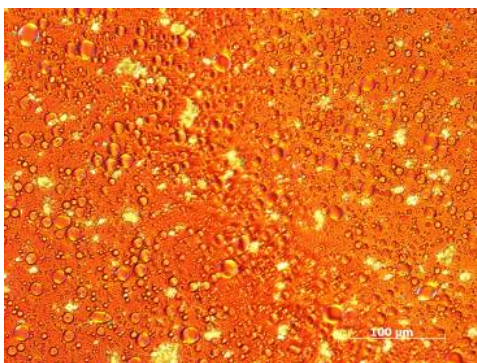
*Slika 4.1.4.* (legenda na strani 66)



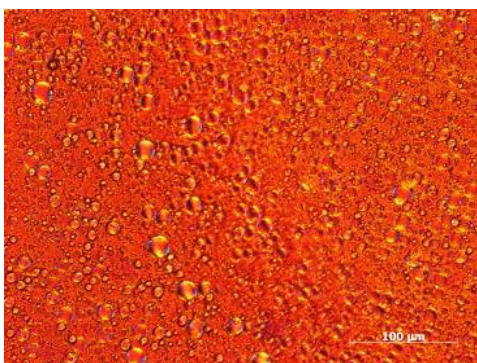
**c)**



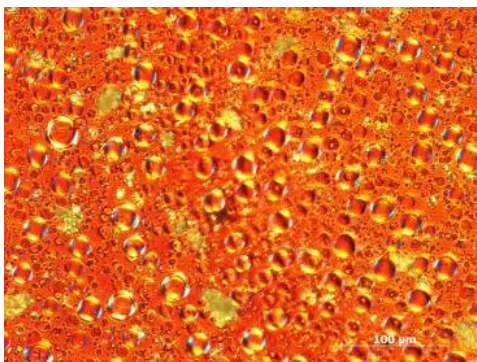
**d)**



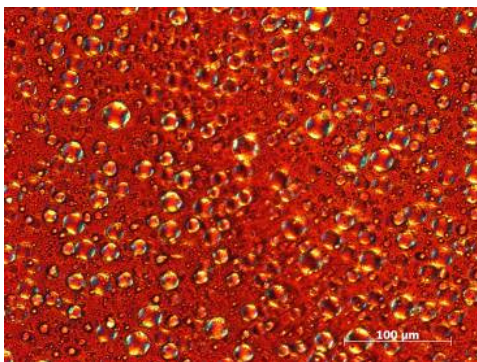
**e)**



**f)**

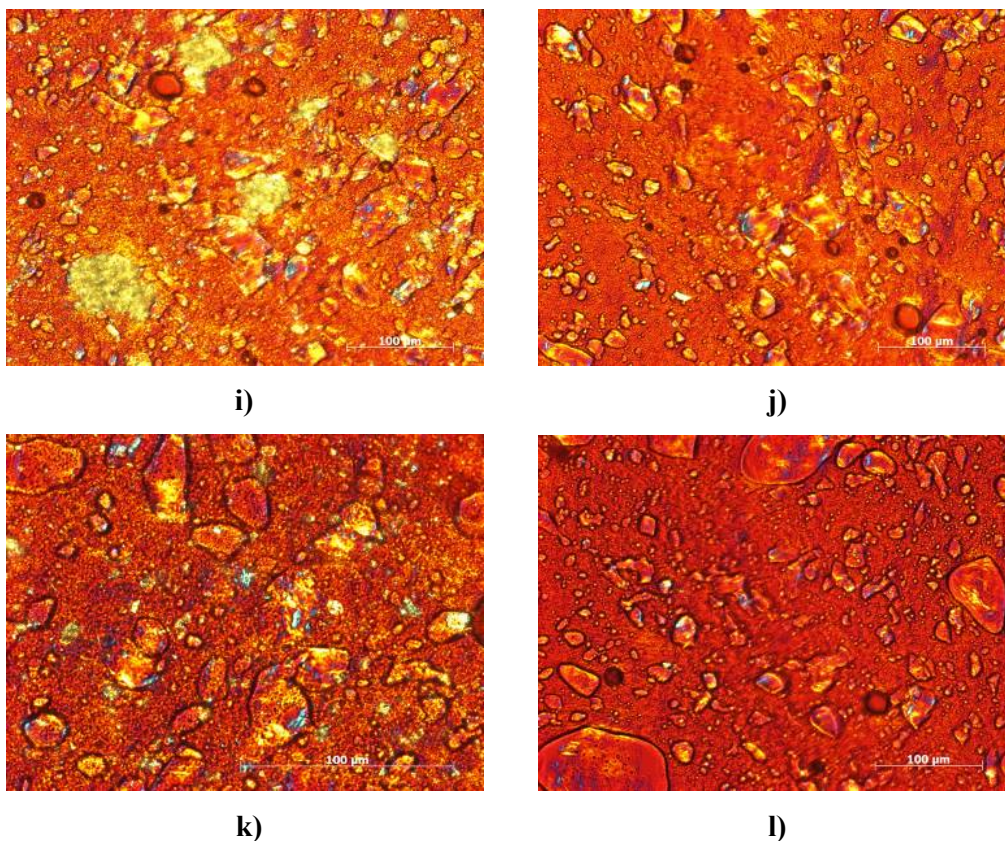


**g)**



**h)**

*Slika 4.1.4.* (legenda na sledećoj strani)



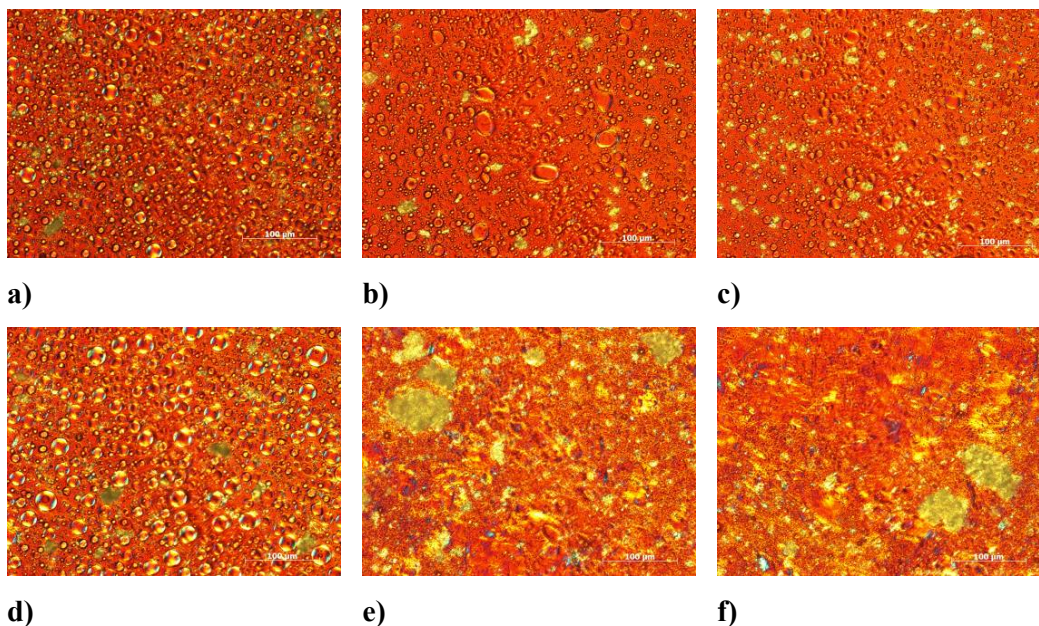
**Slika 4.1.4.** Polarizacione mikrografije aktivnih uzoraka snimljene 7 dana nakon izrade: **a)** S1K, 200×; **b)** S1DDA, 200×; **c)** S2K, 200×; **d)** S2DDA, 200×; **e)** S3K, 200×; **f)** S3DDA, 200×; **g)** S4K, 200×; **h)** S4DDA, 200×; **i)** R1K, 200×; **j)** R1DDA, 200×; **k)** R2K, 200×; **l)** R2DDA, 200×.

Pažljivom analizom mikrografija uzoraka K-serije snimljenih 7 dana nakon izrade, mogu se primetiti kristali nerastvorenog ketoprofena u svim uzorcima, nezavisno od koloidne strukture primenjene podloge i/ili variranog korastvarača. Ipak, kao model lekovita supstanca najslabije rastvorljivosti u vodi (51 mg/l na 22 °C), inkorporiranje ketoprofena u APG podloge dovelo je do homogenijeg dispergovanja leka u poređenju sa referentnom podlogom (uzorak R1K), kod koje su jasno vidljive grupisane čestice nerastvorenog leka. To navodi na zaključak da se, kao jedna od prednosti navedenih APG podloga može istaći jednostavnost manipulacije prilikom različitih farmaceutsko-tehnoloških operacija u postupku izrade magistralnih lekova.

S obzirom da se emulzioni sistemi stabilizovani nejonskim emulgatorima u potpunosti strukturiraju tek nakon nekoliko nedelja (Eccleston, 1997), ponašanje sistema ispitano je primenom polarizacione mikroskopije i nakon 30 dana stajanja na sobnoj temperaturi. Dodatno, ukoliko je lekovita supstanca amfifilne ili mezogene



prirode, kao što je slučaj sa diklofenak dietilaminom, a donekle i ketoprofenom, za koje postoje podaci da pokazuju tzv. liotropni mezomorfizam (Müller-Goymann, 2004), inkorporiranje takvih supstanci može uticati na koloidnu strukturu sistema posredstvom različitih molekulskih interakcija. Osim potencijalnog uticaja na fizičko-hemijsku stabilnost sistema, u farmaceutskim oblicima od velikog značaja je i eventualna promena termodinamičke aktivnosti leka.



**Slika 4.1.5.** Polarizacione mikrografije aktivnih uzoraka K-serije snimljene 30 dana nakon izrade (uveličanje 200×, bar 100 µm): **a)** S1K; **b)** S2K; **c)** S3K; **d)** S4K; **e)** R1K i **f)** R2K.

Uporednom analizom mikrografija aktivnih uzoraka 7 i 30 dana nakon izrade, uočeno je da je osnovna APG podloga (S1) dovela do primetnog rastvaranja ketoprofena, što ukazuje na značajan potencijal same koloidne strukture da rastvori inicijalno suspendovan lek, i bez dodatka korastvarača. Što se tiče model podloge sa dodatkom IPA, uticaj podloge na rastvaranje leka bio je još očigledniji. Isti zaključak se ne može primeniti i na referentne podloge, bez i sa dodatkom IPA, s obzirom da su klasteri suspendovanog leka još uvek bili vidljivi i nakon 30 dana čuvanja (slika 4.1.5. e i f).

Nasuprot tome, mikrografije uzoraka D-serije ukazuju da je došlo do potpunog rastvaranja diklofenak dietilamina u svim podlogama osim farmakopejske (uzorak R1DDA), gde su se mogli uočiti kristali nerastvorene lekovite supstance (slika 4.1.4.j).

U nedostatku literaturnih podataka o rastvorljivosti DDA u IPA, kao supstanca umereno rastvorna u vodi, a lako rastvorna u etanolu (96% V/V) i metanolu (BP 2009), bilo je očekivano da će dodatak IPA u referentnu podlogu uspešno rastvoriti suspendovani DDA (slika 4.1.4.I).

Prikazani rezultati polarizacione mikroskopije ukazuju na značajan potencijal same APG koloidne strukture da rastvori inicijalno suspendovani lek, i bez dodatka variranih korastvarača. Iako se rastvaranje lekovitih supstanci donekle može pripisati većem udelu vodene faze model APG podloga (tabela 3.1), određeni doprinos rastvaranju suspendovanih model lekovitih supstanci, ali i inkorporiranju izabranih korastvarača, svakako treba pripisati zadovoljavajućem solubilizacionom kapacitetu obrazovanih lamelarnih struktura.

Nedostatak polarizacione mikroskopije svakako leži u činjenici da, zavisno od izabranog objektiva, metoda pruža podatke o strukturi sistema rezolucije do 500 nm (Klang i sar., 2013), zbog čega se koloidni sistemi (oblast 10 - 400 nm ili 1 nm – 1  $\mu$ m), kojima pripadaju i emulzioni sistemi stabilizovani fazom tečnih kristala, moraju detaljnije ispitati i drugim tehnikama fizičko-hemijske karakterizacije (Müller-Goymann, 2004). Detaljan uvid u stepen rastvaranja model lekovitih supstanci u ispitivanim podlogama, koji se direktno odražava na njihovu termodinamičku aktivnost, pružilo je ispitivanje saturacionih koncentracija model lekovitih supstanci u svakoj podlozi.

#### **4.1.2 Ispitivanje pH vrednosti i električne provodljivost uzoraka**

U slučaju emulzionih sistema polučvrste konzistencije čak i jednostavne metode karakterizacije poput ispitivanja pH vrednosti i električne provodljivosti mogu pružiti važne informacije. S obzirom na to da emulzioni sistemi stabilizovani nejonskim emulgatorima obično dostižu svojevrsan ekvilibrijum nakon nekoliko dana, inicijalne vrednosti pH i električne provodljivosti izmerene su 7 dana nakon izrade uzoraka. U cilju procene stabilnosti uzoraka, merenja su ponovljena nakon 30, 90 i 180 dana, a rezultati prikazani u tabeli 4.1.1.

**Tabela 4.1.1.** Vrednosti pH i električne provodljivosti uzoraka, izmerenih 7, 30, 90 i 180 dana nakon izrade.

Uzorak	pH				Električna provodljivost ( $\mu\text{S/cm}$ )			
	7 d.	30 d.	90 d.	180 d.	7 d.	30 d.	90 d.	180 d.
S1	4,71	4,33	4,25	4,23	13,86	8,44	5,32	5,50
S2	4,79	4,47	4,54	4,51	7,53	4,35	3,46	3,56
S3	4,56	4,21	4,23	4,21	7,20	7,08	7,11	7,13
S4	4,61	4,29	4,25	4,24	7,09	6,98	7,21	7,27
R1	4,30	3,82	3,68	3,70	5,19	4,98	3,20	3,24
R2	4,50	4,08	3,95	4,00	5,40	5,85	2,66	2,71
S1K	4,40	4,19	4,15	4,17	20,43	13,08	15,64	15,51
S2K	4,30	4,25	4,36	4,35	17,92	10,16	14,47	14,43
S3K	4,02	3,93	4,04	4,01	4,72	3,85	4,31	4,28
S4K	4,06	4,05	4,05	4,06	9,09	7,12	7,94	7,70
R1K	4,13	3,95	3,85	3,90	3,64	3,13	3,60	3,54
R2K	3,84	3,77	3,68	3,71	2,94	2,57	3,28	3,32
S1DDA	8,3	8,18	8,06	8,09	204,4	128,8	137,9	138,0
S2DDA	8,35	8,26	8,14	8,20	207,3	146,1	154,6	155,1
S3DDA	7,76	7,71	7,71	7,70	100,4	54,3	53,4	54,0
S4DDA	8,05	7,97	7,88	7,87	76,0	61,7	65,9	65,4
R1DDA	7,88	7,85	7,65	7,63	68,2	55,0	57,1	56,9
R2DDA	7,43	7,29	7,22	7,23	55,4	42,1	45,2	44,8

Što se pH vrednosti samih podloga tiče, može se reći da su dobijene vrednosti u granicama prihvatljivih za lekove koji se primenjuju na koži (Vuleta i sar., 2012). Kontrolno merenje nakon 30 dana od izrade ukazalo je na blago smanjenje pH vrednosti ispitivanih podloga, koje se nisu značajno menjale prilikom narednih kontrola (90 i 180 dana čuvanja na sobnoj temperaturi). Kao što je i očekivano, električna provodljivost se smanjivala s vremenom, što je generalno prihvaćeno kao pokazatelj strukturiranja emulzionih sistema mešovito tipa (Tamburić i sar., 1996). Ovo smanjenje posebno je izraženo u slučaju podloga stabilizovanih APG emulgatorom, i može se uzeti kao potvrda uočene kompleksnosti njihove koloidne strukture.

Dodatak ketoprofena uslovio je povećanje vrednosti električne provodljivosti u APG uzorcima, što je očigledan uticaj rastvorene frakcije ove slabe kiseline na ukupnu

provodljivost sistema. Isto se ne može reći i za referentne uzorke sa ketoprofenom, čije su inicijalne vrednosti električne provodljivosti bile niže u poređenju sa korespondentnim podlogama. Ovo je u saglasnosti sa prethodnim zapažanjima o potencijalu ispitivanih podloga da rastvore inicijalno suspendovani lek.

Dodatak DDA kao amfifila i elektrolita, uslovio je značajno povećanje kako pH vrednosti uzoraka (pH od 7,43 do 8,35 kod uzoraka starih 7 dana), tako i električne provodljivosti. S obzirom da postoje literaturni podaci da je pH vrednosti 1 % (m/V) rastvora DDA u etanolu između 6,4 i 8,4 (BP 2009), veće pH vrednosti uzoraka D-serije očigledno su posledica inkorporiranja ove model lekovite supstance. S druge strane, višestruko povećanje vrednosti električne provodljivosti može se objasniti višim nivoima slobodnih jona u sistemu, odnosno potencijalom samog nosača da rastvori inicijalno suspendovani lek.

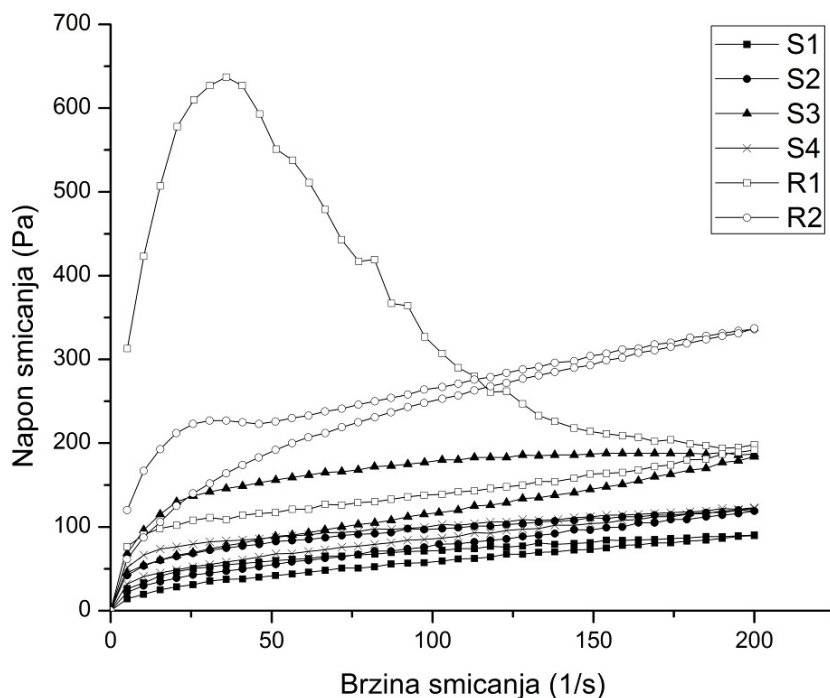
Iako rezultati ukazuju na zadovoljavajuću stabilnost aktivnih i placebo uzoraka, vrednosti oba praćena parametra postepeno su se smanjivala tokom kontrolnih merenja, što je naročito izraženo u slučaju APG uzoraka, i može se tumačiti značajnim strukturiranjem ovih mešovityh emulzionih sistema.

### 4.1.3 Reološka merenja

Reološka karakterizacija uzoraka, koja je usledila u daljem toku ispitivanja, imala je za cilj procenu esencijalnih fizičkih atributa emulzionih sistema, koji bi pružili dodatne informacije o koloidnoj strukturi ispitivanih sistema (Barnes, 1994; Tadros, 2004). Shodno dizajnu prve faze eksperimentalnog rada, kontinualna reološka merenja sprovedena su kako bi se utvrdilo da li dodatak variranih korastvarača ima značajan uticaj na mikrostrukturu sistema, kao i radi procene fizičke stabilnosti ispitivanih uzoraka.

Uporedni prikaz kriva proticanja/tečenja ispitivanih i referentnih podloga dat je na slici 4.1.6. Može se uočiti da sve uzorke karakteriše pseudoplastični tip tečenja (eng. *shear-thinning flow behavior*) sa umerenom do izraženom tiksotropijom. Razlika u reološkom ponašanju uzoraka stabilizovanih APG emulgatorom (podloge S1-S4) i konvencionalnim nejonskim emulgatorima (R1, R2), kako u izgledu samih profila proticanja, tako i u vrednostima minimalnih i maksimalnih prividnih viskoziteta ( $\eta_{\min}$ ,

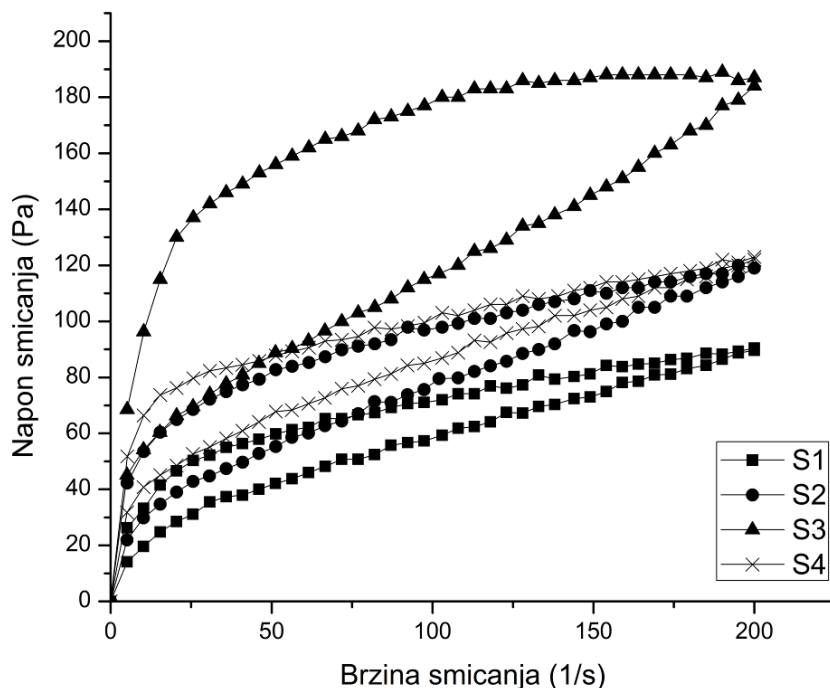
$\eta_{\max}$ ) i histereznih površina, je značajna, i ukazuje na razlike u koloidnoj strukturi, što je u saglasnosti sa prethodno prikazanim polarizacionim mikrografijama. Uočeno reološko ponašanje APG podloga (slika 4.1.7), sa umereno izraženom tiksotropijom i ne tako visokim vrednostima prinosnog napona, generalno se smatra poželjnim ponašanjem farmaceutskih oblika koji se primenjuju na koži, i ukazuje na dobre aplikativne osobine, odnosno lako razmazivanje i obrazovanje kontinuiranog filma koji dobro adherira na površinu kože (Tasić-Kostov, 2012).



**Slika 4.1.6.** Uporedni prikaz reograma ispitivanih i referentnih podloga, ispitanih 7 dana nakon izrade (srednja vrednost tri merenja).

Suprotno inicijalnoj hipotezi, dobijene krive proticanja pokazuju da inkorporiranje IPA u koncentraciji od 10 % (m/m) nije značajno uticalo na koloidnu strukturu APG-stabilizovane podloge. Slično se može reći i za dodatak glicerola (20 % m/m), dok je dodatak propilenglikola u istoj koncentraciji doveo do izvesnog ugušćivanja sistema (slika 4.1.7). Uočeno povećanje viskoziteta uzorka sa propilenglikolom (podloga S3) u saglasnosti je sa rezultatima mikroskopske analize, imajući u vidu da je uporedna karakterizacija mikrografija APG podloga ukazala da dati uzorak poseduje kapi unutrašnje faze najmanjeg dijametra (Korhonen i sar., 2000).

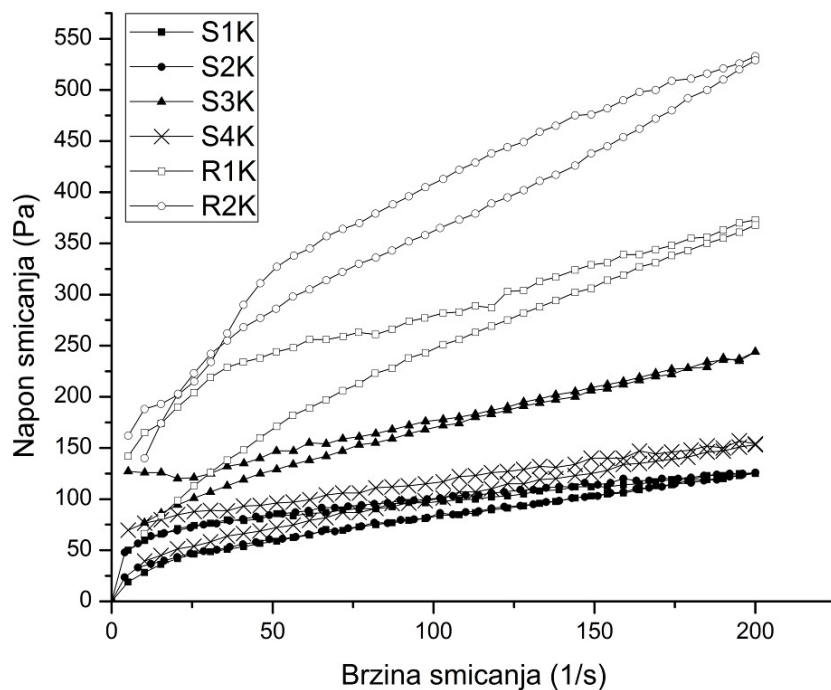
Nasuprot tome, dodatak IPA u referentnu farmakopejsku podlogu doveo je do značajne promene u reološkom ponašanju, koja se ogleda kako u samom izgledu profila proticanja, tako i drastičnom smanjenju vrednosti histereznih površina ( $42307 \pm 79$  Pa/s za podlogu R1, odnosno  $4889 \pm 63$  Pa/s za podlogu R2), što je jasan pokazatelj postojanja određenih interakcija između sastojaka podloge i dodatog korastvarača, koje su se manifestovale već 7 dana nakon izrade (slika 4.1.6).



**Slika 4.1.7.** Krive proticanja podloga stabilizovanih APG emulgatorom: uticaj variranih korastvarača na reološke osobine uzoraka.

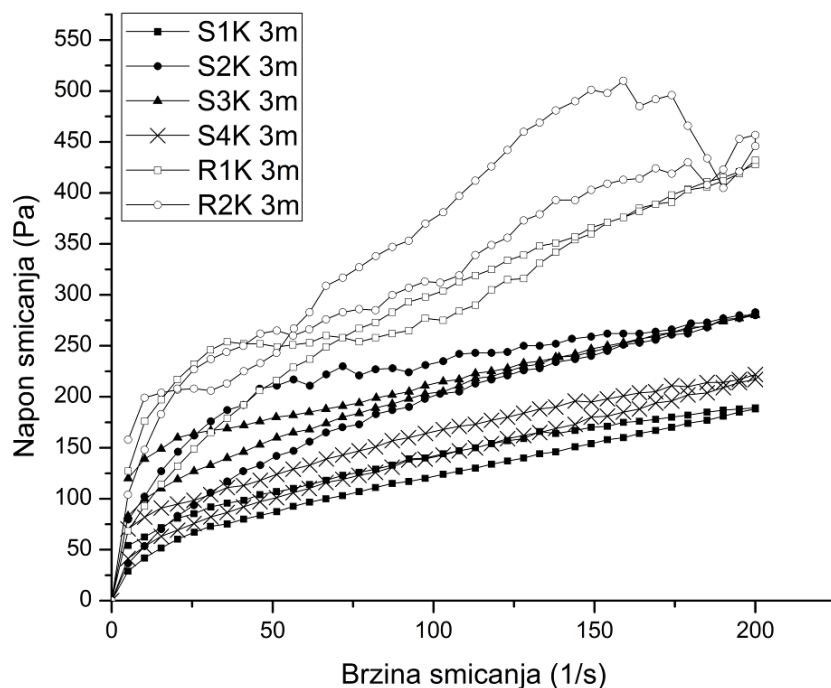
Nakon inkorporiranja ketoprofena kao model lekovite supstance u ispitivane podloge, do najizraženijih promena opet je došlo u slučaju referentnih podloga (slika 4.1.8). Uočeno smanjenje vrednosti površina histerezne petlje, može se objasniti činjenicom da je, u skladu sa anticipiranom primenom ispitivanih podloga, i uobičajenom praksom izrade magistralnih lekova, ketoprofen inkorporiran suspendovanjem ručnom metodom u prethodno izrađene podloge. Ova manipulacija očigledno dovodi do promene određenih reoloških karakteristika farmakopejske podloge, koju je inicijalno karakterisao najveći viskozitet. Dodatno, u slučaju referentnog uzorka sa IPA dolazi do presecanja uzlazne i silazne krive, što ukazuje da tokom samog ispitivanja, odnosno pod dejstvom spoljašnje sile, dolazi do izvesne

„nadogradnje“ strukture (eng. *structural build-up*) (Eccleston i Beattie, 1988), što takođe ide u prilog prethodno izloženoj hipotezi o postojanju interakcija između ovog emulzionog sistema i IPA.



**Slika 4.1.8.** Krive proticanja uzoraka sa ketoprofenom kao model lekovitom supstancom, 7 dana nakon izrade.

Što se tiče APG uzoraka, može se reći da dodatak ketoprofena kao model lekovite supstance nije značajno uticao na reološke karakteristike sistema. Izvesne promene profila proticanja uzorka S3K, pre svega u smislu pomeranja krive proticanja ka višim vrednostima uz istovremeno smanjenje histerezne površine, mogu se objasniti rastvaranjem ketoprofena od strane propilenglikola kao dodatog korastvarača. Rastvorena frakcija leka verovatno dovodi do određenih lek-podloga interakcija koje vode ka kompleksnom strukturiranju sistema, i uočenoj promeni konzistencije.

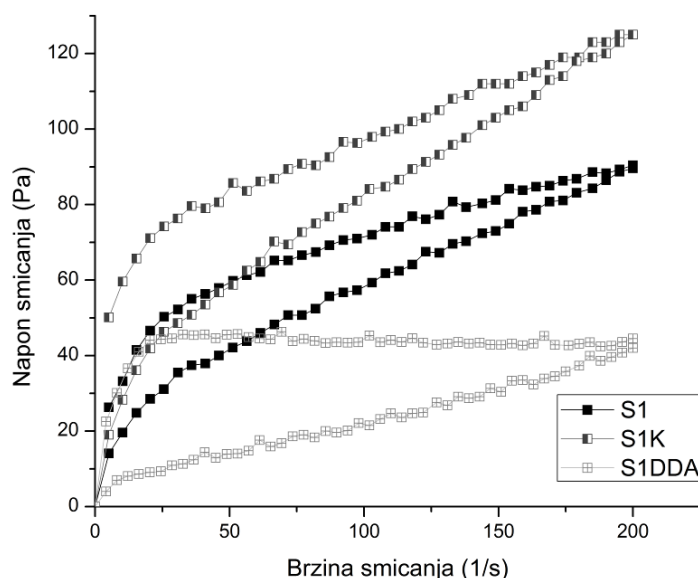


**Slika 4.1.9.** Reološka karakterizacija uzoraka sa ketoprofenom: kontrolno merenje nakon 3 meseca (3m) čuvanja uzoraka na sobnoj temperaturi.

Nakon 3 meseca čuvanja uzoraka na sobnoj temperaturi, uočene su promene u reološkom ponašanju APG uzorka sa IPA (S2K) i ostala dva uzorka (R1K i R2K) (slika 4.1.9). U poređenju sa inicijalnim merenjem (7 dana nakon izrade uzoraka), kriva proticanja uzorka S2K pomerena je ka višim vrednostima, uz odgovarajuće povećanje vrednosti histerezne površine. Imajući u vidu da je slično ponašanje uočeno i u slučaju same podloge S2 nakon 3 meseca, date promene delimično se mogu pripisati naknadnom strukturiranju sistema, što je česta odlika preparata stabilizovanih nejonskim mešanim emulgatorima. Ipak, s obzirom da je pomenuta promena najizraženija u slučaju uzorka sa dodatkom IPA, značajan doprinos sigurno ima i isparavanje određene frakcije dodatog korastvarača tokom čuvanja. Promena u profilu proticanja uzorka R2K ogleda se u krajnje nehomogenoj krivoj tečenja, i očigledno je posledica nesposobnosti referentne podloge da zadrži ovaj lako isparljivi korastvarač u dužem vremenskom periodu. Takođe, preklapanje uzlazne i silazne krive može se tumačiti nezadovoljavajućom fizičkom stabilnošću, kao i neodgovarajućim aplikativnim karakteristikama datog uzorka. Uočene reološke karakteristike nisu se menjale prilikom sledećeg kontrolnog merenja, tj. nakon 6 meseci čuvanja uzoraka na sobnoj temperaturi.



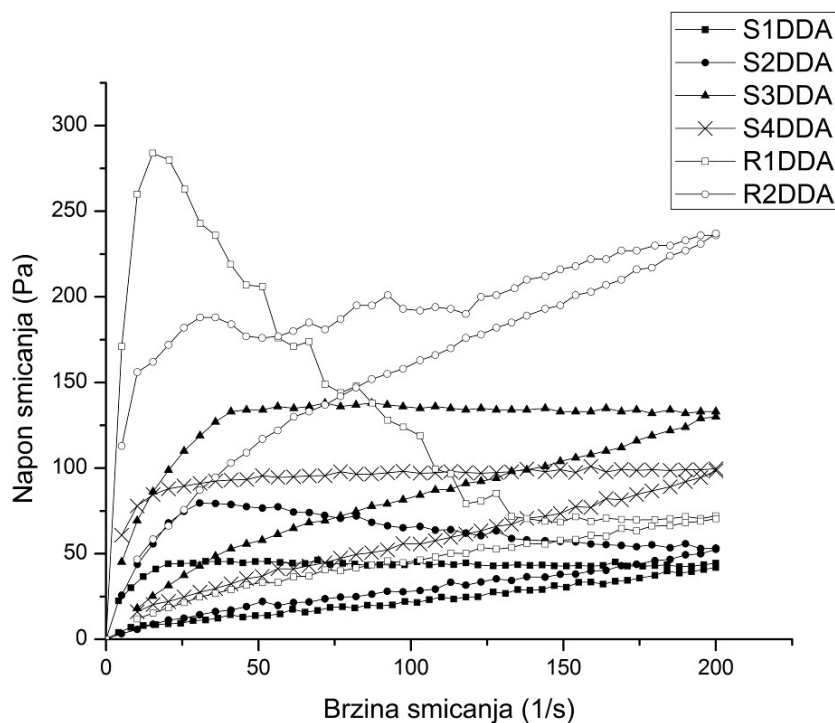
Imajući u vidu razlike u fizičko-hemijskim osobinama izabranih model lekovitih supstanci, od interesa je bilo ispitati njihov uticaj na koloidnu strukturu same APG podloge (slika 4.1.10). S obzirom na slabu rastvorljivost ketoprofena, mikroskopska analiza je potvrdila da je ova model lekovita supstanca ostala suspendovana u svim APG uzorcima, nezavisno od variranih korastvarača. Stoga se uočeno pomeranje kriva proticanja ka višim vrednostima nakon inkorporiranja ketoprofena može objasniti prisustvom kristala nerastvorenog ketoprofena. Nasuprot tome, kao supstanca izraženih amfifilnih osobina, uticaj DDA na koloidnu strukturu APG podloga bio je, očekivano, izraženiji. S obzirom da je i sama koloidna struktura podloge bila dovoljna da rastvori inkorporirani DDA, registrovane promene profila proticanja, uz povećanje vrednosti histerezne površine rezultat su uključivanja datog amfifila u osnovni mehanizam stabilizacije emulzionog sistema.



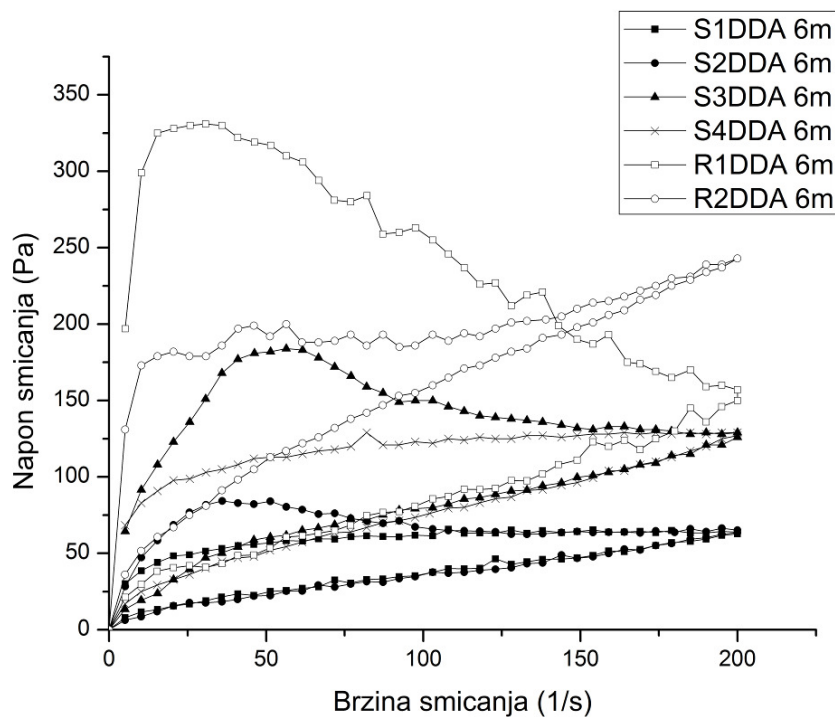
**Slika 4.1.10.** Uticaj dodatka model lekovitih supstanci na koloidnu strukturu osnovne APG podloge.

Slično prethodnim uzorcima, uzorke sa DDA kao model lekovitom supstancom takođe karakteriše nenjutnovsko, pseudoplastično (tikotropno) ponašanje (slika 4.1.11). Može se uočiti da je inkorporiranje DDA u sve ispitivane podloge rezultovalo povećanjem vrednosti histereznih površina. Dodatak korastvarača u osnovnu APG podlogu uslovio je povećanje vrednosti histereznih površina sledećim redosledom: S1DDA ( $4492 \pm 12$  Pa/s) < S2DDA ( $6718 \pm 29$  Pa/s) < S4DDA ( $7570 \pm 23$  Pa/s) <

S3DDA ( $9175 \pm 28$  Pa/s), odnosno inkorporiranje DDA kao model lekovite supstance dovelo je do proporcionalnog povećanja vrednosti histereznih površina, u poređenju sa vrednostima koje odgovaraju samim podlogama. Uticaj prisustva IPA na referentnu podlogu bio je još više izražen nego u slučaju APG podloge, uz primetno smanjenje konzistencije, odnosno rastečnjavanje (eng. *thinning*) ovog emulzionog sistema ( $18003 \pm 54$  Pa/s za R1DDA, odnosno  $8166 \pm 23$  Pa/s za R2DDA). Što se tiče aspekta fizičke stabilnosti uzoraka, kontrolna merenja sprovedena nakon 30, 90 i 180 dana (slika 4.1.12), nisu ukazala na značajnije promene praćenih reoloških parametara. Stoga, može se zaključiti da je zadovoljavajuća fizička stabilnost ispitivanih podloga zadržana i nakon inkorporiranja DDA kao model lekovite supstance, nezavisno od prirode variranog korastvarača.



**Slika 4.1.11.** Krive proticanja ispitivanih i referentnih uzoraka sa DDA, 7 dana nakon izrade uzoraka.



**Slika 4.1.12.** Uporedni prikaz reograma uzoraka sa DDA: kontrolno merenje nakon 6 meseci (6m) čuvanja na sobnoj temperaturi.

Imajući u vidu da je uobičajen rok upotrebe magistralnih lekova u obliku kremova (konzervisan preparat, u plastičnoj kutiji kao unutrašnjem pakovanju korišćenom u ispitivanju), do mesec dana (DAC 2007), može se reći da su kontinualna reološka merenja ukazala na zadovoljavajuću fizičku stabilnost APG podloga u poređenju sa referentnim uzorkom, naročito u smislu potencijala za inkorporiranje različitih model lekovitih supstanci ili korastvarača. Dobijeni rezultati biće razmatrani i u smislu procene eventualnog uticaja na oslobađanje model lekovitih supstanci iz primenjenih nosača (Welin-Berger i sar., 2001).

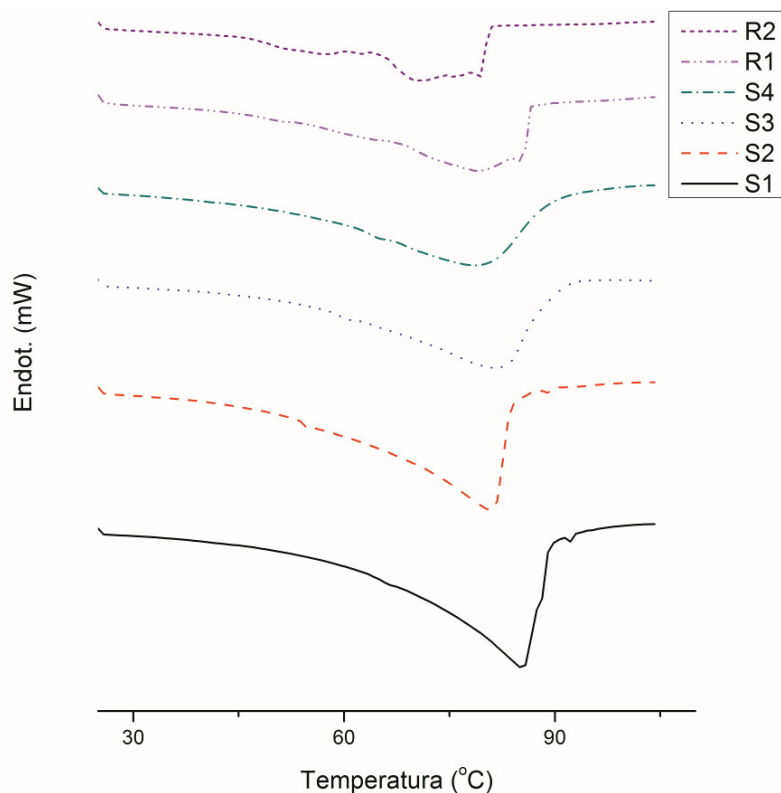
#### 4.1.4 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

DSC merenja uključena su u I fazu eksperimentalnog rada kako bi se uporedili fazni prelazi ispitivanih uzoraka, u cilju dodatne procene razlika u koloidnim strukturama, prethodno otkrivenih posredstvom polarizacione mikroskopije i reološke karakterizacije. Dobijeni termoanalitički parametri potvrdili su postojanje značajnih

razlika između APG i referentnih uzoraka, reflektovane kroz oblik krive (slika 4.1.13), temperaturne maksimume pikova i ukupne entalpije endotermalnih tranzicija (tabela 4.1.2).

DSC skenove APG podloga karakteriše jedan, relativno oštar endotermni pik pri temperaturi od 80 do 86°C. Nasuprot tome, skenovi referentnih uzoraka okarakterisani su endotermnim pikom koji se prostire u znatno širem temperaturnom opsegu (70 – 85°C), sa tzv. širokim ramenim prelazom (eng. *broad shoulder*) u oblasti od 50 do 60°C. Iako je ovakve endotermalne krive obično teško interpretirati, nakon uvida u podatke reološke karakterizacije, sigurno je da ukazuju na inherentne razlike u prirodi mikrostrukture APG i farmakopejske podloge (Ribeiro i sar., 2004). Čini se da dodatak IPA, kao jednog od variranih korastvarača/potencijalnih penetracionih inhensera, dovodi do blagog pomeranja endotermalnih tranzicija ka nižim vrednostima  $\Delta H$  (1708,6 i 1595,6 mJ/mg, za S1 i S2, respektivno). Uticaj dodatka IPA u ispitivane podloge ogleda se i u pomeranju temperaturnog maksimuma glavnog pika ka nižim temperaturama (86,1° → 80,8°C), ali i u pojavi dodatnog pika, malog intenziteta, na temperaturi od 54,6°C, koji se može objasniti isparavanjem frakcije IPA koja je slabo vezana unutar sistema.

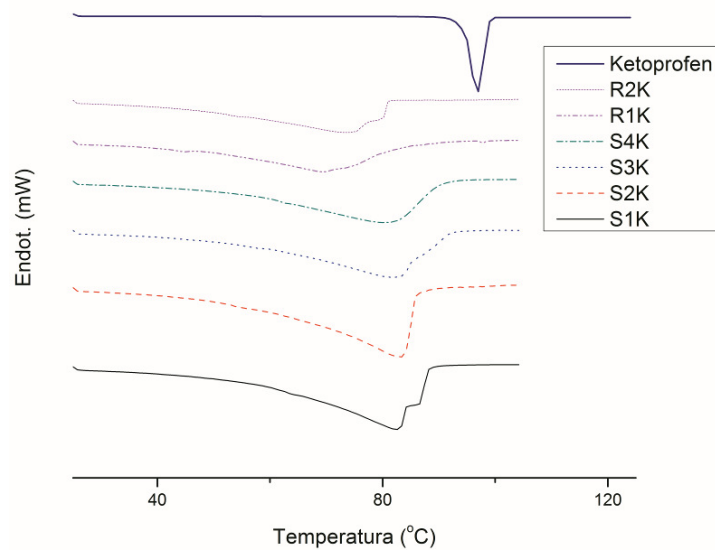
Što se tiče APG uzoraka sa dodatkom propilenglikola (S3), odnosno glicerola (S4), može se uočiti određena sličnost u obliku endotermi ovih uzoraka i referentnog uzorka R1. Čini se da je dodatak ovih poliola u osnovnu APG podlogu doveo do svojevrsnog približavanja njihovih endotermalnih tranzicija sa referentnim. Sličnost je naročito primetna između uzoraka S4 i R1, verovatno kao posledica prisustva istog poliola – glicerola, i to u koncentraciji od 20 % (m/m) u uzorku S4, odnosno 10 % (m/m) u referentnoj podlozi.



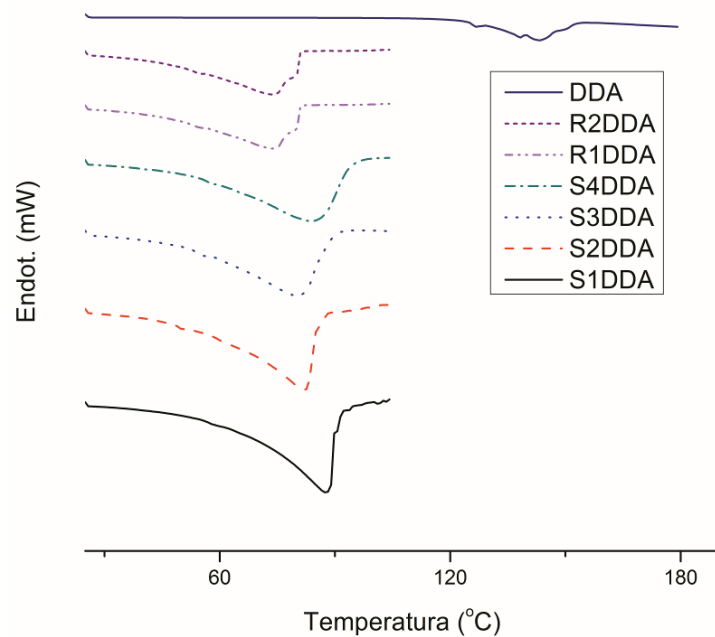
**Slika 4.1.13.** Uporedni prikaz DSC skenova ispitivanih i referentnih podloga.

Prisustvo ketoprofena nije uslovalo značajne promene u praćenim parametrima, s obzirom da se vrednosti ukupne entalpije topljenja nisu značajno menjale (tabela 4.1.2). Prema tome, iako je bilo očekivano da će DSC merenja pružiti dodatne informacije o frakciji lekovite supstance koja je rastvorena i/ili solubilizirana unutar sistema (Barreiro-Iglesias i sar., 2003), takvi zaključci nisu mogli biti doneti, verovatno kao posledica relativno male koncentracije ketoprofena u ispitivanim uzorcima (uobičajena terapijska koncentracija od 2,5 % m/m). U slučaju APG uzoraka K-serije sa propilenglikolom i glicerolom, nije pokazana prethodno uočena sličnost sa referentnim uzorcima. Može se pretpostaviti da je stepen rastvaranja ketoprofena u podlogama S3 i S4, uticao na povećanje ukupne aktivacione energije potrebne za topljenje ovih uzoraka, za razliku od referentnih podloga gde je rastvaranje ketoprofena, sudeći po rezultatima polarizacione mikroskopije, bilo neznatno. Kao model lekovita supstanca čija je DSC kriva okarakterisana oštrim pikom sa temperaturnim maksimumom na 97°C (slika 4.1.14), pojava dodatnog pika na endotermnoj krivi uzorka R1K sa temperaturnim

maksimumom na 97,8°C, može se pripisati upravo topljenju nerastvorene frakcije ketoprofena u datoj referentnoj podlozi.



**Slika 4.1.14.** DSC skenovi ketoprofena i ispitivanih uzoraka sa 2,5 % (m/m) ove model lekovite supstance.



**Slika 4.1.15.** DSC skenovi diklofenak dietilamina i ispitivanih uzoraka sa 1,16 % ove model lekovite supstance.

U skladu sa prethodnim razmatranjima, a s obzirom na malu koncentraciju DDA u uzorcima (1,16 % m/m), kao i postignuto rastvaranje ove model lekovite supstance u svim podlogama, nije očekivano da će inicijalno suspendovani DDA značajno uticati na praćene parametre termalne analize. Vrednost  $\Delta H$  dobijena analizom čistog DDA od 98,6 mJ/mg dodatna je potvrda ove hipoteze. Slično uzorcima K-serije, APG uzorke sa DDA odlikuje relativno oštar endotermni pik, koji podleže pomeranju ka nižim temperaturama u slučaju dodatka IPA ( $87,6^\circ \rightarrow 82,0^\circ\text{C}$ ). Takođe, oba uzorka sa dodatkom IPA, bez obzira na prirodu podloge, poseduju dodatni endotermni pik pri temperaturi od 50,1 i 55,7°C, u slučaju uzorka S2DDA, odnosno R2DDA, što neminovno treba pripisati alkoholnoj frakciji koja je slabo vezana unutar koloidne strukture. Nasuprot APG uzorcima ( $\Delta H$  1604,7 i 1431,4 mJ/mg za uzorak S1DDA i S2DDA, respektivno), referentni uzorci okarakterisani su širokim endotermnim krivama uz značajno niže vrednosti  $\Delta H$  (968,1 i 980,6 mJ/mg za uzorak R1DDA, odnosno R2DDA). Dobijeni rezultati nisu ostavili prostora za tumačenje eventualnih uticaja amfifilne prirode DDA na koloidnu strukturu uzoraka.

Konačno, značajno viša aktivaciona energija potrebna za topljenje uzoraka stabilizovanih APG emulgatorom (sa ili bez dodatka model lekovite supstance), može se objasniti obrazovanjem kompleksnim lamelarnim fazama (tečnokristalna i gel faza), koje obezbeđuju značajnu stabilnost ispitivanih model podloga, čime se još više potencira suštinska razlika u koloidnim strukturama ispitivanih i referentnih uzoraka.

**Tabela 4.1.2.** Rezultati termalne analize: parcijalni gubitak mase tokom definisanih temperaturnih intervala dobijen TG analizom, i ukupne entalpije topljenja ( $\Delta H$ ) kao rezultat DSC merenja, izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  SD.

Uzorak	30-50°C (%)	50-70°C (%)	70-110°C (%)	Rezidualna masa (%)	$\Delta H$ (mJ/mg)	Temperaturni maksimumi DSC pikova (°C)
S1	9,70 $\pm$ 1,07	19,47 $\pm$ 1,80	41,48 $\pm$ 3,12	27,42 $\pm$ 4,70	1708,6 $\pm$ 93,0	86,1
S2	11,77 $\pm$ 0,88	59,58 $\pm$ 0,67	3,79 $\pm$ 1,11	27,22 $\pm$ 0,27	1595,6 $\pm$ 110,0	54,6/80,8
S3	9,32 $\pm$ 0,81	45,12 $\pm$ 0,30	20,20 $\pm$ 1,60	26,51 $\pm$ 1,20	1232,7 $\pm$ 17,5	82,8
S4	9,56 $\pm$ 0,49	22,45 $\pm$ 1,00	26,31 $\pm$ 0,95	40,34 $\pm$ 3,45	1222,3 $\pm$ 229,7	78,6
R1	4,57 $\pm$ 0,41	30,56 $\pm$ 0,88	8,20 $\pm$ 0,40	52,24 $\pm$ 1,48	948,2 $\pm$ 72,1	78,6
R2	3,99 $\pm$ 0,62	33,67 $\pm$ 2,20	8,76 $\pm$ 0,99	50,15 $\pm$ 1,04	770,2 $\pm$ 67,0	70,8
S1K	11,20 $\pm$ 1,65	30,28 $\pm$ 2,20	29,79 $\pm$ 5,66	26,10 $\pm$ 2,85	1624,4 $\pm$ 104,6	83,6
S2K	10,81 $\pm$ 0,16	54,84 $\pm$ 1,82	5,32 $\pm$ 0,28	26,75 $\pm$ 2,55	1584,1 $\pm$ 37,7	83,3
S3K	10,78 $\pm$ 1,16	42,56 $\pm$ 1,40	18,58 $\pm$ 0,05	26,41 $\pm$ 2,73	1138,7 $\pm$ 76,1	81,8
S4K	12,08 $\pm$ 1,10	33,73 $\pm$ 2,53	10,34 $\pm$ 3,72	40,95 $\pm$ 0,14	1283,6 $\pm$ 65,5	80,2
R1K	9,69 $\pm$ 0,81	17,35 $\pm$ 0,57	12,40 $\pm$ 0,98	62,08 $\pm$ 0,86	809,7 $\pm$ 56,3	69,4/97,8
R2K	8,54 $\pm$ 0,93	18,16 $\pm$ 1,03	13,78 $\pm$ 1,20	60,86 $\pm$ 1,11	792,3 $\pm$ 30,8	73,3
S1DDA	9,44 $\pm$ 0,46	37,61 $\pm$ 1,89	24,45 $\pm$ 0,40	27,52 $\pm$ 3,34	1604,7 $\pm$ 66,2	87,6
S2DDA	12,16 $\pm$ 3,12	54,07 $\pm$ 1,24	6,04 $\pm$ 2,84	27,13 $\pm$ 2,63	1431,4 $\pm$ 78,3	50,1/82,0
S3DDA	10,18 $\pm$ 0,05	43,17 $\pm$ 0,61	19,71 $\pm$ 0,07	24,95 $\pm$ 4,84	1246,9 $\pm$ 17,1	80,2
S4DDA	10,50 $\pm$ 0,28	36,66 $\pm$ 3,30	9,48 $\pm$ 3,61	42,03 $\pm$ 2,84	1292,8 $\pm$ 43,3	83,8
R1DDA	3,54 $\pm$ 3,74	21,49 $\pm$ 2,73	13,74 $\pm$ 1,63	58,56 $\pm$ 4,26	968,1 $\pm$ 11,4	73,7
R2DDA	7.21 $\pm$ 2.19	33.16 $\pm$ 1.71	11.43 $\pm$ 2.02	46.27 $\pm$ 3.39	980,6 $\pm$ 13,1	55,7/74,4



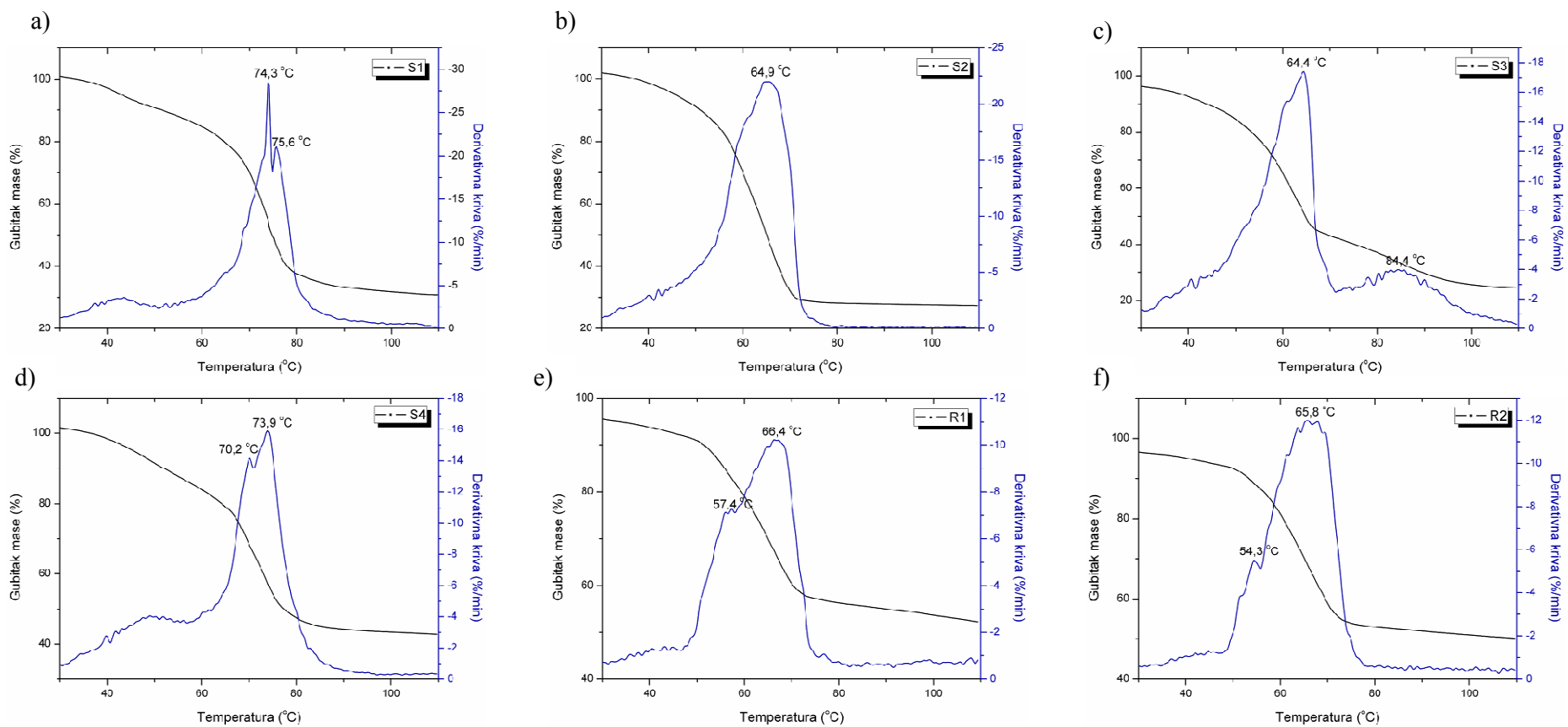
#### 4.1.5 Termogravimetrijska analiza (TGA)

Imajući u vidu prethodno uočenu kompleksnost strukture uzoraka stabilizovanih APG emulgatorima, a u cilju dodatne karakterizacije koloidne strukture podloga sa i bez dodatka variranih korastvarača, sprovedena je termogravimetrijska analiza kao termalna tehnika često korišćena simultano sa DSC. TGA može pružiti informacije o načinu distribucije vode unutar emulzionih sistema, čime se dobija dublji uvid u prirodu same koloidne strukture. Samim tim, s obzirom da se voda često naziva jednim od najbezbednijih penetracionih inhensera (Hadgraft, 1999), efekat koji primenjena podloga ima na biofizičke karakteristike kože (naročito stepen hidratacije SC), može značajno uticati na perkutanu resorpciju lekova. Rezultati TG analize dobijeni su kako *direktnim* ispitivanjem dobijenih profila, što je pružilo uvid u gubitak mase u funkciji promene temperature u različitim temperaturnim intervalima, tako i *indirektno*, komparativnom analizom derivativnih TGA krivih (tzv. DTG profili), u cilju procene brzine evaporacije (slika 4.1.16). Iako se često aproksimira da zabeleženi gubitak mase odgovara vodi u sistemu, gubitak drugih sastojaka ne sme biti zanemaren (Peramal i sar., 1997), poput variranih korastvarača, u ovom slučaju.

Rezultati ukazuju da je u osnovnom APG uzorku S1, voda dominantno inkorporirana kao slobodna (eng. *bulk*) voda, koja je mehanički vezana u sklopu hidrofilne gel faze (Nesseem, 2001), te stoga u najvećem procentu podleže isparavanju u trećem temperaturnom opsegu (70–110°C) (tabela 4.1.2), do čega verovatno dolazi tek nakon narušavanja obrazovanih lamelarnih faza. Za ovo delimično može biti odgovoran i dodatak čistog cetostearil alkohola kao lipofilnog koemulgatora, koji za svoje duge lance vezuje vodu u vidu semihidrata (Junginger, 1992; Peramal i sar., 1997). Nasuprot tome, u APG podlozi sa dodatkom IPA (uzorak S2), propilenglikola (uzorak S3) i obe referentne podloge (R1 i R2), veći gubitak mase pokazan je tokom zagrevanja od 50 do 70°C. Ova frakcija se obično naziva 'sekundarnom' vodom. Što se uzorka S4 tiče, čini se da je dodatak glicerola uslovio svojevrsnu ravnotežu u pogledu raspodele vode kao sekundarne (22,45%) i slobodne (26,31%) vode. Takođe, osim činjenice da se referentna podloga sastoji iz značajno većeg udela neisparljivih

sastojaka, velike vrednosti rezidualnih masa uzoraka R1, R2, ali i S4, mogu se povezati i sa dodatkom glicerola kao zajedničkog korastvarača u pomenutim uzorcima.

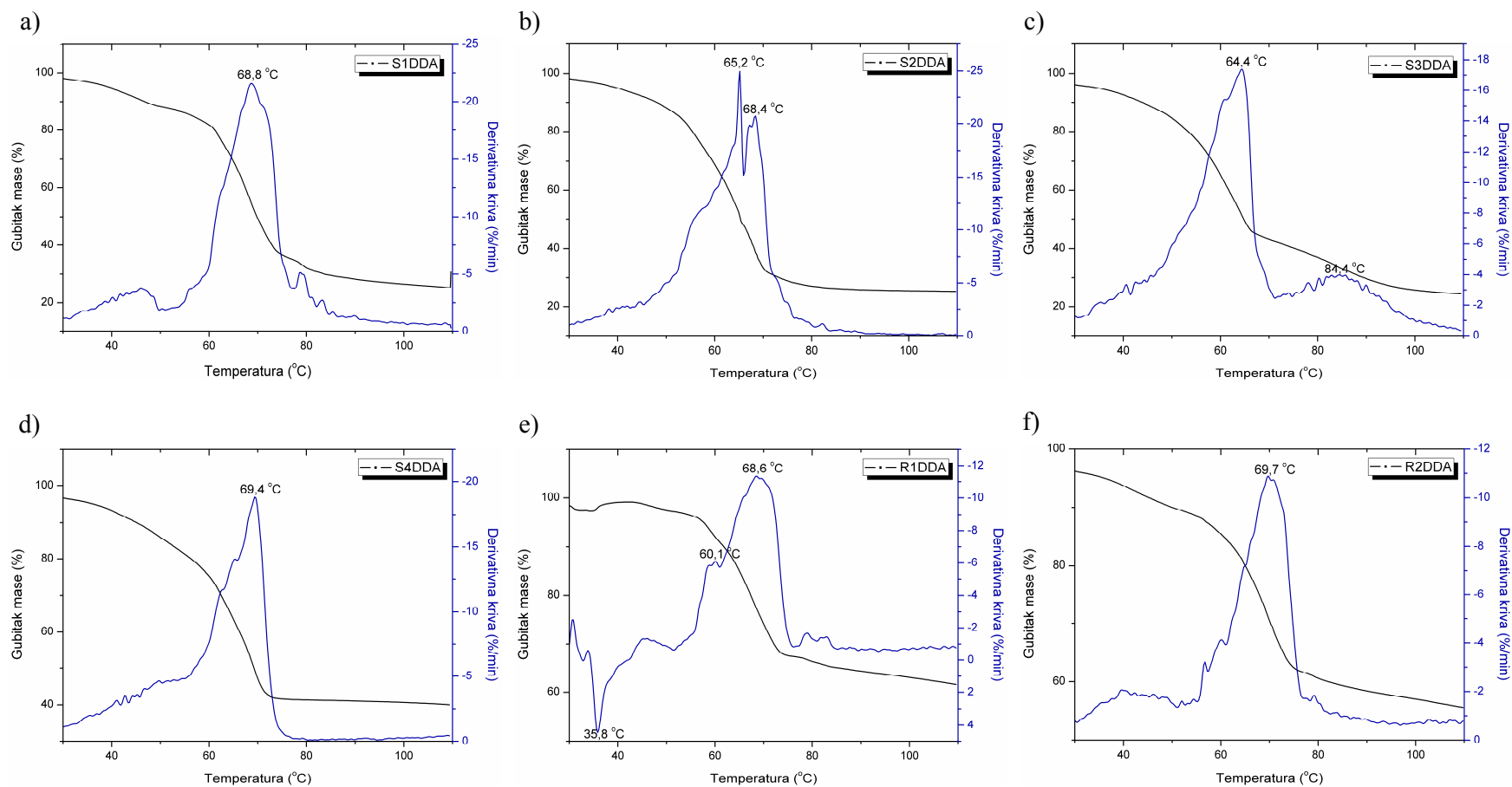
Pažljivim razmatranjem derivativnih profila (slika 4.1.16), može se uočiti izvesno povećanje brzine evaporacije uzoraka S2 i S3, u poređenju sa osnovnom APG podlogom. Iako je bilo očekivano da će IPA, kao lako isparljivi alkohol, doprineti slobodnoj evaporaciji sa površine odgovarajućih uzoraka, rezultati ukazuju da ovaj alkohol dominantno isparava u drugom temperaturnom opsegu, što ukazuje na snažnu inkorporaciju u obrazovane mezofaze (Stubenrauch, 2001), prethodno uočenu analizom polarizacionih mikrografija. Brzina evaporacije u slučaju uzorka S1 raste do temperature od 74,6°C, dok je odgovarajuća derivativna kriva uzorka S2 pomerenka ka nižim temperaturama (64,4°C), što je očigledan uticaj dodatog alkohola. Slično ponašanje uzorka sa propilenglikolom nije bilo očekivano. Mali pikovi na derivativnim krivama uzoraka R1 (57,4°C) i R2 (54,3°C), koji prethode osnovnom piku, mogu biti rezultat topljenja cetostearil alkohola, uzimajući u obzir količinu prisutnu u referentnim uzorcima. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima publikovanim od strane Nesseem (2001) i činjenicom da je tačka topljenja cetearil alkohola oko 56°C.



**Slika 4.1.16.** Komparativan prikaz TGA i DTG profila ispitivanih podloga: a) S1, b) S2, c) S3, d) S4, e) R1 i f) R2.

Što se aktivnih uzoraka tiče, čini se da je dodatak model lekovitih supstanci uslovio svojevrsno ujednačavanje dinamike gubitka mase među uzorcima (tabela 4.1.2). Naime, u uzorcima sa ketoprofenom i DDA, voda je dominantno distribuirana kao sekundarna voda, uz očuvanje velikih rezidualnih masa svih uzoraka sa glicerolom (S4, R1 i R2). Iako inkorporiranje ketoprofena u ispitivane podloge nije uslovilo promenu u brzinama evaporacije, određene promene uočene su u sistemima sa DDA, zbog čega su odgovarajući TGA/DTG profili prikazani na slici 4.1.17. Uočene promene verovatno nastaju kao posledica izražene amfifilne prirode ove model lekovite supstance, usled čega se udeo vode insertovan između lamela povećava na račun *bulk* vode (Konya i sar., 2003).

Sveobuhvatnim pregledom rezultata TG analize, nameće se zapažanje da na distribuciju vode u sistemu, kao i očekivanu brzinu evaporacije, osim prirode izabranog emulgatora (Konya i sar., 2004), značajno utiče i dodatak korastvarača i/ili lekovite supstance, čak i u relativno niskim (terapijskim) koncentracijama. Na perkutanu resorpciju aktivnih supstanci inkorporiranih u emulzione sisteme prevashodno utiče interlamelarno vezana voda, dok *bulk* voda obezbeđuje bolju hidrataciju kože i doprinosi subjektivnom osećaju hlađenja na koži (Konya i sar., 2003), što odgovara mnogim promenama na koži. Stoga, informacije koje pruža TG analiza biće razmatrane i uz rezultate *in vivo* ispitivanja dermalne raspoloživosti i efekata koje ove podloge ispoljavaju na koži.



**Slika 4.1.17.** TGA i DTG krive uzoraka sa DDA kao model lekovitom supstancom: **a)** S1DDA, **b)** S2DDA, **c)** S3DDA, **d)** S4DDA, **e)** R1DDA i **f)** R2DDA.

#### 4.1.6 Određivanje koncentracije zasićenja/saturacione koncentracije model lekovitih supstanci u ispitivanim podlogama

Ispitivanje saturacionih koncentracija ( $C_s$ ) model lekovitih supstanci u ispitivanim podlogama, sprovedeno je sa ciljem da se potvrdi potencijal same podloge i/ili dodatog korastvarača da rastvori inicijalno suspendovanu lekovitu supstancu, koji je prethodno uočen posmatranjem uzoraka pod polarizacionim mikroskopom. Dobijene vrednosti razmatrane su sa aspekta termodinamičke aktivnosti model leka u datoj podlozi, i mogućeg uticaja na dermalnu raspoloživost leka.

$C_s$  ketoprofena u APG-podlozi sa IPA (S2K) je tri puta viša od odgovarajuće podloge bez dodatka ovog alkohola (S1K) (tabela 4.1.3). Iako su u slučaju dodatka propilenglikola i glicerola zabeležene nešto veće vrednosti  $C_s$  u poređenju sa osnovnom APG podlogom, očigledno je da i osnovna koloidna struktura stabilizovana šećernim emulgatorom poseduje značajnu sposobnost da rastvori inicijalno suspendovani lek. Kao što je i očekivano, u slučaju referentnih uzoraka dobijene su niže vrednosti  $C_s$ . Imajući u vidu sastav/sadržaj vode u datim uzorcima, kao i gustu matriks strukturu koja je uočena pod polarizacionim mikroskopom, može se reći da su ovakve vrednosti  $C_s$  bile donekle očekivane. U slučaju obe model lekovite supstance može se primetiti značajan uticaj dodatka IPA na vrednosti  $C_s$ . Ovo ukazuje na svojevrsan sinergistički efekat APG-stabilizovane koloidne strukture i IPA kao jednog od variranih korastvarača i penetracionih inhensera.

**Tabela 4.1.3.** Vrednosti saturacionih koncentracija ketoprofena i DDA u ispitivanim podlogama.

Uzorak	$C_s$ $10^{-4}$ g/ml	Uzorak	$C_s$ $10^{-3}$ g/ml
S1K	1,66	S1DDA	3,72
S2K	5,05	S2DDA	7,33
S3K	2,36	S3DDA	4,05
S4K	2,19	S4DDA	3,95
R1K	1,24	R1DDA	1,01
R2K	2,12	R2DDA	2,41

S obzirom da je polarizaciona mikroskopija svih uzoraka sa ketoprofenom potvrdila prisustvo kristala nerastvorenog leka, odnosno potpuno rastvaranje u slučaju DDA kao model lekovite supstance, termodinamička aktivnost ovih model lekovitih supstanci formalno se smatra nepromenjenom. Ipak, prikazane vrednosti saturacionih koncentracija ukazuju na pogodnost osnovne APG podloge da se jednostavnom modifikacijom njenog sastava utiče na efikasnost leka.

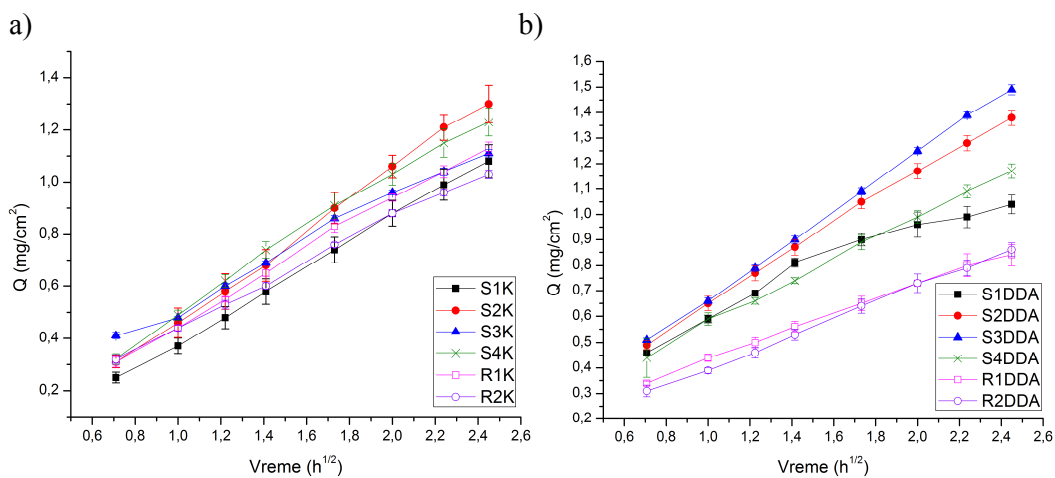
Kako je rastvorljivost lekovite supstance u izabranom nosaču/podlozi jedna od najvažnijih fizičko-hemijskih karakteristika koja može uticati na proces difuzije leka kroz različite slojeve kože (Manconi i sar., 2011), dobijene vrednosti  $C_s$  biće razmatrane i u drugoj fazi eksperimentalnog rada, u cilju boljeg sagledavanja rezultata studija penetracije i permeacije.

#### **4.1.7 *In vitro* ispitivanje liberacionih profila model lekovitih supstanci iz ispitivanih podloga**

U prvoj fazi eksperimentalnog rada, biofarmaceutska karakterizacija započeta je analizom *in vitro* profila oslobađanja ketoprofena i DDA iz ispitivanih podloga, kroz sintetske membrane od celulozaacetata.

Komparativo ispitivanje liberacionih profila ketoprofena nije pokazalo statistički značajnu razliku u količini oslobođene lekovite supstance iz ispitivanih uzoraka. Kada je količina oslobođenog leka predstavljena u zavisnosti od kvadrata vremena, dobijena je linearna zavisnost bez inicijalnog vremena odlaganja (eng. *lag time*) (slika 4.1.18.a). Uprkos izostanku statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ), može se uočiti trend poboljšanja oslobađanja ketoprofena iz uzorka S2K, počevši od drugog sata ispitivanja, verovatno usled promene u termodinamičkoj aktivnosti leka do koje dolazi nakon difuzije IPA kroz membranu. Ovo je u skladu sa prethodno izloženim  $C_s$  vrednostima uzoraka K-serije (tabela 4.1.3). Činjenica da se ovaj efekat manifestuje tek nakon 2 h ispitivanja, verovatno je posledica dizajna primenjene VanKel ćelije, koja je u potpunosti uronjena u akceptorski medijum, što onemogućava slobodnu i pravovremenu evaporaciju IPA sa mesta primene.

Relativno niske količine oslobođenog ketoprofena iz svih uzoraka, koje su se nakon 6 h ispitivanja kretale u opsegu od 8,99 do 12,36 %, verovatno su posledica slabije rastvorljivosti ketoprofena u fosfatnom puferu kao primenjenoj akceptorskoj fazi, što je poznati nedostatak datog ispitivanja, koji se može rešiti dodatkom nekog surfaktanta (polisorbata 20) ili alkohola (metanol, etanol) u izabrani medijum (Snorraddottir i sar., 2009).



**Slika 4.1.18.** Komparativni prikaz liberacionih profila: **a)** ketoprofena i **b)** DDA iz ispitivanih uzoraka, koji prate Higuchi-ovu kinetiku oslobađanja.

S druge strane, skrining liberacionih profila DDA ukazao je na statistički značajno veće oslobađanje DDA iz APG podloga u poređenju sa referentnim uzorkom bez IPA, ali i sa dodatim penetracionim inhenserom – 10 % m/m IPA (slika 4.1.18.b). Primera radi, iz uzorka sa propilenglikolom (S3DDA) nakon 6 h ispitivanja oslobođeno je  $1,49 \pm 0,02 \text{ mg/cm}^2$ , što odgovara  $26,74 \pm 0,36 \%$  DDA, a iz referentne podloge svega  $15,10 \pm 0,74 \%$  (R1DDA), odnosno  $15,34 \pm 0,48 \%$  kod uzorka R2DDA. Ovo je u saglasnosti sa prethodno izloženom hipotezom da kombinacija APG-stabilizovane koloidne strukture i dodatih korastvarača (u ovoj studiji posebno su se izdvojili IPA i propilenglikol), predstavlja uspešnu modifikaciju APG podloga kao perspektivnih nosača za ove lekovite supstance.

Ukoliko se dobijeni profili oslobađanja razmotre sa aspekta viskoziteta ispitivanih uzoraka, oslobađanje DDA iz referentnih uzoraka u skladu je sa njihovim reološkim ponašanjem (slika 4.1.11), s obzirom da je generalno prihvaćeno da veći viskozitet nosača uslovljava sporije oslobađanje leka (Gallagher i sar., 2003).



Fitovanjem dobijenih profila oslobađanja kroz nekoliko kinetičkih modela koji se potencijalno mogu primeniti na polučvrste sisteme, kao što su: kinetika nultog reda, kinetika prvog reda, Higuchi model i Hixon-Crowell model (tabela 4.1.4), primećeno je da kinetiku oslobađanja ketoprofena i DDA iz ispitivanih podloga najbolje opisuje Higuchi-eva jednačina sa koeficijentima determinacije  $R^2 > 0,99$ , odnosno da je oslobađanje lekovite supstance kontrolisano procesom difuzije (Rege i sar., 1998).

**Tabela 4.1.4.** Kinetika oslobađanja ketoprofena i DDA iz ispitivanih podloga ( $R^2$ ).

Uzorak	Kinetika nultog reda		Kinetika prvog reda		Higuchi model		Hixon-Crowell model	
	Model lekovita supstanca							
	K	DDA	K	DDA	K	DDA	K	DDA
S1	0,9771	0,7529	0,8843	0,7206	<b>0,9991</b>	<b>0,8502</b>	0,9241	0,7337
S2	0,9903	0,9661	0,9160	0,8990	<b>0,9935</b>	<b>0,9985</b>	0,9506	0,9257
S3	0,9612	0,9772	0,9063	0,9133	<b>0,9914</b>	<b>0,9997</b>	0,9276	0,9395
S4	0,9576	<b>0,9745</b>	0,8575	0,9550	<b>0,9965</b>	0,9449	0,8980	0,9639
R1	0,9663	0,9668	0,8812	0,9070	<b>0,9977</b>	<b>0,9985</b>	0,9160	0,9305
R2	0,9714	0,9738	0,9009	0,9163	<b>0,9981</b>	<b>0,9983</b>	0,9299	0,9394

Dominantno oslobađanje lekovitih supstanci prema Higuchi modelu bilo je očekivano, s obzirom da je originalna jednačina prilagođena situaciji kada se očekuje oslobađanje manje od 60 % leka (što je svakako slučaj kod lekova polučvrste konzistencije) (Bunge, 1998; Neubert i Wohlrab, 1990). S obzirom da se ovakva kinetika može javiti i kod formulacija u kojima je lekovita supstanca u potpunosti rastvorena, i kod onih tipa suspenzije (Arellano i sar., 1998), ovaj podatak nije pružio više informacija o termodinamičkoj aktivnosti inicijalno suspendovanih model lekovitih supstanci u ispitivane podloge, što bi se moglo povezati sa prethodno izloženim rezultatima sprovedene fizičko-hemijske karakterizacije.

Odstupanje od ove kinetike u slučaju uzorka S4DDA (nešto veća vrednost  $R^2$  ide u prilog kinetici nultog reda), može se povezati sa rezultatima TGA. Naime, iako je u datom uzorku voda dominantno distribuirana kao sekundarna (36,66 %), od svih APG uzoraka D-serije ovo je uzorak sa najizraženijom vrednosti rezidualne mase (42,03 %). Prema tome, nakon isparavanja najveće količine vode, na mestu primene verovatno

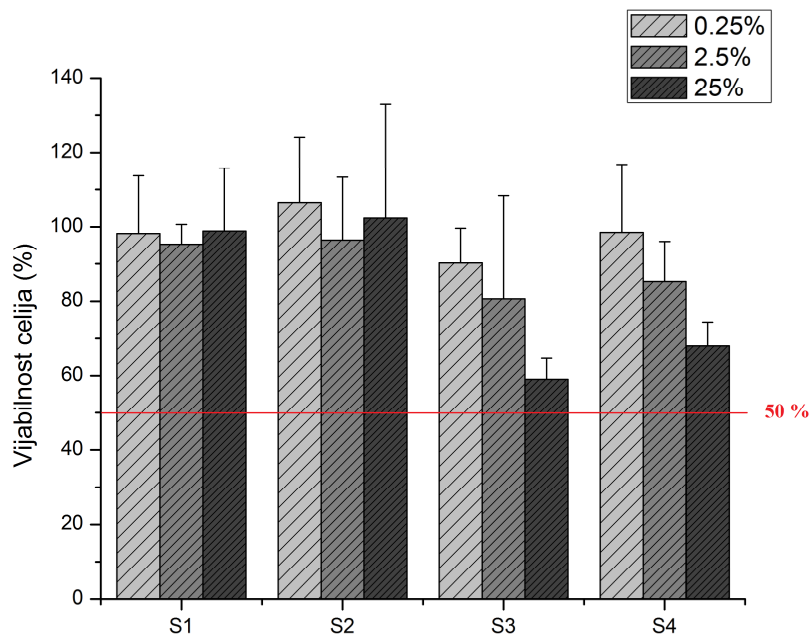
zaostaje film preparata značajne supstantivnosti iz kog se nastavlja oslobađanje leka, čime se može objasniti uočena ravnotežna brzina oslobađanja DDA (eng. *steady-state release*). S druge strane, poznato je da se kinetika nultog reda nekada može javiti kod nosača stabilizovanih lamelarnim ili heksagonalnim fazama (Hosmer i sar, 2011).

*In vitro* testovi prihvaćeni su kao važan pristup procene kvaliteta različitih formulacija. Parametri koji se pri tome mogu dobiti, mogu poslužiti kao indikatori kvaliteta za potrebe skrininga sličnih formulacija u procesu odabira završne formulacije, pre pristupanja odgovarajućim *in vivo* ispitivanjima. Ipak, tumačenju rezultata dobijenih *in vitro* metodama treba pristupiti oprezno, kako bi se izbegla preterana ekstrapolacija, imajući u vidu brojne anatomske i fiziološke faktore koji bi mogli ozbiljno uticati na donete zaključke (Csóka i sar., 2005).

#### **4.1.8 *In vitro* ispitivanje citotoksičnosti podloga stabilizovanih APG emulgatorom**

Prilikom karakterizacije novih ekscipijenasa ili razvoja novih formulacija, neophodno je ispitati i njihov iritacioni potencijal, kao jedan od najčešćih neželjenih efekata lekova koji se primenjuju na koži (Faller i sar., 2002). Iritacija kože procenjena je najpre *in vitro*, primenom tzv. MTT testa citotoksičnosti kao prihvaćenog protokola za skrining formulacija pre nego što se pristupi *in vivo* dermatološkim ispitivanjima na humanim dobrovoljcima. Razlog za uključivanje testa citotoksičnosti u prvu fazu eksperimentalnog rada bio je dvojak: (i) da se proceni efekat osnovne formulacije stabilizovane APG mešanim emulgatorom sastava cetearil glukozid i cetearil alkohol, a zatim i (ii) efekat APG podloga modifikovanih dodatkom tri korastvarača/potencijalna penetraciona inhensera. Biomarker praćen tokom datog *in vitro* protokola bio je redukcija žute tetrazolijum soli (MTT) do ljubičasto-plavog formazana od strane različitih enzima dehidrogenaza i drugih supstanci prisutnih u vijabilnim, metabolički aktivnim ćelijama (Stockert i sar., 2012). Stoga, prisustvo određenog iritansa rezultovaće srazmernim smanjenjem mitohondrijalne aktivnosti koje se registruje kolorimetrijski (Gibbs, 2009). Ukoliko se uzme da je prema važećim smernicama (ECVAM Skin Irritation Validation Study – Validation of the EpiSkin™ Test Method, 2009; ECVAM Document on In Vitro Methods for Skin Irritation Testing based on

Reconstructed Human Epidermis, 2009) definisana granična vrednosti relativne vijabilnosti ćelija 50 %, i osnovna APG podloga (S1) i podloge sa dodatkom izabranih korastvarača (S2 sa IPA, S3 sa propilenglikolom i S4 sa glicerolom) mogu se klasifikovati kao neiritirajuće (eng. *non-irritant*).



**Slika 4.1.19.** Vijabilnost ćelija nakon izlaganja primenjenog modela kože 0,25 %, 2,5 %, odnosno 25 % disperziji ispitivanih podloga.

Može se reći da su neželjeni efekti prouzrokovani tretmanom uzorcima S1 i S2 bili veoma slabi, tj. da nije zabeležena značajna promena u vijabilnosti ćelija (ćelijska vijabilnost bila je u opsegu od 95,3 % do 106,5 %). Iako je očekivano da će povećanje koncentracije primenjenih uzoraka dovesti do srazmernog smanjenja vijabilnosti ćelija, takva tendencija nije primećena. Štaviše, u slučaju uzoraka S1 i S2 zabeležena je nešto niža vijabilnost nakon primene 2,5 % disperzije uzorka: 95,9 % i 96,4 %, za uzorak S1 odnosno S2. Izrazito povoljni efekti ispitivanih uzoraka na ćelijsku vijabilnost *in vitro* u skladu su sa prethodno publikovanim navodima o blagoj prirodi emulgatora iz grupe alkil poliglukozida (Savic i sar., 2009; Tasic-Kostov i sar., 2011). Ipak, komparativno dobra podnošljivost APG podloge sa 10 % (m/m) IPA nije bila očekivana, a može se pripisati preovlađujućem uticaju same podloge. Podloge sa višim koncentracijama korastvarača tipa poliola (propilenglikol i glicerol dodati su osnovnoj APG podlozi u

koncentraciji od 20 % (m/m)), takođe su pokazale zadovoljavajuće rezultate. Najniža vijabilnost ćelija ( $59 \pm 5,7$  %), registrovana je nakon primene 25 %-tne disperzije APG podloge sa 20 % propilenglikola.

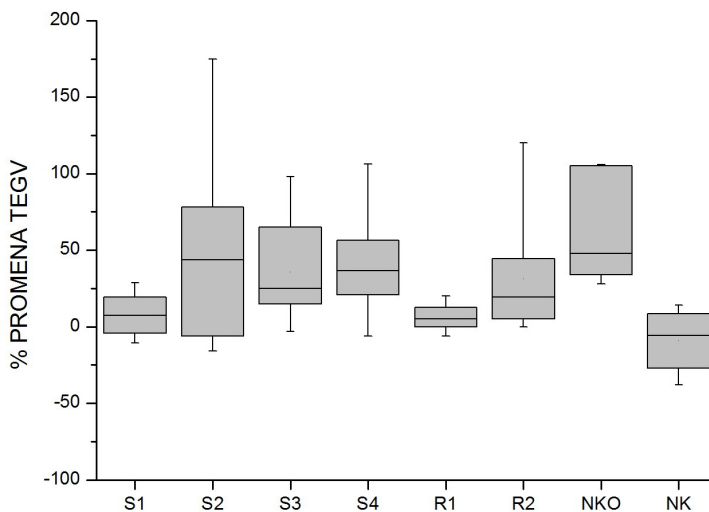
Uprkos činjenici da ćelijske modele odlikuju nešto slabije barijerne osobine u poređenju sa humanom kožom, smatra se da ispitivanje citotoksičnosti sprovedeno na ovakvim trodimenzionalnim modelima na zadovoljavajući način oponaša uslove kojima su ćelije kože izložene *in vivo* (Wiegand i Hipler, 2009). Ipak, kad god je moguće, poželjno je da *in vitro* ispitivanje iritacionog potencijala bude praćeno odgovarajućim *in vivo* ispitivanjima.

#### **4.1.9 *In vivo* procena bezbednosnog profila ispitivanih podloga**

Konačno, prva faza eksperimentalnog rada zaokružena je procenom ključnih biofizičkih parametara kože nakon primene ispitivanih podloga. Ovakva ispitivanja moraju biti integralni deo procene dermalne raspoživosti lekova, s obzirom da eventualni iritacioni potencijal može uticati na rezultate ispitivanja, posebno prilikom sprovođenja vazokonstriktornog testa. Dodatno, uticaj primenjene podloge na mehaničke osobine kože, a posebno stepen hidratacije *stratum corneum*-a (SCH), može uticati i na permeabilnost kožne barijere (Darlenski i sar., 2009).

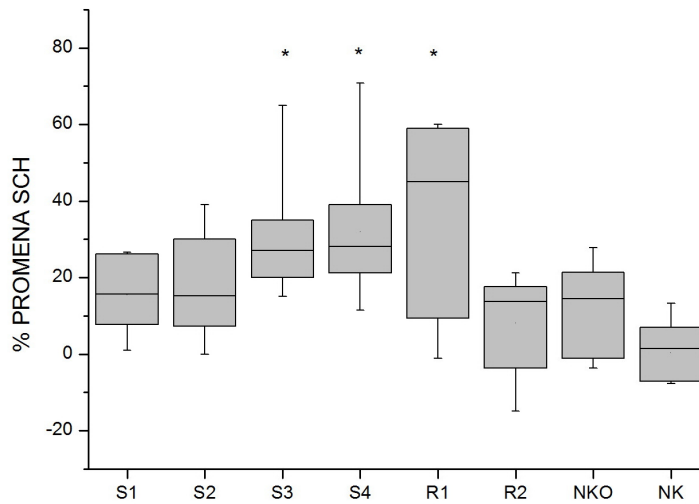
Ispitivani uzorci pokazali su generalno zadovoljavajuće bezbednosne profile nakon sprovedene 24-časovne studije pod okluzijom. Tri sata nakon uklanjanja okluzije nije bilo statistički značajne promene EI, TEGV ili pH vrednosti kože, kao osnovnih biofizičkih parametara koji bi mogli ukazati na iritacioni potencijal podloga *in vivo*. Određeni trend povećanja EI mogao se primetiti jedino u slučaju referentne podloge sa IPA (uzorak R2), verovatno kao posledica zajedničkog uticaja koloidne strukture stabilizovane konvencionalnim emulgatorima i dodatog korastvarača. Prema tome, izostanak ovakvog trenda u slučaju korespondentne APG podloge (uzorak S2) može se tumačiti blagom prirodom upotrebljenog APG emulgatora, i u skladu je sa prethodno diskutovanim rezultatima *in vitro* ispitivanja citotoksičnosti (ElMeshad i Tadros, 2011). Što se tiče vrednosti TEGV (slika 4.1.20), izvesno povećanje ovog parametra registrovano je na svim test-mestima, sa izuzetkom onog koji je ostavljen kao

netretirana kontrola (NK). Prema tome, uočeni trend porasta TEGV dobrim delom treba pripisati uticaju okluzije kože Parafilmom (Taylor i sar., 2002).



**Slika 4.1.20.** Procentne promene TEGV kao biofizičkog pokazatelja integriteta kožne barijere.

Što se tiče vrednosti SCH, svi uzorci prouzrokovali su izvesno povećanje datog parametra (slika 4.1.21). Doduše, zabeleženo povećanje može se smatrati statistički značajnim samo u slučaju APG podloga sa dodatkom poliola (propilenglikol u S3, odnosno glicerol u S4), i referentne podloge ( $p < 0,05$ ). S obzirom da je prisustvo poliola zajednički imenitelj ovih uzoraka, uočeno povećanje vlažnosti kože svakako je posledica njihovih hidrofilnih OH grupa odgovornih za higroskopsnost. Dodatno, postoje hipoteze da glicerol sprečava faznu promenu lipida SC iz tečnokristalnog u čvrsto stanje, čime se umanjuje gubitak vode iz kože i unapređuju barijerna svojstva (Fluhr i sar., 2008). Imajući u vidu prethodno diskutovane rezultate mikroskopske i reološke karakterizacije, ovo se može dovesti u vezu i sa povećanjem konzistencije APG podloga nakon dodatka ovih poliola, odnosno inherentnom matriks strukturom referentnih podloga, što verovatno doprinosi izraženijem okluzivnom efektu, pogotovo u slučaju farmakopejske podloge (prisustvo belog vazelina).



**Slika 4.1.21.** Procentne promene SCH kao biofizičkog parametra koji može uticati na permeabilnost kože.

Najizraženiji uticaj variranih korastvarača očekivan je od podloga sa dodatkom IPA, s obzirom na mogućnost da ovaj alkohol ekstrahuje fiziološke lipide ili naruši njihovo pakovanje u koži, i time potencira isušivanje kože (Hadgraft i Lane, 2005). Dobijeni rezultati generalno ukazuju na dobru kompatibilnost APG koloidne strukture sa kožom, kako osnovne podloge (S1), tako i nakon dodatka izabranih korastvarača.

## 4.2 Rezultati i diskusija II faze eksperimentalnog rada

### 4.2.1 Razvoj protokola metode sa adhezivnim trakama

Pregledom dostupnih publikacija istraživačkih grupa koje se bave problematikom *in vivo* ispitivanja dermalne raspoloživosti lekova, uočena je potreba za razvojem jednostavne, ali pouzdane i ekonomične metode koja bi uspešno zamenila skupe i dugotrajne kliničke studije, a koja bi našla rutinsku primenu u laboratoriji prosečne opremljenosti.

Pogodnost predloženih protokola testirana je na u/v emulzionim sistemima stabilizovanim APG emulgatorom i opisanim u prvoj fazi eksperimentalnog rada, uz DDA kao model lekovitu supstancu.

Nezavisno od variranih procesnih parametara, primenjen je sledeći **način izračunavanja penetracionih profila leka:**

Na osnovu izmerenih masa adhezivnih traka pre ( $m_1$ ) i posle primene ( $m_2$ ) izračunata je količina uklonjenog sloja SC:

$$m = m_2 - m_1 \quad (6)$$

Primenom jednačine 7, masa uklonjenih korneocita ( $\mu\text{g}$ ) prevodi se u debljinu uklonjenog sloja SC,  $x$  ( $\mu\text{m}$ ):

$$x = m / P \cdot \rho \quad (7)$$

pri čemu je  $P$  površina adhezivne trake izražena u  $\mu\text{m}^2$ , a  $\rho$  prihvaćena aproksimacija gustine *stratum corneum*-a ( $\rho = 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{m}^3$ ) (Hathout i sar., 2011).

Iako se primenom 12 adhezivnih traka ne može ukloniti kompletan SC, prividna debljina SC,  $L$ , može se izračunati na osnovu prvog Fikovog zakona:

$$TEGV_0 = D \cdot K \cdot \Delta C / L \quad (8)$$

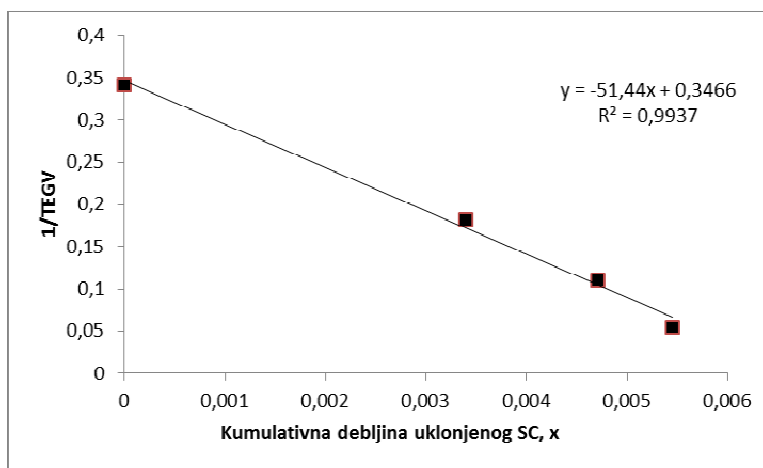
gde je  $TEGV_0$  bazalna vrednost TEGV,  $D$  difuzioni koeficijent vode,  $K$  predstavlja SC-vijabilno tkivo particioni koeficijent vode,  $\Delta C$  koncentracioni gradijent vode, a  $L$  debljina kompletnog SC. Prikazana jednačina 8 zasniva se na hipotezi da SC predstavlja homogenu barijeru za difuziju vode, i činjenici da je TEGV biofizički parametar koji najbolje opisuje barijernu funkciju kože koja počiva na epidermisu, odnosno njegovom površinskom sloju, SC (Darlenski i sar., 2009).

Čim se primenom adhezivnih traka ukloni sloj SC određene debljine ( $x$ ), vrednost TEGV raste prema jednačini 9. Kada se vrednost TEGV poveća 4-5 puta u odnosu na izmerenu bazalnu vrednost, smatra se da je dovoljno informacija dobijeno za pouzdano izračunavanje parametra  $L$  (Russel i Guy, 2009).

$$TEGV_x = D \cdot K \cdot \Delta C / L - x \quad (9)$$

Prema tome, zavisnost recipročne vrednosti izmerenog TEGV i debljine uklonjenog SC,  $x$ , može se jasnije uočiti transformacijom prethodne jednačine u jednačinu 10 i odgovarajućim grafičkim prikazom (slika 4.2.1):

$$1/TEGV_x = L / D \cdot K \cdot \Delta C - (1 / D \cdot K \cdot \Delta C) \cdot x \quad (10)$$



**Slika 4.2.1.** Grafički prikaz izračunavanja debljine celokupnog SC linearnom regresijom zavisnosti recipročne vrednosti TEGV od kumulativne debljine uklonjenog SC.

Linearnom regresijom prikazanih rezultata može se uz zadovoljavajući koeficijent determinacije ( $R^2$ ), odnosno koeficijent korelacije  $R > 0,99$ , izračunati



ukupna debljina SC,  $L$ . Pri vrednosti  $1/TEGV = 0$  proizilazi da je  $x = L$  (odsečak na  $x$ -osi). Izračunavanjem količnika debljine uklonjenih slojeva SC ( $x_i$ ) i dobijene ukupne debljine SC,  $L$ , dobija se takozvana **normalizovana (standardizovana) vrednost debljine uklonjenog sloja SC ( $x_i/L$ )**. Imajući u vidu da debljina intaktnog SC volarne strane podlaktica može varirati od 5 do 20  $\mu\text{m}$  kod zdravih osoba (Au i sar., 2010), ovim putem omogućeno je poređenje rezultata dobijenih na različitim ispitanicima, u cilju umanjenja uticaja inter-, ali i intra-individualnih varijacija.

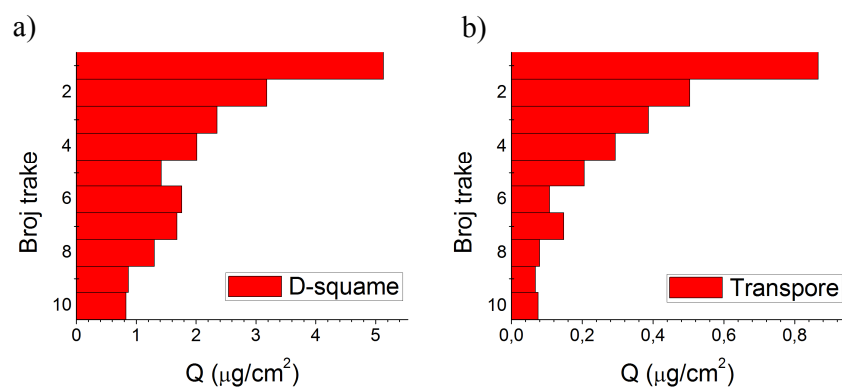
Rezultati dobijeni opisanom UPLC-MS metodom dobijaju se u vidu koncentracije lekovite supstance ( $\mu\text{g}$  leka po ml eluata) i moraju se korigovati zapreminom primenjenog rastvarača (5 ml etanola) i podeliti površinom primenjene adhezivne trake kako bi se konačno izrazili u vidu srednje vrednosti kumulativne količine penetriranog leka (u  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

Konačno, obrađeni rezultati se grafički mogu prikazati kao zavisnost penetriranog leka od relativne (standardizovane) debljine uklonjenog sloja SC ( $x/L$ ).

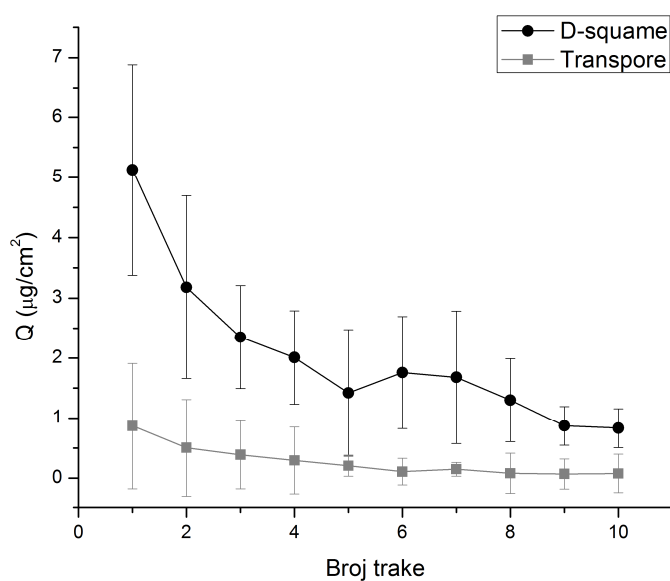
U fazi razvoja TS metode, varirani su određeni procesni parametri u fazi primene uzoraka i u fazi ekstrakcije lekovite supstance sa primenjenih traka.

### **Ispitivanje pogodnosti primene D-squame i Transpore adhezivnih traka:**

Penetracioni profili (predstavljeni kao količina DDA po jedinici površine tretiranog SC) dobijeni primenom obe vrste traka pokazuju očekivani trend opadanja količina DDA kako se ide ka dubljim slojevima kožne barijere (slika 4.2.2). Međutim, uočena je statistički značajna razlika (Kruskal-Wallis test,  $p < 0,05$ ) u količinama DDA ekstrahovanim primenom različitih vrsta traka. Naime, značajno veće količine DDA dobijene su primenom D-squame traka (slika 4.2.3).

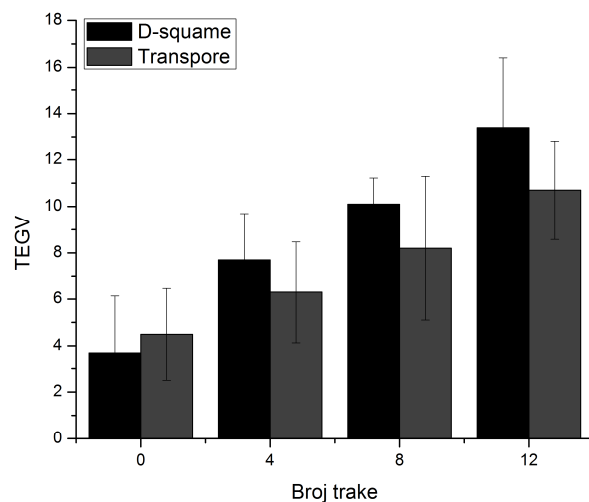


**Slika 4.2.2.** Penetracioni profil DDA dobijen primenom: **a)** D-Squame<sup>®</sup> traka, odnosno **b)** primenom Transpore<sup>™</sup> traka.



**Slika 4.2.3.** Komparativni prikaz penetracionih profila DDA primenom ispitivanih traka (n=6, srednja vrednost ± SD)

Merenjem TEGV uočeno je da se vrednost ovog biofizičkog parametra povećava sa uklanjanjem većeg broja traka, što govori o sukcesivnom narušavanju integriteta kožne barijere, odnosno dodatni je pokazatelj efikasnosti primenjenih adhezivnih traka. Na slici 4.2.4. prikazana je prosečna vrednost TEGV svih 6 ispitanika, inicijalno i nakon uklanjanja navedenog broja traka. Može se uočiti da primena D-squame<sup>®</sup> traka uslovljava više vrednosti TEGV, što se može povezati sa činjenicom da je komparativna gravimetrijska analiza traka pokazala da se ovim trakama uklanjaju deblji slojevi SC u poređenju sa Transpore<sup>™</sup> trakama.



**Slika 4.2.4.** Komparativni prikaz efikasnosti poređenih adhezivnih traka - TEGV kao parametar narušavanja integriteta SC: 0 - bazalna vrednost, nakon 4., 8. i 12. uklonjene trake (n=6; ± SD).

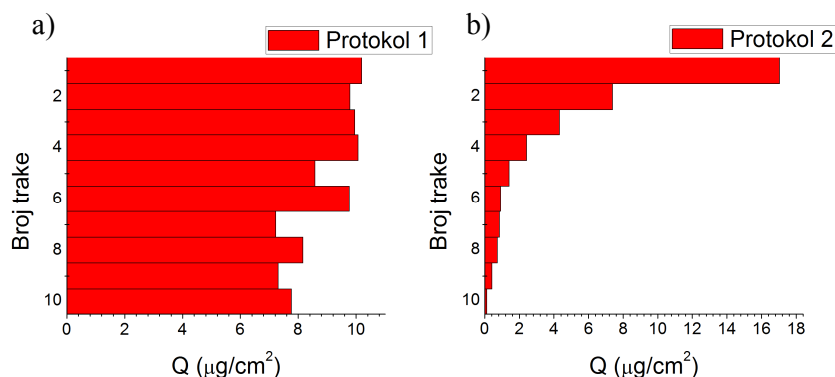
Različite količine DDA ekstrahovane iz D-Squame<sup>®</sup> i Transpore<sup>™</sup> traka mogu se objasniti različitom jačinom adheziva, kojim se, stoga, uklanjaju slojevi SC različite debljine. S druge strane, činjenica da je Transpore<sup>™</sup> traka dostupna u vidu rolne koja se pre primene seče na željene dimenzije komplikuje manipulaciju tokom rada, dovodi u pitanje ujednačenost površina isečenih traka, preciznost podataka dobijenih merenjem traka, kao i mogućnost kontaminacije traka korneocitima istraživača prilikom sečenja traka. Iz navedenih razloga, u narednim ispitivanjima korišćene su D-Squame<sup>®</sup> trake, s obzirom da su izloženi rezultati pokazali da ih odlikuju bolja adhezivna svojstva, jednostavnost primene, manja mogućnost kontaminacije tokom rada, definisana površina traka, a time i veća pouzdanost dobijenih rezultata.

### **Ispitivanje protokola ekstrakcije**

U cilju pouzdanog određivanja lekovite supstance pogodnom analitičkom metodom, uočen je poseban značaj definisanja preciznog protokola ekstrakcije lekovite supstance sa traka, s obzirom da proces određivanja može biti podložan različitim interferencijama poreklom od adheziva primenjene trake i/ili proteina uklonjenog SC. Varirano je nekoliko procesnih parametara sa ciljem da se definiše efikasan, ali i racionalan protokol ekstrakcije. Iz nekoliko testiranih kombinacija vremena sonifikacije (5-15 min) i uključivanja koraka centrifugiranja eluata (5 min pri 4000 obrt/min),

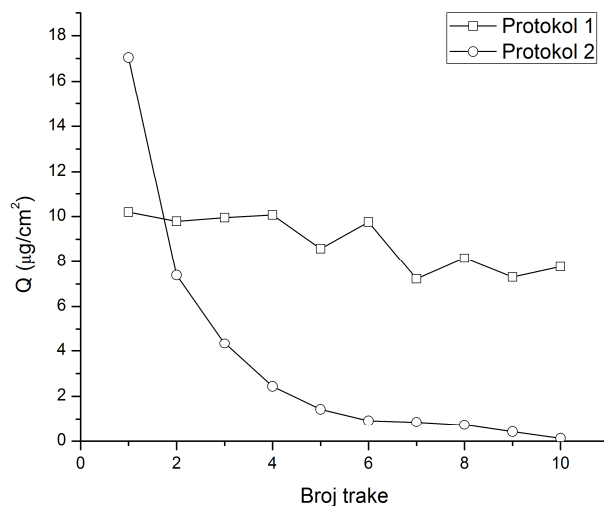
izdvojene su dve, u daljem tekstu označene kao *Protokol 1* (15 min izlaganja eluata ultrazvuku) i *Protokol 2* (15 min sonifikacije i 5 min centrifugiranja).

Penetracioni profili variranih protokola ekstrakcije predstavljani su kao količina DDA po jedinici površine tretiranog SC. Kao što je i očekivano, sadržaj DDA najveći je u eluatima dobijenim ekstrakcijom površinskih slojeva SC, kod oba seta eksperimentalnih uslova. Ipak, penetracioni profil dobijen Protokolom 1, pokazuje značajnu nehomogenost i malu razliku u sadržaju DDA od površinskih do dubljih slojeva SC (slika 4.2.5.a). S druge strane, primenom eksperimentalnih uslova označenih kao Protokol 2 (uključuje korak centrifugiranja eluata), dobijen je penetracioni profil (slika 4.2.5.b), koji je u skladu sa komparabilnim profilima već objavljenih studija, i samom prirodom SC kao osnovne barijere za perkutanu resorpciju lekova.



**Slika 4.2.5.** Penetracioni profil DDA dobijen: **a)** Protokolom ekstrakcije 1, odnosno **b)** Protokolom 2.

Razlika u dobijenim profilima (slika 4.2.6) može se dovesti u vezu sa značajem centrifugiranja eluata kao izostavljenog koraka tokom postupka ekstrakcije lekovite supstance iz traka opisanog kao Protokol 1, i sedimentiranja proteinske frakcije (fragmenata korneocita), koja očigledno, u datoj koncentraciji, značajno interferira tokom određivanja količine lekovite supstance primenjenom analitičkom metodom. Ne treba zanemariti ni značaj sonifikacije traka, kojim se obezbeđuje brza i efikasna ekstrakcija u relativno ekonomičnom medijumu (etanol, 70% V/V). Ovaj korak protokola doprineo je značajnom skraćanju trajanja celokupnog ispitivanja, s obzirom da su protokoli primenjivani od strane određenih istraživača uključivali faze ekstrakcije u trajanju od čak 16 h, u rastvaračima poput acetonitrila (Puglia i sar., 2010).



**Slika 4.2.6.** Komparativan prikaz profila DDA dobijenih primenom variranih protokola ekstrakcije.

Kako je pokazano da se Protokolom 2 dobijaju čistiji eluati, a time i pouzdaniji i precizniji rezultati za dalje ispitivanje, korišćen je taj set eksperimentalnih uslova u narednoj fazi, za ispitivanje dermalne raspoloživosti aktivnih uzoraka iz prve faze eksperimentalnog rada.

Takođe, prikazani rezultati ukazuju da se TS metoda predloženog protokola može koristiti za ispitivanje hidrofilnih kremova, kao farmaceutskih oblika realno kompleksne strukture. Centrifugiranje eluata treba uključiti tokom postupka ekstrakcije lekovite supstance iz traka, radi sedimentiranja proteinske frakcije, koja očigledno značajno interferira tokom određivanja koncentracije leka datom analitičkom metodom.

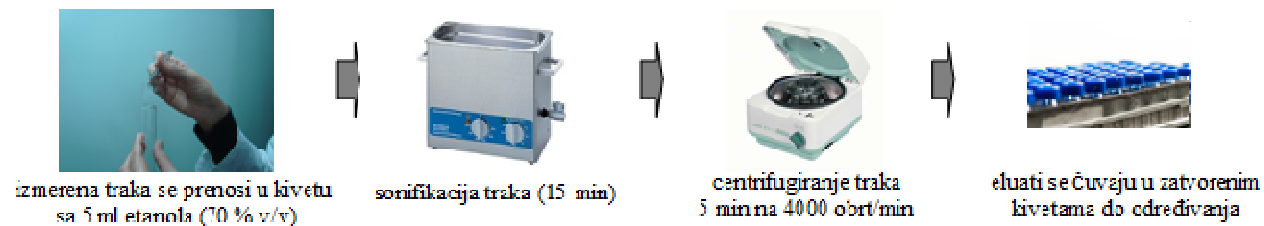
#### **4.2.2 Ispitivanje potencijala primene metode sa adhezivnim trakama razvijenog protokola**

Na osnovu dobijenih rezultata, u narednim ispitivanjima primenjena je metoda sa adhezivnim trakama praćena Protokolom ekstrakcije 2 (kombinacija sonifikacije i centrifugiranja traka u etanolu, 70% V/V kao pogodnom rastvaraču), za ispitivanje penetracionih profila uzoraka opisanih u okviru prve faze eksperimentalnog rada sa DDA i K kao model lekovitim supstancama. Na taj način proceniće se da li je metoda dovoljno diskriminatorsna da ukaže na razlike u efikasnosti uzoraka istog

### FAZA I: Nanošenje i uklanjanje traka



### FAZA II: Ekstrakcija lekovite supstance

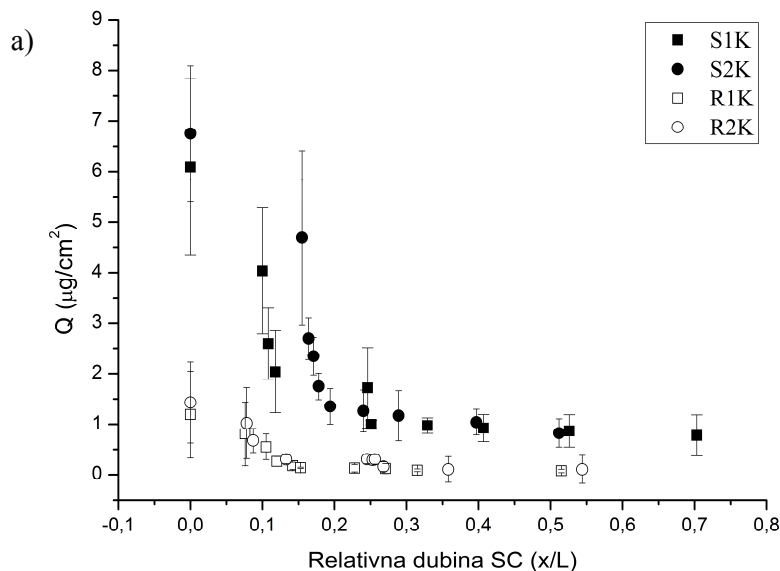


### FAZA III: Određivanje lekovite supstance odgovarajućom UHPLC/MS/MS metodom

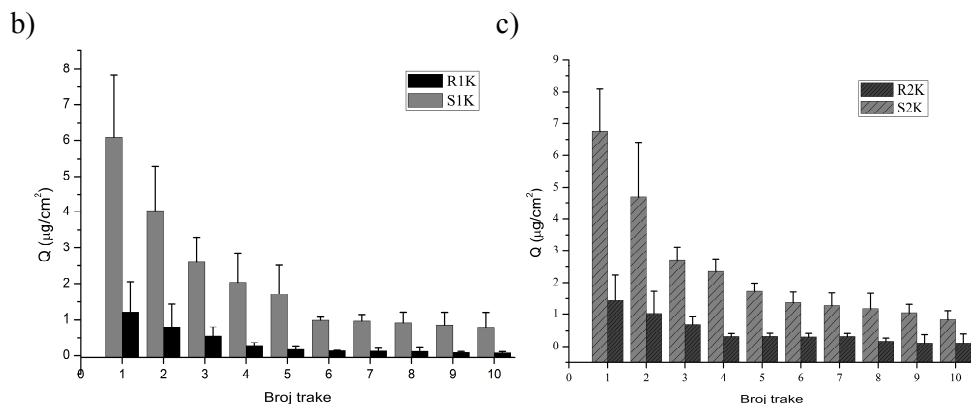
*Slika 4.2.7.* Dijagram toka metode sa adhezivnim trakama predloženog protokola.

tipa/farmaceutskog oblika (hidrofilni kremovi), koji se razlikuju u koloidnim strukturama (APG vs. referentni uzorci) ili variranim korastvaračima (izopropanol, propilenglikol i glicerol). Vizuelni prikaz sprovedene metode dat je na slici 4.2.7.

Stepen isporuke ketoprofena iz primenjene podloge u SC značajno je veći iz svih APG uzoraka u poređenju sa referentnim. S obzirom da između ispitivanih APG uzoraka nije bilo statističke razlike u dobijenim penetracionim profilima, na slici 4.2.8. su zbog bolje preglednosti prikazani profili model i referentnih podloga sa i bez dodatka IPA. Uočena razlika u dermalnoj raspoloživosti ketoprofena iz APG uzoraka u poređenju sa referentnim može se objasniti očiglednim uticajem sastava podloge, tj. specifičnostima koloidne strukture ispitanih uzoraka na koje je ukazala prva faza eksperimentalnog rada. Ipak, prikazani penetracioni profili se ne mogu lako dovesti u vezu sa dobijenim  $C_s$  vrednostima. S obzirom da je jedna od prednosti *in vivo* studija ta da se sprovode u uslovima koji oslikavaju realne uslove primene, ne smeju se zanemariti promene u sastavu uzorka koje mogu nastati u periodu između nanošenja uzorka i započinjanja ispitivanja. U slučaju uzoraka sa lako isparljivim komponentama, njihovo isparavanje sa kože moglo bi dovesti do superzasićenja/supersaturacije leka, i sledstvene promene termodinamičke aktivnosti (Hadgraft i Lane, 2005). Iako se ovaj fenomen mogao očekivati u slučaju uzorka S2K, dodata količina IPA (10 % m/m) očigledno nije bila dovoljna da razlika između penetracionih profila APG uzorka bez (S1K) i sa IPA (S2K) bude statistički značajna.



Slika 4.2.8. (legenda na sledećoj strani)

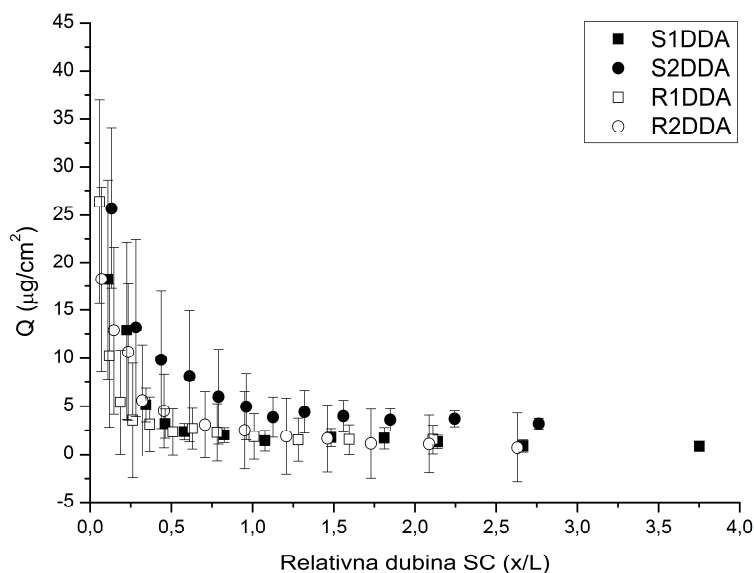


**Slika 4.2.8.** Penetracioni profili ketoprofena iz model i referentnih podloga kao odraz uticaja koloidne prirode primenjene podloge na dermalnu raspoloživost leka *in vivo*: **a)** komparativni prikaz penetracionih profila ketoprofena kroz SC (srednja vrednost  $\pm$  SD,  $n = 6$ ); Koncentracija ketoprofena ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) u različitim slojevima kože: **b)** S1K vs. R1K, i **c)** S2K vs. R2K.

Generalno je prihvaćeno da je uklanjanje debljih slojeva SC adhezivnim trakama znak slabije kohezivnosti ćelija SC (Darlenski i sar., 2009). Nasuprot očekivanom, ovo nije bio slučaj sa uzorcima sa dodatkom IPA, s obzirom da su sa test-mesta tretiranih uzorkom S2K uklanjani nešto tanji slojevi korneocita (izračunato jednačinom 7) u poređenju sa uzorkom S1K, naročito kada je reč o prve tri adhezivne trake. Nakon 2 h izloženosti kože uzorcima, koncentracije leka ekstrahovane sa poslednje 12. trake bile su  $0,78 \pm 0,40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  u slučaju uzorka S1K, odnosno  $0,83 \pm 0,28 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  za uzorak S2K.

U slučaju DDA kao model lekovite supstance, zavisnost kumulativne količine penetriranog leka od dostignute relativne dubine SC iz ispitivanih uzoraka prikazana je na slici 4.2.9. Statističkom analizom potvrđeno je da je u slučaju ove model lekovite supstance dodatak IPA u APG-stabilizovane podloge doveo do značajnog povećanja penetracije leka u poređenju sa drugim model i referentnim uzorcima. Formulacija S2DDA rezultovala je u većim nivoima leka u svim slojevima SC (npr. 3,19 i  $0,83 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  DDA ekstrahovano je iz poslednje 12. trake u slučaju uzorka S2DDA, odnosno S1DDA), što ukazuje da IPA kao penetracioni inhenser, zajedno sa specifičnom koloidnom strukturom podloga stabilizovanih APG emulgatorom, dovodi do povećanja stepena isporuke DDA kao model lekovite supstance. Ipak, isto se ne može reći i za brzinu penetracije DDA, s obzirom da je APG uzorak bez IPA (S1DDA) uslovio dublju penetraciju model leka.





**Slika 4.2.9.** *In vivo* dermalna raspoloživost DDA procenjena primenom TS metode predstavljena kao zavisnost kumulativne količine penetriranog leka ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i relativne dubine SC; izražena kao srednja vrednost  $\pm$  SD,  $n = 6$ .

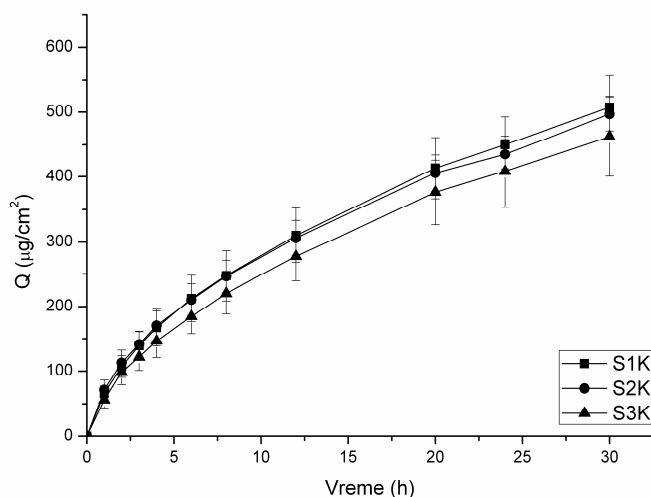
Imajući u vidu prethodno izložene rezultate uzoraka sa ketoprofenom kao model lekovitim supstancom, naizgled male razlike u dobijenim penetracionim profilima DDA iz različitih uzoraka ne treba tumačiti eventualnom slabošću same metode da ukaže na suptilne razlike među uzorcima, već u inherentnim karakteristikama DDA kao primenjene model lekovite supstance. Naime, dietilamin ( $\text{DA}^+$ ) so diklofenaka ( $\text{D}^-$ ) nekada se opisuje kao haotropna/kaotropna (eng. *chaotropic*) supstanca, tj. ona koja aktivno interaguje sa formiranim strukturama unutar emulzionog sistema (Yariv i sar., 2010), što može imati značajan uticaj na tečnokristalne mezofaze u slučaju ispitivanih APG podloga. S obzirom da molekuli poput DDA imaju tendenciju da se infiltriraju u međusloju i interaguju sa polarnim ostacima lipida, ovakve lek-podloga interakcije nekada mogu usporiti njihovu isporuku. Time se može objasniti sličan stepen penetracije DDA iz referentnih i većine APG uzoraka. Međutim, dodatak IPA kao penetracionog inhensera u APG-stabilizovanu podlogu uspeo je da osigura poboljšanu penetraciju leka *in vivo*. Ovo se može dovesti u vezu sa sposobnošću IPA da utiče na 'pakovanje' molekula surfaktanta u međusloju, što je prethodno uočeno prilikom mikroskopske analize uzoraka.

### 4.2.3 Komparativno *in vitro/ex vivo* ispitivanje permeacionih profila primenom Franz-ovih difuzionih ćelija

U cilju objektivnog sagledavanja rezultata dobijenih prethodnom *in vivo* metodom, sprovedena su odgovarajuća ispitivanja primenom Franz-ovih difuzionih ćelija kao preporučenom metodom za ispitivanje permeacije lekova polučvrste konzistencije koji se primenjuju na koži.

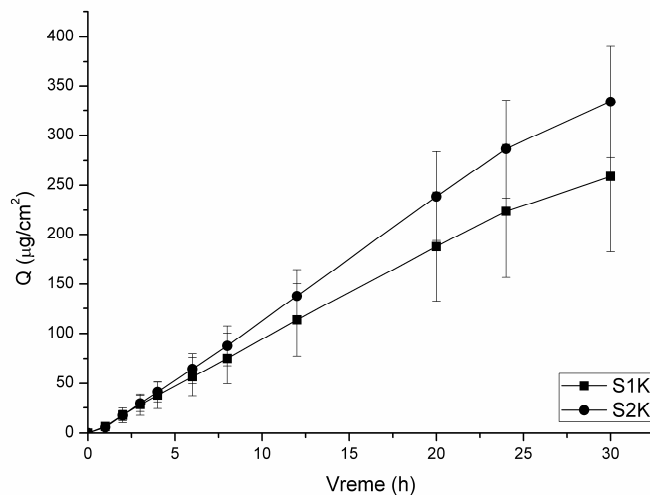
Kao što je bilo očekivano, primena ASC kao model membrana za Franz-ove difuzione ćelije rezultovala je značajno višim nivoima obe model lekovite supstance, u poređenju sa izolovanim humanim SC (iSC). Štaviše, u pojedinim slučajevima primenom ASC zabeležena je 3-4 puta veća permeacija u poređenju sa odgovarajućim rezultatima nakon primene iSC. Ovo je poznati nedostatak ASC, s obzirom da ovi konstrukti relativno lako podležu hiperhidrataciji tokom samog eksperimenta (Levintova i sar., 2011).

*In vitro* ispitivanje permeacionih profila ketoprofena kroz ASC (slika 4.2.10) nije uspelo da ukaže na značajnu razliku u efikasnosti osnovnog APG uzorka (S1K) i odgovarajućeg uzorka sa IPA (S2K). S druge strane, iako uzorak sa dodatkom propilenglikola (S3K) odlikuje nešto niži profil permeacije, uočena razlika nije statistički značajna ( $p = 0,913$ ).



**Slika 4.2.10.** Kumulativna količina ketoprofena koji je permeirao kroz ASC po jedinici površine, u funkciji vremena (srednja vrednost  $\pm$  SD,  $n = 6$ ).

Kao što je bilo očekivano, količina leka koji je permeirao kroz ASC bila je skoro dvostruko veća od one dobijene studijom permeacije kroz izolovani humani SC. Iz tog razloga, u cilju objektivnijeg poređenja, komparirani su odgovarajući koeficijenti permeacije. Može se reći da su vrednosti ovog parametra za uzorke S1K i S2K bili u saglasnosti:  $7,91 \pm 0,78$  i  $7,52 \pm 0,18$  za ASC kao model membranu, odnosno  $6,13 \pm 1,72$  i  $8,24 \pm 1,24$  [ $\cdot 10^{-6}$  cm/s], u slučaju izolovanog humanog SC. Kako se izolovani humani SC ipak smatra biološki relevantnijim modelom, uočeni trend poboljšanja permeacije leka iz uzorka S2K može se objasniti uticajem isparavanja IPA na termodinamičku aktivnost leka prilikom duže primene (poboljšanje se može uočiti počev od 8. sata ispitivanja). Ovo se može dovesti u vezu sa izračunatim  $C_s$  vrednostima datih uzoraka, s obzirom da je  $C_s$  ketoprofena u APG-podlozi sa IPA ( $C_{sS2K} = 5,05 \cdot 10^{-4}$  g/ml) trostruko veći od odgovarajućeg uzorka bez ovog korastvarača ( $C_{sS1K} = 1,66 \cdot 10^{-4}$  g/ml).



**Slika 4.2.11.** Kumulativna količina ketoprofena koji je permeirao kroz izolovani SC po jedinici površine, u funkciji vremena (srednja vrednost  $\pm$  SD,  $n = 4$ ).

U literaturi postoje podaci da pri dužem vremenu ispitivanja permeacije ( $t > 9$  h) sistema stabilizovanih fazama lamelarnih tečnih kristala, može doći do tranzicije lamelarne u odgovarajuću heksagonalnu fazu usled apsorpcije vode iz akceptorskog medijuma (Hosmer i sar., 2011). Iako se upravo od 8. časa ispitivanja uočava određena

razlika u profilima permeacije ketoprofena kroz iSC, malo je verovatno da se ovaj fenomen dogodio samo u slučaju jednog APG uzorka.

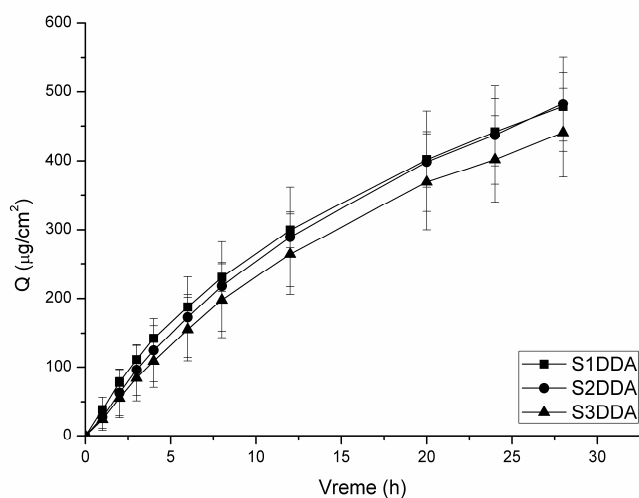
**Tabela 4.2.1.** Parametri dobijeni *in vitro* ispitivanjem permeacije ketoprofena kroz različite membrane: veštački konstrukti kože (ASC) i humani SC izolovan primenom enzima.

Uzorak	Parametri permeacije kroz ASC		Parametri permeacije kroz izolovani SC	
	Koeficijent permeacije $10^{-6} / \text{cm}^2 \text{ s} \pm \text{SD}$	$Q_{30h}^a$ $\mu\text{g cm}^{-2} \pm \text{SD}$	Koeficijent permeacije $10^{-6} / \text{cm}^2 \text{ s} \pm \text{SD}$	$Q_{30h}^a$ $\mu\text{g cm}^{-2} \pm \text{SD}$
S1K	7,91 ± 0,78	507,52 ± 49,79	6,13 ± 1,72	258,81 ± 75,92
S2K	7,52 ± 0,18	497,17 ± 25,80	8,24 ± 1,24	334,26 ± 56,24
S3K	7,35 ± 1,05	462,85 ± 61,87		

<sup>a</sup> Količina ketoprofena koja je permeirala kroz ASC (n = 6) i izolovani SC (n = 4) nakon 30 h; srednja vrednost ± SD.

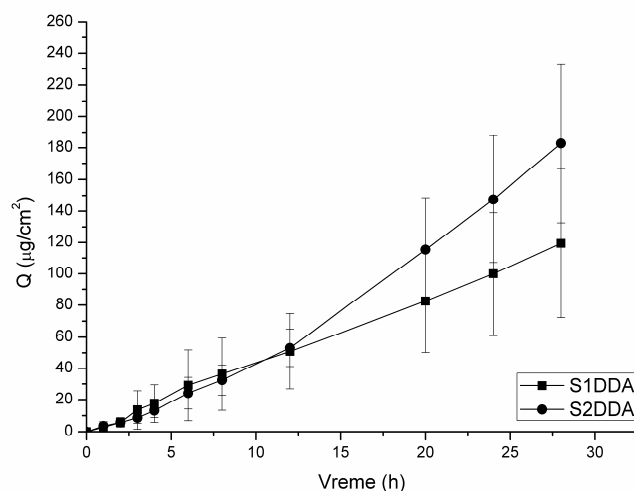
Imajući u vidu rezultate dobijene *in vivo* primenom razvijene TS metode, može se reći da su u korelaciji sa rezultatima *in vitro/ex vivo* ispitivanja. Naime, metode nisu ukazale na statistički značajnu razliku između raspoloživosti ketoprofena iz ispitivanih APG uzoraka. Trend poboljšanja penetracije ketoprofena iz APG uzorka sa IPA (S2K) koji je zabeležen *ex vivo* pristupom nakon 8. sata ispitivanja svakako nije mogao biti registrovan TS metodom, s obzirom da je dizajnom studije predviđeno da koža ispitanika bude 2 h u kontaktu sa uzorcima.

I u slučaju DDA kao model lekovite supstance, primena ASC rezultovala je značajno višim kumulativnim količinama permeiranog leka u poređenju sa izolovanim SC. Štaviše, u slučaju uzorka S1DDA, četverostruko veća permeacija je zabeležena (tabela 4.2.2). Permeaciona studija kroz ASC (slika 4.2.12) ukazala je na nešto niži stepen permeacije DDA iz APG podloge sa propilenglikolom (S3DDA), dok se permeacioni profili koji potiču od uzoraka S1DDA i S2DDA skoro preklapaju ( $p > 0,05$ ).



**Slika 4.2.12.** Uporedni prikaz permeacionih profila DDA iz model APG podloga u cilju procene uticaja IPA i PG kao potencijalnih inhensera *in vitro* kroz veštačke konstrukte kože (ASC). Podaci su prikazani kao srednje vrednosti  $n = 6$  ponavljanja  $\pm$  SD.

Nasuprot tome, ispitivanje permeacije kroz izolovani SC kao membranu uspeo je da ukaže na razlike između APG uzoraka sa (S2DDA) i bez dodatka IPA (S1DDA), što navodi na zaključak da tokom *in vitro* ispitivanja, kad god je moguće, treba koristiti membrane što sličnijih barijernih svojstava humanoj koži. Iako se i rezultati statističke značajnosti  $p > 0,05$  nekada mogu prihvatiti kao značajni kada je reč o tzv. *ex vivo* studijama usled velike inherentne varijabilnosti (Lau i sar., 2010), u ovom slučaju zabeleženo povećanje permeabilnosti DDA počevši od 13. sata eksperimenta (slika 4.2.13), ne može se smatrati statistički značajnim. Međutim, slično prethodno izloženim rezultatima kod ketoprofena kao model lekovite supstance, dobijeni koeficijenti permeacije:  $6,87 \pm 3,39$  i  $12,64 \pm 3,57 \cdot 10^{-6} / \text{cm}^2 \text{ s}$ , za S1DDA odnosno S2DDA, govore da se od APG-stabilizovane podloge sa IPA može očekivati poboljšana permeacija lekovitih supstanci, tokom duže primene.



**Slika 4.2.13.** Uporedni prikaz permeacionih profila DDA iz model APG podloga sa i bez dodatka IPA *ex vivo* kroz izolovani humani *stratum corneum* (iSC). Podaci su prikazani kao srednje vrednosti  $n = 4$  ponavljanja  $\pm$  SD.

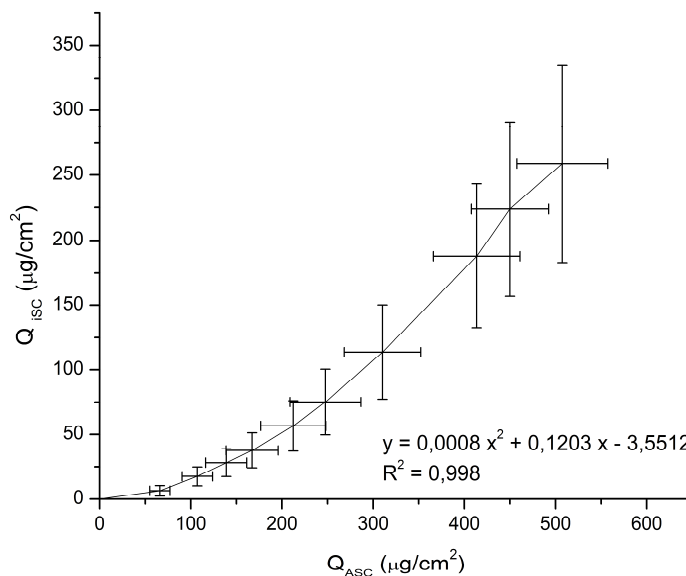
**Tabela 4.2.2.** Parametri dobijeni *in vitro* ispitivanjem permeacije DDA kroz različite membrane: veštački konstrukti kože (ASC) i humani SC izolovan primenom enzima.

Uzorak	Parametri permeacije kroz ASC		Parametri permeacije kroz izolovani SC	
	Koeficijent permeacije $10^{-6} / \text{cm}^2 \text{ s} \pm \text{SD}$	$Q_{28h}^a$ $\mu\text{g cm}^{-2} \pm \text{SD}$	Koeficijent permeacije $10^{-6} / \text{cm}^2 \text{ s} \pm \text{SD}$	$Q_{28h}^a$ $\mu\text{g cm}^{-2} \pm \text{SD}$
S1DDA	$20,57 \pm 3,86$	$477,89 \pm 49,46$	$6,87 \pm 3,39$	$119,41 \pm 47,26$
S2DDA	$21,79 \pm 1,76$	$482,16 \pm 68,42$	$12,64 \pm 3,57$	$182,81 \pm 50,29$
S3DDA	$20,16 \pm 1,84$	$440,83 \pm 64,18$		

<sup>a</sup> Količina DDA koja je permeirala kroz ASC ( $n = 6$ ) i izolovani SC ( $n = 4$ ) nakon 28 h; srednja vrednost  $\pm$  SD.

Korelaciona analiza permeacionih profila ketoprofena dobijenih primenom Franz-ovih difuzionih ćelija kroz dva različita tipa membrane, ukazala je da njihov odnos najbolje opisuje matematički model prikazan na slici 4.2.14, uz veoma visoki koeficijent determinacije ( $R^2 > 0,99$ ). Iako su Watkinson i sar. (2011) čak uspeli da ukažu na postojanje linearne korelacije između rezultata permeacije ibuprofena kroz određene sintetske i biološke membrane (silikonske membrane i koža pune debljine

dobijena nakon estetske hirurgije), opisana studija je sprovedena na jednostavnim binarnim i ternarnim sistemima. Budući da su u ovom radu ispitivani uzorci realno kompleksne strukture, gde svaki od sastojaka potencijalno može doprineti isporuci leka kroz kožu, nije bilo realno očekivati da linearna regresiona analiza bude zadovoljena.



**Slika 4.2.14.** Korelacija *in vitro* (ASC) i *ex vivo* (iSC) permeacionih profila dobijenih primenom Franz-ovih difuzionih ćelija.

Imajući u vidu informacije koje je pružilo *in vivo* ispitivanje metodom sa adhezivnim trakama, može se reći da je razvijena TS metoda dovoljno diskriminativna da ukaže na razlike u dermalnoj raspoloživosti model lekovitih supstanci. Uporedom analizom *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* pristupa, jasno se vidi da se primenom biološki sličnijih membrana povećava pouzdanost dobijenih rezultata. S obzirom da izloženost membrana vodenom medijumu tokom *in vitro/ex vivo* studija (protokol od 28-30 h) može da promeni karakteristike membrane i utiče na rezultate permeacije (Dias i sar., 2007), TS tehnika poseduje očigledne prednosti kao *in vivo* metoda čiji se protokol zasniva na realnim uslovima primene lekova. Iako su sprovedene *in vitro/ex vivo* metode koncipirane tako da, uslovno rečeno, pružaju podatke o permeaciji lekova kroz kožu, a TS tehnika o penetraciji, tj. distribuciji leka kroz slojeve SC, dodatna vrednost TS metode leži u mogućnosti njene primene *in vitro*, nakon studija permeacije, sa ciljem dobijanja sveobuhvatnih rezultata. Ovo može biti posebno od značaja u slučaju izrazito lipofilnih lekova. Iako se ovo svojstvo lekovite supstance smatra neophodnim za

efikasnu penetraciju kroz kožu, lekovite supstance izražene lipofilnosti (poput ketoprofena,  $\log P = 3,12$ ) u značajnoj meri ostaju u SC, a u maloj meri penetriraju do vijabilnog tkiva (Hosmer i sar., 2011). U tom slučaju metoda sa adhezivnim trakama mogla bi dati lažno pozitivne rezultate, odnosno poželjno je simultano primeniti odgovarajuću permeacionu i penetracionu studiju.



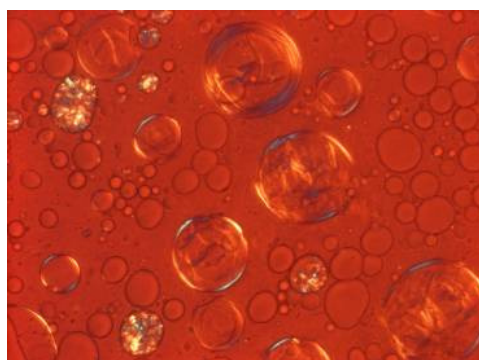
### ***4.3 Rezultati i diskusija III faze eksperimentalnog rada***

#### **4.3.1 Fizičko-hemijska karakterizacija model i referentnih uzoraka sa hidrokortizonom (HC) kao model lekovitim supstancom**

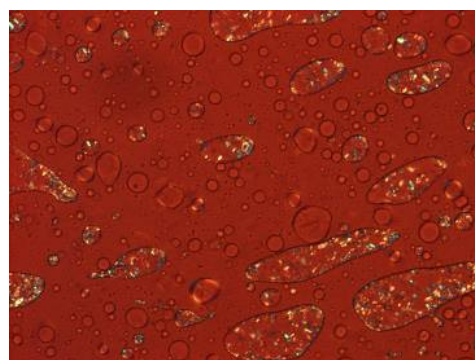
U cilju boljeg razumevanja farmakodinamskog i dermatofarmakokinetikog odgovora uzoraka sa HC, najpre je sprovedena njihova osnovna fizičko-hemijska karakterizacija. Polarizacione mikrofografije uzoraka sa HC snimljene su u cilju skrininga eventualnih interakcija model lekovite supstance sa osnovnom strukturom emulzionih sistema stabilizovanih šećernim emulgatorom, ali i radi deskriptivne procene sposobnosti ispitivanih podloga da rastvore inicijalno suspendovani lek. Na slici 4.3.1 prikazane su mikrofografije APG i odgovarajućih referentnih uzoraka sa HC, 7 dana nakon izrade. Kao i u slučaju ketoprofena i DDA kao model lekovitih supstanci, APG uzorci sa HC takođe su stabilizovani strukturama tipa lamelarnih tečnih kristala, koji se najjasnije manifestuju u vidu deformisanih Malteških krstova (Slika 4.3.1.a–d).

Uzorak sa dodatkom propilenglikola, kao tradicionalno najčešće korišćenog korastvarača za kortikosteroide, pokazao je najbolje rastvaranje inicijalno suspendovanog HC. Mikrofografije ostalih uzoraka stabilizovanih APG emulgatorom ukazale su na interesantnu distribuciju leka. U slučaju osnovnog APG uzorka (S1HC) i uzorka sa dodatkom glicerola (S4HC), kristali nerastvorenog leka su vidljivi u većoj meri. Nasuprot tome, i suprotno našoj inicijalnoj hipotezi, može se reći da kristali HC dominiraju mikrofografijama uzorka sa IPA (S2HC). Međutim, kristali leka nisu homogeno dispergovani u uzorku (kao što je slučaj sa referentnim uzorcima, slika 4.3.1.e-f), već prevashodno skoncentrisani u kapima nepravilnog oblika. S obzirom da je postupak suspendovanja lekovite supstance pažljivo sproveden, ovo se ne može pripisati nezadovoljavajućoj homogenosti uzorka. Ispitivanja u okviru prve faze eksperimentalnog rada ukazala su da se slične cilindrične strukture obrazuju kao rezultat infiltracije izopropanola u međusloju, usled toga što se IPA dodaje u pripremljeni emulzioni sistem nakon hlađenja. Iz tog razloga, u slučaju uzorka S2HC čini se da je suspendovana lekovita supstanca delimično skoncentrisana u kapima IPA, a delimično solubilizovana različitim strukturama poreklom od ispitivanog APG emulgatora (takođe primetno kod uzoraka S1HC i S4HC). Prema tome, u slučaju HC kao jedine model lekovite supstance korišćene u eksperimentalnom radu koju ne odlikuje mezogena

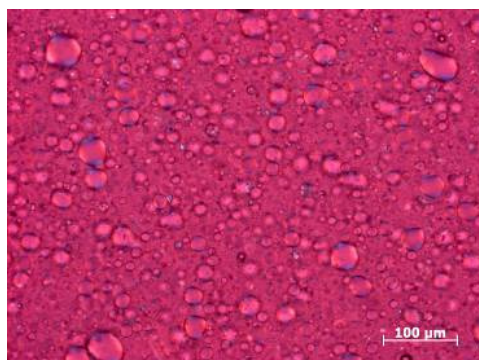
priroda, ipak dolazi do određenih interakcija sa APG podlogom. Naime, lek je značajnim delom solubilizovan različitim strukturama obrazovanim posredstvom šećernog emulgatora, zahvaljujući solubilizacionom kapacitetu obrazovanih lamelarnih struktura. Ipak, precizniji uvid u rastvorljivost HC u ispitivanim podlogama jedino mogu pružiti odgovarajuće  $C_s$  vrednosti.



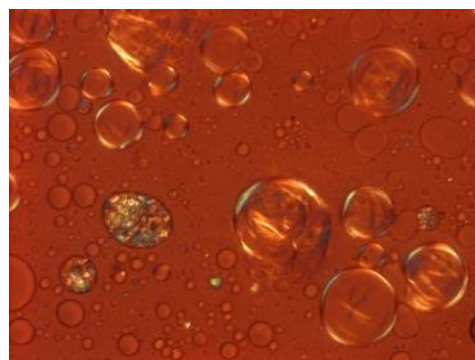
a)



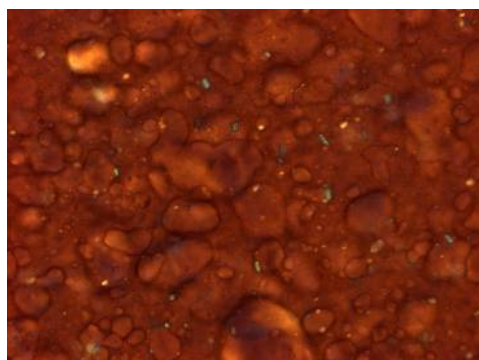
b)



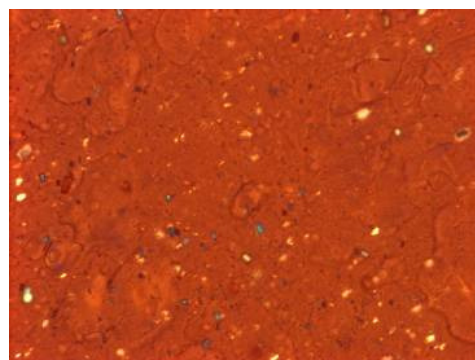
c)



d)



e)



f)

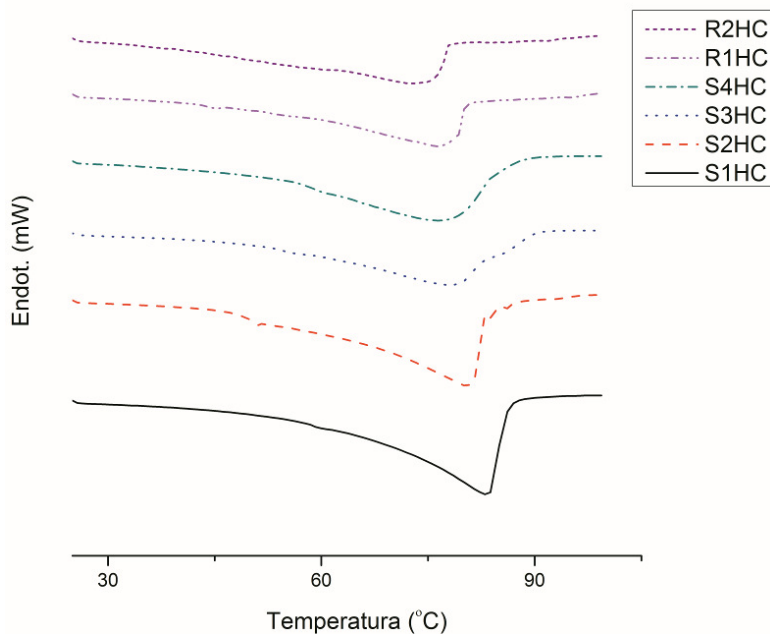
**Slika 4.3.1.** Reprezentativne polarizacione mikrografije uzoraka sa HC 7 dana nakon izrade: a) S1HC, 400×; b) S2HC, 200×; c) S3HC, 200×; d) S4HC, 400×; e) R1HC, 200×; i f) R2HC, 200×.

I u slučaju uzoraka H-serije, vrednosti pH i električne provodljivosti potvrdile su pogodnost primene ispitivanih podloga kao nosača za različite lekove namenjene za primenu na koži. Izmerene pH vrednosti uzoraka stabilizovanih APG emulgatorom bile su u opsegu od 4,84 do 5,35, a električne provodljivosti od 8,05 do 14,53  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Nasuprot tome, referentni uzorci okarakterisani su nešto nižim vrednostima ovih parametara: pH 4,30 i 4,51, električna provodljivost: 5,19 i 5,40  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , za uzorak R1HC, odnosno R2HC. Ovo je očigledan uticaj sastava referentne podloge, pre svega velikog udela belog vazelina (25 % m/m), a nižeg udela vode (oko 50 % m/m u uzorku R1HC, odnosno oko 40 % m/m u R2HC). Prilikom kontrolnih merenja nisu uočene značajne promene vrednosti pH i električne provodljivosti, što je pokazatelj zadovoljavajuće fizičko-hemijske stabilnosti uzoraka sa HC.

Za ispitivane uzorke određene su sledeće Cs vrednosti: 2,15; 1,60; 2,70; 2,20; 1,75; i 1,80 ( $\times 10^{-3}$  g/ml), za uzorke S1HC, S2HC, S3HC, S4HC, R1HC i R2HC, redom. Međutim, mikroskopska analiza je ukazala da su svi uzorci sa HC i dalje tipa suspenzije, odnosno da dodatak variranih korastvarača/ potencijalnih penetracionih inhensera nije bio dovoljan da značajno utiče na njihovu termodinamičku aktivnost, kao osnovnu pokretačku snagu za difuziju leka iz nosača (Mitriakina i Müller-Goymann, 2009; Moser i sar., 2001). U svakom slučaju, uporedna analiza dobijenih Cs vrednosti za različite podloge ukazuje da se termodinamička aktivnost HC može modifikovati izborom optimalnog korastvarača, što je od posebnog značaja prilikom izrade magistralnih lekova sa kortikosteroidima u obliku kremova.

Usled relativno male koncentracije HC u uzorcima (uobičajena terapijska koncentracija od 1 % m/m), nije očekivano da će rezultati termalne analize (DSC i TGA) biti u mogućnosti da pruže više podataka o specifičnom inkorporiranju ove model lekovite supstance u podloge stabilizovane APG emulgatorom. U prilog ovome govore i DSC termogrami prikazani na slici 4.3.2, na kojima se vidi da su krive zadržale uočene specifičnosti koje potiču od koloidnih struktura osnovnih podloga, poput dodatnih pikova karakterističnih za slabo vezan IPA unutar strukture odgovarajućih emulzionih sistema (uzorci S2HC i R2HC). S obzirom da su, analogno uzorcima sa prethodne dve model lekovite supstance, uzorci sa HC pretrpeli najveći gubitak mase u drugom

temperaturnom opsegu (tabela 4.3.1), termogravimetrijska analiza je ukazala da inkorporiranje leka nije značajno uticalo na distribuciju vode unutar emulzionih sistema.



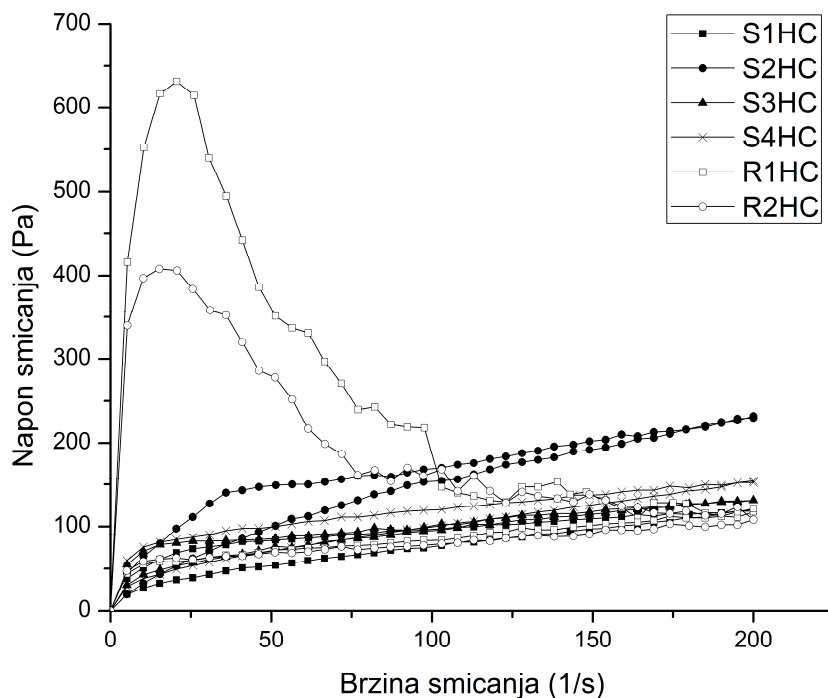
**Slika 4.3.2.** Uporedni prikaz faznih prelaza ispitivanih i referentnih uzoraka sa HC kao model lekovitom supstancom.

**Tabela 4.3.1.** Parcijalni gubitak mase prilikom TG analize tokom definisanih temperaturnih intervala.

Uzorak	Gubitak mase (%)			Rezidualna masa (%)
	30-50 °C	50-70 °C	70-110 °C	
S1HC	13,98	42,47	16,4	25,71
S2HC	12,06	56,51	3,6	26,76
S3HC	10,79	40,55	20,67	25,23
S4HC	11,63	31,75	8,61	48,48
R1HC	9,43	16,67	14,94	54,78
R2HC	16,27	26,08	4,69	51,96

Slično uzorcima K- i D-serije, i uzorke sa HC karakteriše pseudoplastični tip tečenja sa tiksotropijom. Iako je dodatak IPA i glicerola doveo do malog povećanja viskoziteta APG uzoraka, prikazane krive tečenja (slika 4.3.3) potvrđuju da nema

značajnih promena ponašanja uzoraka stabilizovanih APG emulgatorom tokom sprovedenih kontinualnih merenja.



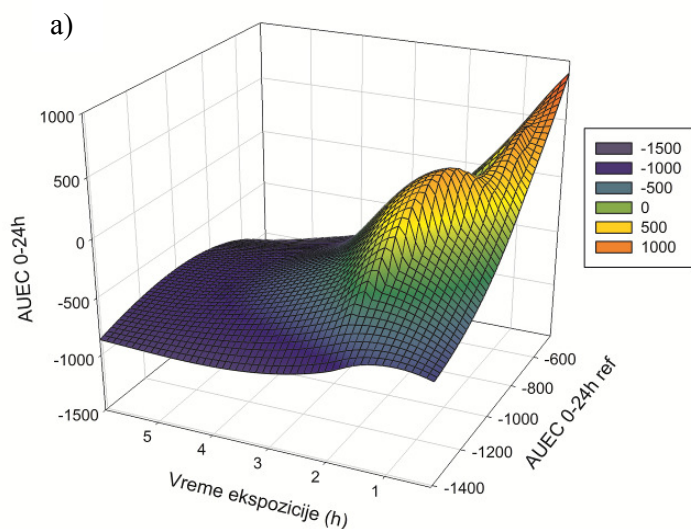
*Slika 4.3.3.* Krive tečenja uzoraka sa HC ispitane inicijalno (7 dana nakon izrade).

Što se tiče reograma referentnih uzoraka, može se primetiti da dodatak IPA dovodi do smanjenja histerezne površine, što se može pripisati uticaju ovog korastvarača na rastečnjavanje sistema. Kada se uporedi sa odgovarajućim APG uzorkom (S2HC), može se pretpostaviti da strukture koje obrazuje ispitivani emulgator prirodnog porekla poseduju veću sposobnost inkorporiranja ovog korastvarača, u poređenju sa matriks strukturom koja dominira referentnom farmakopejskom podlogom. Kao što je i očekivano, krive zavisnosti napona smicanja od brzine smicanja nakon 6 meseci čuvanja na sobnoj temperaturi, blago su pomerene ka višim vrednostima, što ukazuje na vremenski zavisno strukturiranje ovih sistema. Može se reći da su kontinualna reološka merenja sprovedena u ispitivanom periodu još jednom ukazala na zadovoljavajuću fizičko-hemijsku stabilnost APG uzoraka.

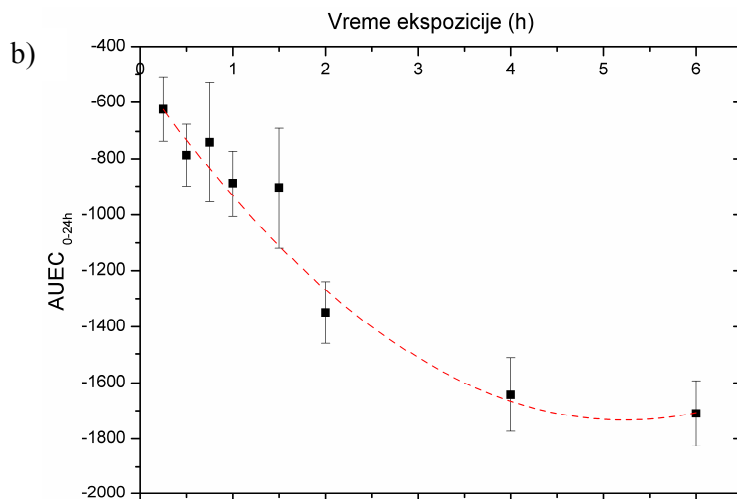
### 4.3.2 Vazokonstriktorni test

Ispitivanje dermalne raspoloživosti i ekvivalentnosti između generičkih i referentnih lekova još uvek zahteva sprovođenje kliničkih studija. Izuzetak su lekovi iz grupe kortikosteroida, s obzirom da za ovu grupu lekova regulatorne agencije prihvataju i rezultate dobijene vazokonstriktornim testom (Narkar, 2010). Iz tog razloga, a u cilju objektivne procene pogodnosti primene metode sa adhezivnim trakama razvijenog protokola, u okviru treće faze eksperimentalnog rada izvršena je simultana primena dve *in vivo* metode na uzorcima sa HC kao model lekovitom supstancom.

Prema zahtevu važećeg vodiča FDA (US FDA Guidance for Industry, 1995), najpre je sprovedena odgovarajuća pilot studija u cilju procene stepena očekivanog farmakodinamskog odgovora koji može da proizvede HC u ispitivanim podlogama, što je omogućilo predstavljanje rezultata u vidu krive zavisnosti datog odgovora od vremena izloženosti kože uzorku (eng. *dose duration-response curve*, u daljem testu označeno kao kriva vreme-odgovor). Primenom metode trapezoida, boja reflektovana sa kože izražena u arbitrarnim jedinicama, najpre je korigovana odgovarajućom bazalnom vrednosti, a potom prevedena u vrednost površine ispod krive ( $AUC_{0-24h}$ ) i predstavljena u zavisnosti od vremena (slika 4.3.4.a).



**Slika 4.3.4.** (legenda na sledećoj strani)



**Slika 4.3.4.** Rezultati pilot studije: **a)** individualni farmakodinamski odgovori nakon logaritamske transformacije, i **b)** kriva zavisnosti srednjih vrednosti AUEC i vremena ekspozicije.



**Slika 4.3.5.** Primer ispitanika koji je pružio odgovarajući farmakodinamski odgovor tokom pilot studije: izgled volarne strane podlaktice sa jasno vidljivim test-mestima.

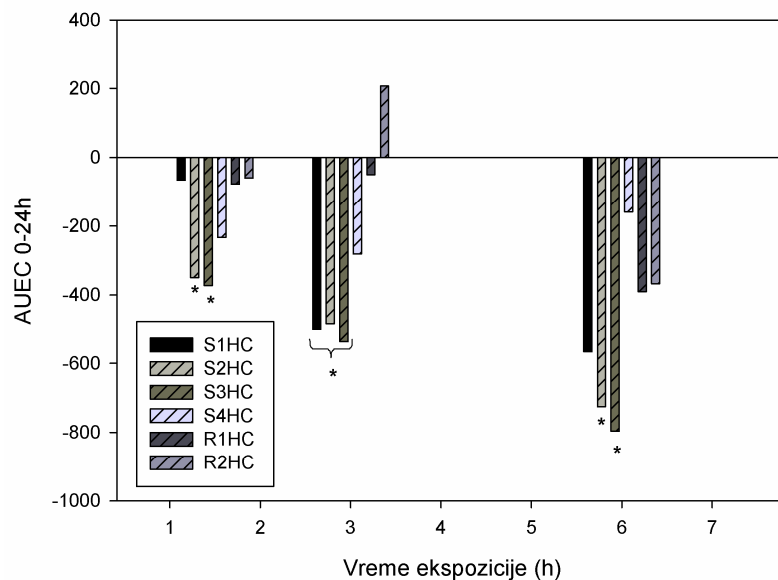
Iako je, očekivano, intenzitet izbeljivanja kože varirao među ispitanicima, intenzivnije izbeljivanje kože primećeno je kod svih ispitanika sa povećanjem vremena izloženosti kože uzorku (slika 4.3.4.b). Dobijena kriva podvrgnuta je regresionoj analizi koja je pružila prilično zadovoljavajuću aproksimaciju ( $R^2 = 0,9391$ ), imajući u vidu da su u pitanju rezultati *in vivo* ispitivanja. Dodatno, može se primetiti da su najduža vremena ekspozicije (4 h i 6 h), rezultovala u dostizanju svojevrsnog platoa (*steady-state* odgovor). Ovo se može dovesti u vezu sa prihvaćenom klasifikacijom primenjene model lekovite supstance iz grupe kortikosteroida, s obzirom da HC pripada lekovima veoma male jačine/potentnosti (Katz i Gans, 2008). Iz prikazane krive vreme-odgovor i

jednačine (3) izračunate su maksimalne površine ispod efektivne krive (eng. *area under the effect curve*, AUEC) i parametri neophodni za pravilno izvođenje same studije dermalne raspoloživosti:  $ED_{50}$ ,  $D_1$  i  $D_2$ . S obzirom da je izračunata vrednost  $ED_{50}$  od oko 3 h (2,8 h), na osnovu toga su dalje definisane vrednosti  $D_1$  ( $0,5 \times ED_{50}$ ) i  $D_2$  ( $2 \times ED_{50}$ ) kao kalibratori kraće, odnosno duže ekspozicije, čiji opseg predstavlja osetljivi deo krive vreme-odgovor za datu model lekovitu supstancu i prirodu ispitivanih nosača. Prema tome, primenjenom pilot studijom definisana su sledeća tri vremena ekspozicije: 1,5 h, 3 h i 6 h, koja su dalje korišćena u samoj studiji dermalne raspoloživosti (eng. *pivotal study*), kako bi se osigurao linearan farmakodinamski odgovor kože.

Stepen izbeljivanja kože prouzrokovan 1,5-časovnom izloženosti kože svim ispitivanim uzorcima (slika 4.3.6), pokazao je da značajnu vazokonstrikciju uzrokuje primena APG uzorka sa dodatkom IPA (uzorak S2HC) i propilenglikola (uzorak S3HC). Isti trend primećen je i nakon izloženosti kože uzorcima u trajanju od 3 h, uz zadovoljavajući odgovor pokazan i od strane osnovnog APG uzorka, bez dodatka korastvarača, odnosno potencijalnih inhensera (S1HC). Nakon 6 h ekspozicije, uzorci sa IPA i propilenglikolom ostali su najefikasniji, ali je stepen permeacije statistički značajan samo u poređenju sa farmakodinamskim odgovorom koji potiče od uzorka sa glicerolom (S4HC) ( $p < 0,05$ ).

Može se reći da su dobijeni rezultati uzorka sa dodatkom IPA bili donekle očekivani, imajući u vidu da se ovaj korastvarač zajedno sa specifičnom koloidnom strukturom APG podloga pokazao kao korastvarač izbora i za prethodne dve model lekovite supstance. Takođe, slično se može reći i za propilenglikol kao tradicionalno korišćen korastvarač za lekovite supstance iz grupe kortikosteroida (Al Jasser i sar., 2011). Ipak, skoro dvostruko slabiji farmakodinamski odgovor registrovan od strane APG uzorka sa glicerolom, kao korastvaračem koji može doprineti većem stepenu hidratisanosti kože (Fluhr i sar., 2008), a sledstveno i boljoj permeabilnosti, bio je iznenađujući.





**Slika 4.3.6.** Rezultati studije dermalne raspoloživosti: stepen izbeljivanja kože prikazan kao AUEC<sub>0-24h</sub> vrednosti prethodno korigovane bazalnim vrednostima EI i vrednostima EI koje odgovaraju netretiranoj kontroli, ispitan nakon tri perioda izloženosti kože uzorcima: 1,5 h, 3 h i 6 h.

Interesantno je napomenuti da je referentni uzorak sa IPA (R2HC) uslovio povećanje eritema indeksa nakon kontakta sa kožom u trajanju od 3 h, zbog čega odgovarajuća AUEC vrednost ima pozitivan predznak (slika 4.3.6). Imajući u vidu da je iritacija kože u slučaju korespondentnog APG uzorka (S2HC) izostala, ova pojava se ne može isključivo pripisati prisustvu 10 % (m/m) IPA, već činjenici da je referentna podloga stabilizovana konvencionalnim emulgatorima za koje se zna da, u nekim slučajevima, mogu dovesti do senzibilizacije kože. Zahvaljujući blagoj prirodi APG emulgatora, uočena razlika je donekle bila očekivana, ali ne u datoj meri. S obzirom da prilikom ispitivanja iritacionog potencijala samih podloga (odjeljak 4.1.9) nije uočena značajna promena EI nakon primene podloge R2, objašnjenje za ovakvu reakciju kože najverovatnije leži u kombinovanom uticaju inkorporirane lekovite supstance i dva prisutna korastvarača u uzorku R2HC, s obzirom da je IPA dodata u farmakopejsku podlogu koja u sastavu već sadrži 10 % (m/m) glicerola. Zapravo, može se reći da sve uzorke sa glicerolom (S4HC, R1HC i R2HC) odlikuje nezadovoljavajuća permeacija, te se dodatno objašnjenje o ovom zapažanju očekivalo od rezultata metode sa adhezivnim trakama.

Rezultati permeacije HC dobijeni nakon sva tri vremena ekspozicije (1,5 h, 3 h i 6 h), jasno ukazuju da je primena većine APG uzoraka uslovila bolju dermalnu raspoloživost HC u poređenju sa referentnim uzorcima.

Ukoliko se osvrnemo na rezultate mikroskopske analize i ispitivanja rastvorljivosti ( $C_s$ ), iako bi formalno sve uzorke sa HC trebalo da odlikuje ista termodinamička aktivnost, razlike u stepenu permeacije na koje je ukazao vazokonstriktorni test očigledno su posledica razlika u koloidnim strukturama ispitivanih i referentnih podloga. Interesantno je istaći da je najbolja permeacija registrovana iz uzoraka S2HC - gde je lek dominantno suspendovan (slika 4.3.1.b), i S3HC – gde je lek u najvećoj meri rastvoren (slika 4.3.1.c). Objašnjenje očigledno leži u različitim mehanizmima poboljšanja permeacije leka svojstvenim za dva ispitana inhensera. Iako u objavljenim radovima nedostaju studije koje se konkretno tiču IPA, razumno je pretpostaviti da, slično etanolu (Moser i sar., 2001), IPA poboljšava difuzivnost leka kroz SC povećanjem fluidnosti lipidnih struktura (Wiedersberg i sar., 2008). Propilenglikol, s druge strane, zahvaljujući svojim polarnim i nepolarnim grupama, penetrira u kožu zajedno sa lekovitom supstancom i održava je u rastvorenom stanju unutar SC (Herkenne i sar., 2008).

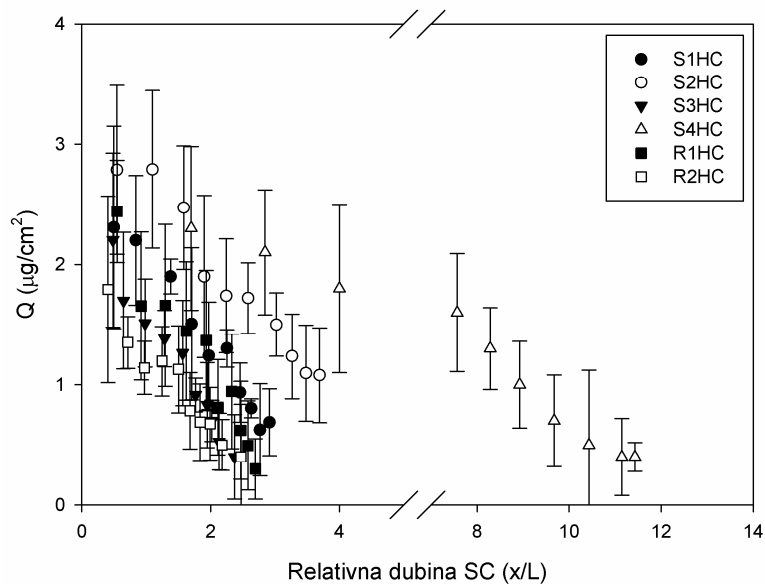
Sprovedeni vazokonstriktorni test u više vremenskih tačaka indirektno ukazuje da zavisno od sastava podloge, dermalna raspoloživost HC može značajno zavisiti od dužine primene, što otvara mogućnost relativno jednostavnog načina prilagođavanja režima doziranja.

### **4.3.3 Metoda sa adhezivnim trakama**

Uzorci sa HC kao model lekovitom supstancom ispitani su metodom sa adhezivnim trakama, istim protokolom kao i prethodne model lekovite supstance, koji je opisan u delu 4.2.2, i sumarno prikazan na slici 4.3.7. Ispitivani uzorci su ostavljeni u kontaktu sa kožom tokom 3 h, radi pouzdanijeg poređenja sa rezultatima vazokonstriktornog testa, čijom je pilot studijom određena  $ED_{50}$  vrednost.

Sadržaj HC ekstrahovan iz svakog od 10 uklonjenih slojeva kože prikazan kao zavisnost relativne dubine SC prikazan je na slici 4.3.7. Iako se mogu primetiti određene razlike u penetraciji model lekovite supstance iz različitih formulacija,

statistička razlika pronađena je samo u slučaju uzorka S2HC ( $2,78 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) posmatrano prema odgovarajućem referentnom uzorku R2HC ( $1,79 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Ovo ukazuje da sam dodatak određene količine penetracionog inhensera neće obavezno usloviti željeni efekat iz bilo koje podloge, potencirajući generalno bolje karakteristike same APG podloge. S druge strane, formulacija sa glicerolom ne samo što je obezbedila zadovoljavajuću isporuku HC ( $2,30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), već je i značajno uticala na koheziju korneocita, što se na slici 4.3.7 može uočiti u vidu dublje penetracije HC. Iako je bilo očekivano da IPA ispolji agresivniji uticaj na korneocite, glicerol je korastvarač kod kog je taj uticaj bio značajniji. Ovo se može pripisati brzini isparavanja IPA sa mesta primene, koja poboljšava distribuciju leka tokom kratkog vremena nakon primene leka na kožu, ali ne i u dublje slojeve kože. U slučaju etanola, pronađeno je da ovaj proces traje svega nekoliko sekundi (Kasting i Miller, 2006). Nasuprot tome, zna se da glicerol utiče na transport lekova kroz kožu tako što utiče na vlažnost kože (Karadzovska i sar., 2013). Ipak, nije lako proceniti penetraciju lekovite supstance iz nosača kompleksnog sastava, kada se zna da ostali sastojci, poput izabranog surfaktanta, ili u ovom slučaju obrazovanih tečnokristalnih faza, i/ili same vode kao jednog od najbezbednijih penetracionih inhensera, učestvuju u perkutanom transportu (Hosmer i sar., 2011; Mitriaikina i Müller-Goymann, 2009). Konačno, činjenica da je TS tehnikom određeno svega 0,72 - 1,11 % od primenjene koncentracije HC ne treba tumačiti nedostatkom metode, s obzirom da su uobičajene dermalne raspoloživosti lekova iz grupe kortikosteroida koji se primenjuju na koži svega nekoliko procenata od primenjene koncentracije (Wiedersberg i sar., 2008).



**Slika 4.3.7.** Komparativni prikaz penetracionih profila HC dobijenih TS metodom (srednja vrednost  $\pm$  SD,  $n = 6$ ), koji ukazuje na uticaj primenjenog stabilizatora emulzionog sistema i variranih korastvarača.

Iako korelaciona analiza nekad predstavlja izazov čak i u slučaju ispitivanja čvrstih farmaceutskih oblika (Petró i sar., 2011), mogućnost uspostavljanja slične korelacije u slučaju lekova koji se primenjuju na koži obično se procenjuje između *in vitro* i *in vivo* ispitivanja (Shah, 2005). Kada se u tom smislu procenjuje perkutana resorpcija, uobičajeno je porediti rezultate predstavljene kao % resorbovanog leka (Lehman i sar., 2011). Iako TS metoda pruža podatke koji su pogodni za transformacije ovog tipa ukoliko je primenjen *finite dose* dizajn studije, priroda podataka koji se dobijaju vazokonstriktornim testom predstavlja problem. Usled toga, korelacija dve *in vivo* metode pokušana je na više nivoa.

Kao što je i očekivano, najbolja korelacija dobijenih penetracionih i permeacionih profila uspostavljena je prilikom analize podataka dobijenih nakon istog vremena izloženosti kože uzorcima, tj. 3 h, i predstavljena u tabeli 4.3.2. Dalje, podaci dobijeni TS metodom izraženi su kao ukupna dermalna raspoloživost (kao kumulativna količina penetriranog leka ili procenat od primenjene količine leka) i predstavljena u zavisnosti od AUEC vrednosti i/ili srednje vrednosti odnosa AUEC ispitivanih i referentnih uzoraka. Najbolji koeficijenti korelacije dobijeni su polinomnim fitovanjem, kada su logaritamski transformisani podaci dobijeni TS metodom korelirani sa zabeleženim

farmakodinamskim odgovorom u vidu parametra  $AUEC_{test/ref}$ , koji se u literaturi još označava i kao faktor raspoloživosti  $f$  (eng. *bioavailability factor*; Leopold, 2003), uz koeficijent determinacije  $R^2$  od 0,7096. Kada se dobijena vrednost uporedi sa rezultatima prethodno publikovanih pokušaja uspostavljanja *in vitro-in vivo* korelacije sličnih farmaceutskih oblika, odnos rezultata dobijenih dvema *in vivo* metodama bi se mogao okarakterisati umerenom korelacijom (Petró i sar., 2011; Watkinson i sar., 2011). Iako donje granice nisu zvanično uspostavljene, mišljenja smo da usled inherentnih varijabilnosti koje prate ispitivanja dermalne raspoloživosti obema metodama, pokazanu korelaciju bi takođe trebalo smatrati umerenom, što govori da postoji bitna povezanost između analiziranih rezultata. U prilog ovome govori i činjenica da se za mnoge *in silico* pristupe u čijoj osnovi su matematički modeli koje karakterišu vrednosti  $R^2$  između 0,5 i 0,6 (tabela 1.4), smatra da pružaju dobro predviđanje permeabilnosti.

**Tabela 4.3.2.**  $R^2$  vrednosti kao rezultat korelacione analize dve *in vivo* metode za ispitivanje dermalne raspoloživosti lekova.

<b>Priroda koreliranih podataka (vazokonstriktorni test vs. metoda sa adhezivnim trakama)</b>	<b><math>R^2</math> nakon linearnog modelovanja*</b>	<b><math>R^2</math> nakon modelovanja primenom polinoma</b>
AUEC vs. %	-	0,6537
AUEC vs. Q ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	0,6162	0,6318
logAUEC vs. %	-	0,5980
logAUEC vs. log%	-	0,6134
$AUEC_{test/ref}^{**}$ vs. log%	0,5809	0,7096
log $AUEC_{test/ref}$ vs. log%	-	0,5509

\* samo vrednosti  $R^2 > 0,50$  su prikazane.

\*\*  $AUEC_{test/ref}$  označava odnos AUEC vrednosti ispitivanih i referentnih uzoraka.

Uzevši u obzir prethodno izložene rezultate, TS metoda sprovedena prema razvijenom protokolu ne može se smatrati alternativnom za vazokonstriktorni test, već pre korisnom komplementarnom metodom, čiji značaj je još veći u slučaju lekova čija primena na koži nije praćena vazokonstrikcijom, koja bi dovela do izbeljujućeg efekta dovoljnog intenziteta.

Kada se rezultati dobijeni dvema *in vivo* metodama posmatraju u relaciji sa uticajem primenjenih uzoraka na biofizičke parametre kože opisane u prvoj fazi eksperimentalnog rada (odjeljak 4.1.9), značaj primenjene podloge je evidentan. Ovo se

može dovesti u vezu sa činjenicom da, usled svoje amfifilne prirode, sami emulgatori mogu modifikovati permeabilnost bioloških membrana, vršeći funkciju penetracionih inhensera (Casiraghi i sar., 2012). Pokušajem uvođenja tzv. 'zelenih' materijala u farmaceutske oblike, izdvojila se grupa APG emulgatora kao pomoćnih materija prirodnog porekla, pogodnih za formulaciju efikasnih nosača za isporuku lekova. Kada se kombinuju sa drugim korastvaračima, njihov efekat na ubrzavanje penetracije pokazao se još bolji, što predstavlja relativno jednostavan način prilagođavanja isporuke leka.

Primećena neusaglašenost koja se tiče uzorka sa glicerolom (S4HC) tokom dve *in vivo* studije dermalne raspoloživosti zaslužuje detaljniju diskusiju. Činjenica da je TS metoda ukazala na veoma zadovoljavajuću penetraciju HC iz uzorka sa glicerolom, dok je u slučaju vazokonstriktornog testa ovaj uzorak uslovio slab farmakodinamski odgovor nakon 3-časovne ekspozicije, može se objasniti interakcijama glicerola i kože koje se ne mogu uočiti ispitivanjem stepena izbeljenja kože. Naime, slika 4.3.7 jasno ukazuje da uzorak S4HC značajno utiče na strukturu SC. Imajući u vidu da je isti broj traka primenjen za sve uzorke ispitane metodom sa adhezivnim trakama, ovo se jedino može pripisati uticaju samog uzorka na stepen penetracije, preko povećanja stepena hidratisanost kože, zahvaljujući glicerolu prisutnom u podlozi S4.

Ovo je očigledna prednost metode sa adhezivnim trakama, s obzirom da pruža dodatne informacije o mogućim interakcijama uzoraka sa kožom, dok je u tom smislu, vazokonstriktorni test ograničen opštim principom na kome se merenje permeacije zasniva (merenje reflektovane/apsorbovane svetlosti specifičnih talasnih dužina sa kože).

Iz prethodno navedenog, jasno je da je perkutana resorpcija složen, višestepeni proces, na koga mogu uticati brojni faktori, od fizičko-hemijskih karakteristika lekovite supstance i primenjenog nosača, do fiziološkog stanja kože (Godin i Touitou, 2007; Csóka i sar., 2005), uključujući i metabolizam kože. Stoga, u cilju sveobuhvatne karakterizacije dermalne raspoloživosti određenog leka, kad god je to moguće, poželjno je ispitati dva različita procesa:

- (i) penetraciju, koja se odnosi na prodiranje supstance kroz različite slojeve kože, dominantno SC, i

- (ii) permeaciju, kao količinu supstance koja prolazi kroz kožu pune debljine i konačno postaje dostupna vezivanju za odgovarajuće receptore (Schaefer i sar., 2008).

Iako TS metoda razvijenog protokola pruža podatke o penetraciji leka (pokazano na primeru diklofenak dietilamina, ketoprofena i hidrokortizona) kroz SC, s obzirom da upravo ovaj korak definiše brzinu perkutane resorpcije, mišljenja smo da metoda može pružiti korisne informacije o dermalnoj raspoloživosti lekova iz različitih terapijskih grupa.

## 5 ZAKLJUČAK

### Zaključak prve faze eksperimentalnog rada

- Primenom cetearil glukozida i cetearil alkohola - emulgatora iz grupe alkil poliglukozida, kao nejonskog mešanog emulgatora, od skora sertifikovanog kao farmaceutski ekscipijens, uspešno je formulisana podloga jednostavnog sastava koja se pokazala pogodnom za inkorporiranje 10 % (m/m) izopropanola, 20 % (m/m) glicerola, ili 20 % (m/m) propilenglikola, kao korastvarača i prospektivnih pojačivača penetracije za određene model lekovite supstance. Iako je primena navedenih poliola široko rasprostranjena u *ex tempore* izradi lekova, uspešan dodatak izopropanola u ove emulzione sisteme ide u prilog anticipiranoj primeni osnovne APG formulacije kao gotove (*ready-to-use*) podloge, koja bi našla široku upotrebu u izradi magistralnih lekova za primenu na koži.
- APG emulgator pokazao se kao promotor tečnokristalnih faza koje okružuju kapi unutrašnje faze i formiraju trodimenzionalnu mrežu u kontinuiranoj fazi emulzionog sistema, čime se smanjuje mobilnost i koalescencija dispergovane faze, i sledstveno obezbeđuje zadovoljavajuća stabilnost sistema. Rezultati dobijeni posredstvom polarizacione mikroskopije navode na zaključak da je anizotropna tekstura osnovne APG formulacije ostala očuvana i po dodatku variranih korastvarača, što ukazuje na zadovoljavajući solubilizacioni kapacitet podloge za koji su dominantno odgovorne uočene strukture lamelarne tečnokristalne i gel faze.
- S obzirom da su sve model lekovite supstance (ketoprofen, diklofenak dietilamin i hidrokortizon) suspendovane u ispitivane podloge, primećeno je da inkorporiranje leka u APG podloge dovodi do homogenijeg dispergovanja u poređenju sa referentnom podlogom (Nejonski hidrofilni krem, DAB 2006), kod koje su jasno vidljive grupisane čestice nerastvorenog leka; to navodi na zaključak da APG podloge odlikuje određena jednostavnost manipulacije prilikom različitih farmaceutsko-tehnoloških operacija u postupku izrade lekova sa njima. Ovo je svakako jedna od značajnih osobina koja se očekuje od savremene 'gotove' podloge.



- Zadovoljavajuća fizička stabilnost aktivnih i placebo uzoraka, potvrđena je sveobuhvatnom fizičkohemijom karakterizacijom. Ipak, zabeleženo je postepeno smanjivanje vrednosti pH i električne provodljivosti APG uzoraka tokom kontrolnih merenja, što se može tumačiti naknadnim strukturiranjem ovih mešovityh emulzionih sistema.
- Uočeno reološko ponašanje APG podloga (pseudoplastični tip proticanja sa umereno izraženom tiksotropijom) generalno se smatra poželjnim kod farmaceutskih oblika koji se primenjuju na koži, i ukazuje na dobre organoleptičke osobine koje se zahtevaju od savremenih kremova - lako razmazivanje na koži i obrazovanje kontinuiranog filma dobre supstantivnosti. Nasuprot tome, uprkos većoj konzistenciji koja je posledica guste matriks strukture, primećeno je da referentna podloga farmakopejskog kvaliteta podleže značajnim promenama prilikom sprovedenih manipulacija, naročito u smislu dodatka IPA i inkorporiranja lekovitih supstanci, što može biti odraz kompromitovane fizičke stabilnosti.
- Termalna analiza je ukazala da je, uprkos značajno višoj konzistenciji referentnog krema, mnogo veća aktivaciona energija potrebna za topljenje uzoraka stabilizovanih šećernim emulgatorom, što se može objasniti obrazovanim kompleksnim lamelarnim fazama koje doprinose stabilnosti model podloga. Prisustvo dodatnih endotermnih pikova karakteristično za uzorke sa dodatkom IPA odgovara frakciji ovog korastvarača koja je slabije vezana unutar koloidne strukture, i stoga je odgovorna za interakciju sa kožom koja ne dovodi do iritacije, ali pojačava penetraciju lekovitih supstanci.
- U osnovnoj APG podlozi voda je dominantno distribuirana kao *bulk* voda, dok po dodatku korastvarača ili lekovitih supstanci u najvećem procentu biva interlamelarno vezana, pri čemu nastala tranzicija ne dovodi do kompromitovanja fizičke stabilnosti emulzionih sistema.
- Uprkos činjenici da je termodinamička aktivnost uzoraka sa model lekovitim supstancama ostala formalno nepromenjena (tj. svi uzorci sa ketoprofenom bili su tipa suspenzije, a sa DDA tipa rastvora, nezavisno od dodatog korastvarača), postoji izvestan sinergistički efekat koloidne strukture stabilizovane šećernim emulgatorom i IPA. Uporedna analiza dobijenih koncentracija zasićenja/saturacionih

- koncentracija ukazuje na pogodnost osnovne APG podloge da se jednostavnom modifikacijom njenog sastava utiče na penetraciju i permeaciju lekovitih supstanci.
- Kao važan korak koji prethodi samom prolasku leka kroz kožu, preliminarna analiza liberacionih profila aktivnih uzoraka ukazala je na zadovoljavajuće oslobađanje lekovitih supstanci iz APG podloga. Činjenica da liberacija prati kinetiku Higuchi modela ukazuje da je taj proces kontrolisan difuzijom leka iz ispitivanih nosača. Odstupanje od ovog modela oslobađanja u slučaju uzorka S4DDA, kod kog veći koeficijent determinacije ide u prilog kinetici nultog reda, govori o mogućnosti da obrazovane lamelarne strukture u nekim slučajevima obezbede kontrolisano oslobađanje leka. Uočeni fenomen bi verovatno bio izraženiji u slučaju primene većih koncentracija ispitivanog šećernog emulgatora, što bi sledstveno dovelo do izraženije anizotropne teksture ispitivanih podloga.
  - Konačno, karakterizacija model podloga sprovedena u okviru prve faze eksperimentalnog rada, zaokružena je *in vitro/in vivo* procenom bezbednosti njihove primene. Izrazito povoljni efekti APG podloga na ćelijsku vijabilnost *in vitro* pokazani su ne samo za osnovnu APG podlogu, već i nakon njene modifikacije dodatkom korastvarača. Iako je dobra podnošljivost podloga sa poliolima bila donekle očekivana, visok procenat ćelija zadržao je vijabilnost i nakon primene APG podloge sa 10 % (m/m) IPA, što se može pripisati preovlađujućem uticaju blage prirode koloidne strukture podloga stabilizovanih šećernim emulgatorom.
  - Izostanak promene biofizičkih parametara kože poput EI, TEGV i pH nakon *in vivo* studije pod okluzijom, potvrda su zadovoljavajućeg bezbednosnog profila APG podloga. Trend povećanja TEGV uočen za referentnu (farmakopejsku) podlogu sa dodatkom IPA, ukazuje na aditivan efekat konvencionalnih emulgatora i dodatog alkohola, dok je koloidna struktura stabilizovana ispitivanim emulgatorom prirodnog porekla bila u stanju da suprimira potencijalno iritirajući uticaj datog korastvarača. Statistički značajno povećanje vlažnosti SC kod APG podloga sa propilenglikolom i glicerolom, ukazuje da se sličnim modifikacijama osnovne APG podloge na jednostavan način može izraditi nosač pogodan za tretman različitih (kserotičnih) stanja kože.

Opšti zaključak prve faze eksperimentalnog rada je da su formulisane podloge stabilizovane ispitivanim šećernim emulgatorom pogodne za izradu magistralnih lekova za kožu. Na objektivan način (karakterizacija sprovedena uporedo sa korespondentnim uzorcima farmakopejskog kvaliteta), demonstrirana je mogućnost inkorporiranja lekovitih supstanci i korastvarača različite prirode, uz očuvanje zadovoljavajuće fizičke stabilnosti i podnošljivosti na koži. Iako su prikazani rezultati odraz kvaliteta i bezbednosti ispitivanih podloga, model podloge odlikuju i povoljne aplikativne osobine, što se smatra jednako važnim svojstvom savremenih nosača za lekove koji se primenjuju na koži.

### **Zaključak druge faze eksperimentalnog rada**

- Variranje odabranih procesnih parametara u fazi razvoja protokola metode sa adhezivnim trakama, izdvojilo je D-Squame<sup>®</sup> trake. Ovu vrstu traka odlikuje jednostavnost primene, bolja adhezivna svojstva, manja mogućnost kontaminacije tokom rada, definisana površina traka, a time i veća pouzdanost dobijenih rezultata. Što se tiče faze ekstrakcije lekovite supstance sa primenjenih traka, izdvojen je protokol koji uključuje korak sonifikacije i centrifugiranja. Na taj način, za relativno kratko vreme dobijaju se čisti eluati koji se dalje mogu podvrgnuti određivanju lekovite supstance, a time i pouzdaniji i precizniji rezultati.
- Prikazani rezultati ukazuju da se TS metoda razvijenog protokola uspešno može koristiti za ispitivanje hidrofилnih kremova, kao lekova kompleksne strukture. Centrifugiranje eluata treba uključiti tokom postupka ekstrakcije lekovite supstance iz traka, radi sedimentiranja proteinske frakcije, koja očigledno značajno interferira tokom određivanja koncentracije leka HPLC/UPLC metodom.
- Ispitivanje penetracionih profila uzoraka sa ketoprofenom i DDA kao model lekovitim supstancama pokazalo je da je TS metoda dovoljno diskriminatorna da ukaže na razlike u ispitivanim uzorcima: u slučaju ketoprofena kao model lekovite supstance registrovan je značajno veći stepen penetracije leka iz svih APG podloga u poređenju sa referentnim, dok se u slučaju DDA izdvojio APG uzorak sa IPA kao korastvaračem.

- Uočena razlika u dermalnoj raspoloživosti ketoprofena iz APG uzoraka u poređenju sa referentnim može se objasniti specifičnostima koloidne strukture ispitanih uzoraka na koje je ukazala prva faza eksperimentalnog rada. Nasuprot tome, naizgled male razlike u dobijenim penetracionim profilima DDA iz APG i referentnih uzoraka ne treba tumačiti eventualnom slabošću same metode da ukaže na suptilne razlike među uzorcima, već pre inherentnim karakteristikama DDA, koja kao tzv. kaotropna supstanca, aktivno stupa u interakcije sa formiranim strukturama unutar emulzionog sistema, što može imati značajan uticaj na obrazovane mezofaze. Ovakve lek-podloga interakcije očigledno mogu usporiti isporuku DDA, čime se može objasniti sličan stepen penetracije DDA iz referentnih i većine APG uzoraka. Međutim, dodatak IPA kao penetracionog inhenjera u APG-stabilizovanu podlogu uspešno poboljšava penetraciju leka *in vivo*, uticajem IPA na 'pakovanje' molekula surfaktanta u međusloju.
- Uoprednom analizom primenjenih *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* pristupa, može se reći da je razvijena metoda sa adhezivnim trakama dovoljno osetljiva da ukaže na razlike u dermalnoj raspoloživosti model lekovitih supstanci. Takođe, jasno se vidi da se primenom biološki sličnijih membrana povećava pouzdanost dobijenih rezultata. S obzirom da izloženost membrana akceptorskom medijumu tokom *in vitro/ex vivo* studija (protokol od 28-30 h), može da promeni karakteristike membrane i utiče na rezultate permeacije, TS tehnika poseduje očigledne prednosti kao *in vivo* metoda čiji se protokol zasniva na realnim uslovima primene lekova. Uočen trend poboljšanja permeacije ketoprofena i DDA iz APG podloge sa IPA nakon 8., odnosno 13. sata ispitivanja, u skladu je sa  $C_s$  vrednostima ovih uzoraka, i posledica je promene termodinamičke aktivnosti leka nakon njegove primene na koži. Ovaj trend nije mogao biti uočen TS metodom s obzirom da su uzorci bili u kontaktu sa kožom ispitanika u periodu od 2 h.
- Iako sprovedene *in vitro/ex vivo* metode pružaju podatke o permeaciji lekova kroz kožu, a TS tehnika o penetraciji, tj. distribuciji leka kroz slojeve SC, dodatna vrednost TS metode leži u mogućnosti njene primene *in vitro*, nakon studija permeacije, sa ciljem dobijanja sveobuhvatnih rezultata. Ovo može biti posebno od značaja u slučaju izrazito lipofilnih lekova koji u značajnoj meri ostaju u SC, a u maloj meri penetriraju do vijabilnog tkiva. U tom slučaju TS metoda mogla bi dati

lažno pozitivne rezultate, odnosno poželjna je simultana primena odgovarajuće permeacione i penetracione studije.

Opšti zaključak druge faze eksperimentalnog rada je da se TS metoda razvijenog protokola može uspešno koristiti za *in vivo* procenu dermalne raspoloživosti hidrofilnih kremova kao farmaceutskih oblika kompleksne strukture, uvidom u njihove penetracione profile. Protokol TS metode optimizovan je tako da se može sprovesti u laboratorijama prosečne opremljenosti.

### **Zaključak treće faze eksperimentalnog rada**

- I u slučaju hidrokortizona kao model lekovite supstance pokazana je zadovoljavajuća fizička stabilnost uzoraka stabilizovanih šećernim emulgatorom, sa i bez dodatka variranih korastvarača. Sprovedene modifikacije sastava podloge od naročitog su značaja prilikom optimizacije dermalne isporuke lekova iz grupe kortikosteroida, kako bi se izbegla potencijalno 'opasna praksa' razblaživanja registrovanih lekova.
- Uprkos činjenici da ga ne odlikuje mezogena priroda, polarizaciona mikroskopija je potvrdila da je suspendovanje hidrokortizona u pripremljene APG podloge rezultovalo interesantnom distribucijom leka. Očekivano, uzorak sa dodatkom propilenglikola, tradicionalno najčešće korišćenim korastvaračem za lekove iz grupe kortikosteroida, najviše je doprineo rastvaranju inicijalno suspendovanog leka. Kod ostalih APG uzoraka, lekovita supstanca je značajnim delom solubilizovana različitim strukturama obrazovanim posredstvom šećernog emulgatora, zahvaljujući solubilizacionom kapacitetu formiranih lamelarnih faza.
- Farmakodinamski odgovor hidrokortizona iz ispitivanih podloga uspešno je praćen primenom vazokonstriktornog testa. Iako je, očekivano, intenzitet izbeljivanja kože varirao među ispitanicima, snažna vazokonstrikcija dermalne vaskulature primećena je kod svih ispitanika sa povećanjem vremena izloženosti kože uzorku ( $R^2 = 0,9391$ ), uprkos maloj jačini model kortikosteroida.

- Rezultati permeacije hidrokortizona dobijeni nakon sva tri definisana vremena ekspozicije (1,5 h, 3 h i 6 h), jasno ukazuju da primena većine APG uzoraka uslovljava bolju dermalnu raspoloživost hidrokortizona u poređenju sa referentnim uzorcima. Vazokonstriktornim testom izdvojili su se APG uzorak sa IPA – koji se pokazao kao korastvarač izbora i za prethodne dve model lekovite supstance, i uzorak sa propilenglikolom - tradicionalno dobar korastvarač za lokalno aplikovane kortikosteroide. Naime, stepen izbeljivanja kože prouzrokovan već nakon 1,5-časovne izloženosti kože svim ispitivanim uzorcima, ukazao je da značajnu vazokonstrikciju dermalne mikrovaskulature uzrokuje primena APG uzoraka sa dodatkom IPA (uzorak S2HC) i propilenglikola (uzorak S3HC). Isti trend nastavljen je i nakon izloženosti kože uzorcima u trajanju od 3 h, uz zadovoljavajući odgovor pokazan i od strane osnovne APG koloidne strukture (S1HC). Nakon 6 h ekspozicije, uzorci sa IPA i propilenglikolom ostali su najefikasniji, ali se registrovani stepen permeacije može smatrati statistički značajnim samo u poređenju sa farmakodinamskim odgovorom koji potiče od uzorka sa glicerolom (S4HC) ( $p < 0,05$ ).
- Činjenica da je uzorak Nejonskog hidrofilnog krema sa 10 % m/m IPA (R2HC) uslovio povećanje eritema indeksa nakon kontakta sa kožom u trajanju od 3 h, zbog čega odgovarajuća AUEC vrednost ima pozitivan predznak, dovodi u pitanje verodostojnost rezultata dobijenih vazokonstriktornim testom u slučaju uzoraka sa iritacionim potencijalom kože, što može rezultovati lažno negativnim rezultatima. Imajući u vidu da je iritacija kože u slučaju korespondentnog APG uzorka (S2HC) izostala, ova pojava se ne može isključivo pripisati prisustvu 10 % (m/m) IPA, već činjenici da je referentna podloga stabilizovana konvencionalnim emulgatorima za koje se zna da, u nekim slučajevima, mogu dovesti do senzibilizacije kože. S obzirom da prilikom ispitivanja iritacionog potencijala samih podloga (24-časovna studija pod okluzijom) nije uočena značajna promena EI nakon primene podloge R2, objašnjenje za ovakvu reakciju kože najverovatnije leži u kombinovanom uticaju inkorporirane lekovite supstance i dva prisutna korastvarača u uzorku R2HC, s obzirom da je IPA dodat u farmakopejsku podlogu koja u sastavu već sadrži 10 % (m/m) glicerola. Zapravo, može se istaći da sve uzorke sa glicerolom (S4HC, R1HC i R2HC) odlikuje nezadovoljavajuća permeacija.

- Primena metode sa adhezivnim trakama ukazala je na određene razlike u penetraciji model lekovite supstance iz različitih formulacija, ali je značajna statistička razlika pronađena samo u slučaju uzorka S2HC ( $2,78 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) posmatrano prema odgovarajućem uzorku R2HC ( $1,79 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). S druge strane, formulacija sa glicerolom ne samo što je obezbedila zadovoljavajuću isporuku HC ( $2,30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), već je i značajno uticala na koheziju korneocita, što je reflektovano u vidu dublje penetracije HC.
- Primenom korelacione analize zaključeno je da između rezultata regulatorno prihvaćenog vazokonstriktornog testa i metode sa adhezivnim trakama razvijenog protokola postoji korelacija umerene značajnosti. Najbolji rezultati dobijeni su polinomnim fitovanjem, kada su logaritamski transformisani podaci dobijeni TS metodom korelirani sa zabeleženim farmakodinamskim odgovorom u vidu  $\text{AUEC}_{\text{test/ref}}$  (faktor raspoloživosti), uz koeficijent determinacije  $R^2$  od 0,7096.

Kao opšti zaključak treće faze eksperimentalnog rada mora se konstatovati da su obe *in vivo* metode pokazale određene prednosti i nedostatke. Osim što je regulatorno prihvaćena metoda ograničena na nekoliko terapijskih grupa lekova, uočeno je da rezultat vazokonstriktornog testa može biti kompromitovan iritacionim potencijalom ispitivanog uzorka, koji može da maskira očekivani farmakodinamski odgovor. S druge strane, iako podložna uticaju brojnih faktora, strogo pridržavanje definisanih protokola uz simultanu primenu neinvazivnih tehnika bioinženjeringa kože (praćenje porasta TEGV), čini metodu sa adhezivnim trakama pogodnom za procenu perkutane penetracije, koja može pružiti i informacije o lek-koža interakcijama. Uzevši u obzir prethodno izložene rezultate, metoda sa adhezivnim trakama sprovedena prema razvijenom protokolu ne može se smatrati alternativnom za vazokonstriktorni test, već pre korisnom komplementarnom metodom, čiji značaj je još veći u slučaju lekova čija primena na koži nije praćena vazokonstrikcijom, koja bi dovela do izbeležujućeg efekta dovoljnog intenziteta.

## 6 LITERATURA

Al Jasser M, Mebuke N, de Gannes GC. Propylene glycol: an often unrecognized cause of allergic contact dermatitis in patients using topical corticosteroids. *Skin Therapy Lett* 2011;16(5):5-7.

Allen L. Guidelines for compounding practices, U: The art, science, and technology of pharmaceutical compounding, 4<sup>th</sup> ed, Washington: American Pharmacists Association, 2012.

Allen L. Dosage form design and development. *Clin Ther* 2008;30:2102-2111.

Arellano A, Santoyo S, Martin C, Ygartua P. Influence of propylene glycol and isopropyl myristate on the in vitro percutaneous penetration of diclofenac sodium from carbopol gels. *Eur J Pharm Sci* 1998;7:129-135.

Ashton P, Walters KA, Brain KR, Hadgraft J. Surfactant effects in percutaneous absorption. II. Effects on protein and lipid structure of the stratum corneum. *Int J Pharm* 1992;87:265-269.

Au WL, Skinner M, Kanfer I. Comparison of tape stripping with the human skin blanching assay for the bioequivalence assessment of topical clobetasol propionate formulations. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2010;13:11-20.

Bárány E, Lindberg M, Lodén M. Unexpected skin barrier influence from nonionic emulsifiers. *Int J Pharm* 2000;195:189-195.

Barbero A, Frasch F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: A quantitative review. *Toxicol In Vitro* 2009;23:1-13.

Barreiro-Iglesias R, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A. Controlled release of estradiol solubilized in carbopol/surfactant aggregates. *J Control Release* 2003;93:319-330.

Barnes HA. Rheology of emulsions – a review. *Colloids Surf A* 1994;91:89-95.

Bashir S, Chew A-L, Anigbogu A, Dreher F, Maibach H. Physical and physiological effects of stratum corneum tape stripping. *Skin Res Technol* 2001;7:40-48.

Baudonnet L, Grossiord J-L, Rodriguez F. Physicochemical characterization and in vitro release of salicylic acid from O/W emulsions prepared with Montanov 68: Effect of formulation parameters. *Drug Dev Ind Pharm* 2004;30(9):975-984.

Beija M, Salvayre R, Lauth-de Viguierie N, Marty JD. Colloidal systems for drug delivery: from design to therapy. *Trends Biotechnol* 2012;30(9):485-496.

Boix-Montanes A. Relevance of equivalence assessment of topical products based on the dermatopharmacokinetics approach. *Eur J Pharm Sci* 2011;42:173-179.

Breternitz M, Flach M, Praßler J, Elsner P, Fluhr JW. Acute barrier disruption by adhesive tapes is influenced by pressure, time and anatomical location: integrity and cohesion assessed by sequential tape stripping; a randomized, controlled study. *Br J Dermatol* 2007;156:231-240.

British Pharmacopoeia. London: British Pharmacopoeial Commission, Stationary Office, 2009.



- Brown C, Friedel H, Barker A, Buhse L, Keitel S, Cecil T, Kraemer J, Morris M, Reppas C, Stickelmeyer M, Yomota C, Shah V. Meeting Report: FIP/AAPS Joint Workshop Report: Dissolution/In Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms. *AAPS PharmSciTech* 2011;12(2):782-794.
- Brown MB, Lau C-H, Lim ST, Sun Y, Davey N, Moss GP, Yoo S-H, De Muynck C. An evaluation of the potential of linear and nonlinear skin permeation models for the prediction of experimentally measured percutaneous drug absorption. *J Pharm Pharmacol* 2012;64:566-577.
- Bunge A. Release rates from topical formulations containing drugs in suspension. *J Control Release* 1998;52:141-148.
- Casiraghi A, Di Grigoli M, Cilurzo F, Gennari CG, Rossoni G, Minghetti P. The influence of the polar head and the hydrophobic chain on the skin penetration enhancement effect of poly(ethylene glycol) derivatives. *AAPS PharmSciTech* 2012;13:247-253.
- Castro M, Fernández Cirelli A, Kovensky J. Synthesis and Interfacial Properties of Sugar-Based Surfactants Composed of Homo- and Heterodimers. *J Surfact Deterg* 2006;9:279-286.
- Chen L, Han L, Lian G. Recent advances in predicting skin permeability of hydrophilic solutes. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65:295-305.
- Clarys P, Alewaeters K, Lambrecht R, Barel AO. Skin color measurements: comparison between three instruments: the Chromameter, the DermaSpectrometer and the Mexameter. *Skin Res Technol* 2000;6(4):230-238.
- CPMP/EWP/239/95 Note for guidance on the clinical requirements for locally applied, locally acting products containing known constituents, EMA Human Medicines Evaluation Unit, 1995.
- CPMP/EWP/QWP/1401/98 rev. 2010. Guideline on the investigation of bioequivalence, EMA Committee for Medicinal Products for Human Use, 2010.
- Csóka I, Csányi E, Zapantis G, Nagy E, Feher-Kiss A, Horvath G, Blazso G, Erős I. In vitro and in vivo percutaneous absorption of topical dosage forms: case studies. *Int J Pharm* 2005;291:11-19.
- Darlenski R, Sassning S, Tsankov N, Fluhr JW. Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;72:295-303.
- Deutscher Arzneimittel Codex, Neues Rezeptur Formularium (DAC/NRF), Stuttgart: Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH, Eschborn Deutscher Apotheker Verlag; 2007.
- Deutsches Arzneibuch 2006, Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 2006.
- Dias M, Hadgraft J, Lane M. Influence of membrane-solvent-solute interactions on solute permeation in model membranes. *Int J Pharm* 2007;336:108-114.
- EC Guidance Document on Dermal Absorption, Sanco/222/2000 rev.7, 19/03/2004. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General.

Eccleston GM. Functions of mixed emulsifiers and emulsifying waxes in dermatological lotions and creams. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects* 1997;123/124:169-182.

Eccleston GM, Beattie L. Microstructural changes during the storage of systems containing cetostearyl alcohol: polyoxyethylene alkyl ether surfactants. *Drug Dev Ind Pharm* 1988;14:2499-2518.

ElMeshad AN, Tadros MI. Transdermal delivery of an anti-cancer drug via w/o emulsions based on alkyl polyglucosides and lecithin: design, characterization, and in vivo evaluation of the possible irritation potential in rats. *AAPS Pharm Sci Tech* 2011;12:1-9.

EMA Guideline: Clinical investigation of corticosteroids intended for use on the skin, 1987. Dostupno sa: <http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/ewp/3cc26aen.pdf> (poslednji pristup 1.4.2013)

Escobar-Chavez JJ, Merino-Sanjuan V, Lopez-Cervantes M, Urban-Morlan Z, Pinon-Segundo E, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. The tape-stripping technique as a method for drug quantification in skin. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2008;11(1):104-130.

European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), Skin Irritation Validation Study – Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min- 42 Hours for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals (Standard Operating Procedure), Version 1.8, February 2009.

European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), 1002-03 Background Document on In Vitro Methods for Skin Irritation Testing based on Reconstructed Human Epidermis (RhE), 2009.

European Pharmacopoeia 7<sup>th</sup> edition, Strasbourg: Council of Europe, 2011.

Faller C, Bracher M, Dami N, Roguet R. Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics. *Toxicol In Vitro* 2002;16:557-572.

Fang J-Y, Hwang T-L, Fang C-L, Chiu H-C. In vitro and in vivo evaluations of the efficacy and safety of skin permeation enhancers using flurbiprofen as a model drug. *Int J Pharm* 2003;255:153-166.

Fässler Tassopoulos T. Evaluation of topical bioavailability in human stratum corneum in vivo by tape stripping using a direct spectroscopic method. Doktorska disertacija, Bazel, 2006.

Florence AT, Lee VH. Personalised medicines: more tailored drugs, more tailored delivery. *Int J Pharm* 2011;415(1-2):29-33.

Fluhr JW, Darlenski R, Surber C. Glycerol and the skin: holistic approach to its origin and functions. *Br J Dermatol* 2008;159:23-34.

Fluhr JW, Kuss O, Diepgen T, Lazzerini S, Pelosi A, Gloor M, Berardesca E. Testing for irritation with a multifactorial approach: comparison of eight non-invasive measuring techniques on five different irritation types. *Br J Dermatol* 2001;145:696-703.

- Formulaire Thérapeutique Magistral (FTM), Belgija, 2010. Dostupno sa: [http://www.fagg-afmps.be/fr/binaries/FTM\\_Pharmaciens\\_Edition\\_2010\\_tcm291-121380.pdf](http://www.fagg-afmps.be/fr/binaries/FTM_Pharmaciens_Edition_2010_tcm291-121380.pdf) (poslednji pristup 10.4.2013)
- Franz TJ, Lehman PA, Raney SG. Use of excised human skin to assess the bioequivalence of topical products. *Skin Pharmacol Physiol* 2009;22:276-286.
- Gallagher S, Trottet L, Heard C. Ketoprofen: release from, permeation across and rheology of simple gel formulations that simulate increasing dryness. *Int J Pharm* 2003;268:37-45.
- Garcia MT, Ribosa I, Campos E, Sanchez Leal J. Ecological properties of alkylglucosides. *Chemosphere* 1997;35(3):545-556.
- Ghadially R, Brown BE, Sequeira-Martin SM, Feingold KR, Elias PM. The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *J Clin Invest* 1995;95:2281-2290.
- Gibbs S. In vitro irritation models and immune reactions. *Skin Pharmacol Physiol* 2009;22:103-113.
- Godin B, Touitou E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:1152-1161.
- Gotter B, Faubel W, Neubert RHH. FTIR microscopy and confocal Raman microscopy for studying lateral drug diffusion from semisolid formulation. *Eur J Pharm Biopharm* 2010;74:14-20.
- Groeber F, Holeiter M, Hampel M, Hinderer s, Schenke-Layland K. Skin tissue engineering – In vivo and in vitro applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;128:352-366.
- Hadgraft J. Passive enhancement strategies in topical and transdermal drug delivery. *Int J Pharm* 1999;184:1-6.
- Hadgraft J, Lane ME. Skin permeation: The years of enlightenment. *Int J Pharm* 2005;305:2-12.
- Haigh JM, Kanfer I. Assessment of topical corticosteroid preparations: the human skin blanching assay. *Int J Pharm* 1984;19:245-262.
- Hall-Manning TJ, Holland GH, Rennie G, Revell P, Hines J, Barratt MD, Basketter DA. Skin irritation potential of mixed surfactant systems. *Food Chem Toxicol* 1998;36:233-238.
- Hansen S, Lehr C-M, Schaefer U. Improved input parameters for diffusion models of skin absorption. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65:251-264.
- Hanson R, Heaney J. A primer on automating the vertical diffusion cell (VDC). *Dissolut Technol* 2013;20(2):40-43.
- Hathout RM, Mansour S, Geneidi AS, Mortada ND. Visualization, dermatopharmacokinetic analysis and monitoring the conformational effects of a microemulsion formulation in the skin stratum corneum. *J Colloid Interf Sci* 2011;354:124-130.

- Herkenne C, Naik A, Kalia YN, Hadgraft J, Guy RH. Effect of propylene glycol on ibuprofen absorption into human skin in vivo. *J Pharm Sci* 2008;97(1):185-197.
- Hoffmann B, Platz G. Phase and aggregation behaviour of alkylglycosides. *Curr Opin Colloid Interf Sci* 2001;6:171-177.
- Holmberg K. Natural surfactants. *Curr Opin Colloid Interf Sci* 2001;6:148-159.
- Hosmer JM, Shin SH, Nornoo A, Zheng H, Lopes LB. Influence of internal structure and composition of liquid crystalline phase on topical delivery of paclitaxel. *J Pharm Sci* 2011;100(4):1444-1455.
- Iglauer S, Wu Y, Shuler P, Tang Y, Goddard III WA. Alkyl polyglycoside surfactant-alcohol cosolvent formulations for improved oil recovery. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2009;339:48-59.
- Jacobi U, Meykadeh N, Sterry W, Lademann J. Effect of the vehicle on the amount of stratum corneum removed by tape stripping. *JDDG* 2003;1:884-889.
- Jacobi U, Weigmann H-J, Ulrich J, Sterry W, Lademann J. Estimation of the relative stratum corneum amount removed by tape stripping. *Skin Res Technol* 2005;11:91-96.
- Junginger HE. Pharmaceutical emulsions and creams, U: Sjöblom J. (ed.) Emulsions – A Fundamental and Practical Approach. Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1992, 189-205.
- Jurado E, Vicaria JM, Fernandez-Arteaga A, Chachalis P, Garcia-Martin JF. Wetting power in aqueous mixtures of alkylpolyglucosides and ethoxylated fatty alcohols. *J Surfact Deterg* 2010;13:497-501.
- Karadzovska D, Brooks JD, Monteiro-Riviere NA, Riviere JE. Predicting skin permeability from complex vehicles. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65(2):265-277.
- Kasting GB, Miller MA. Kinetics of finite dose absorption through skin 2: volatile compounds. *J Pharm Sci* 2006;95:268-280.
- Katz M, Gans EH. Topical corticosteroids, structure-activity and the glucocorticoid receptor: discovery and development – a process of ‘planned serendipity’. *J Pharm Sci* 2008;97:2936-2947.
- Kaushik D, Michniak-Kohn B. Percutaneous penetration modifiers and formulation effects: thermal and spectral analyses. *AAPS PharmSciTech* 2010;11(3):1068-1083.
- Klang V, Valenta C, Matsko N. Electron microscopy of pharmaceutical systems. *Micron* 2013;44:45-74.
- Klein K. Liquid crystals and emulsions: A wonderful marriage. U: Wiechers J. Skin barrier: Chemistry of skin delivery systems. Carol Stream: Allured Publishing Corporation; 2008; 265-272.
- Konya M, Bohus P, Paglino L, Csoka I, Csanyi E, Eros I. Coherent emulsions containing alkylpolyglucoside esters as emulsifiers. *Progr Colloid Polym Sci* 2004;125:161-166.
- Konya M, Sorrenti M, Ferrari F, Rossi S, Csoka I, Caramella C, Bettinetti G, Eros I. Study of the microstructure of oil/water creams with thermal and rheological methods. *J Therm Anal Calorim* 2003;73:623-632.

- Korhonen M, Niskanen H, Kiesvaara J, Yliruusi J. Determination of optimal combination of surfactants in creams using rheology measurements. *Int J Pharm* 2000;197:143-151.
- Krochmal L. Considerations before choosing (extemporaneously) compounded products. *Dermatol Ther* 2009;22:225-228.
- Kühn A, Neubert R. Characterization of mixtures of alkyl polyglycosides (Plantacare) by liquid chromatography-electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Pharm Res* 2004;21(12):2347-2353.
- Lademann J, Jacobi U, Surber C, Weigmann H-J, Fluhr JW. The tape stripping procedure - evaluation of some critical parameters. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;72:317-323.
- Lashmar UT, Richardson JP, Erbod A. Correlation of physical parameters of an oil in water emulsion with manufacturing procedures and stability. *Int J Pharm* 1995;125:315-325.
- Lau WM, White AW, Heard CM. Topical delivery of a naproxen-dithranol co-drug: in vitro skin penetration, permeation, and staining. *Pharm Res* 2010;27:2734-2742.
- Lehman PA, Raney SG, Franz TJ. Percutaneous absorption in man: in vitro–in vivo correlation. *Skin Pharmacol Physiol* 2011;24:224–230.
- Leopold CS. Pharmacokinetic analysis of the FDA guidance for industry – ‘Topical dermatologic corticosteroids: in vivo bioequivalence’. *Eur J Pharm Biopharm* 2003;56:53-58.
- Levintova Y, Plakogiannis F, Bellantone R. An improved in vitro method for measuring skin permeability that controls excess hydration of skin using modified Franz diffusion cells. *Int J Pharm* 2011;419:96-106.
- Lindemann U, Weigmann H-J, Schaefer H, Sterry W, Lademann J. Evaluation of the pseudo-absorption method to quantify human stratum corneum removed by tape stripping using the protein absorption. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2003;16(4):228-236.
- Liu Y, Friberg S. Role of liquid crystal in the emulsification of a gel emulsion with high internal phase fraction. *J Colloid Interface Sci* 2009;340:261-268.
- Löffler H, Dreher F, Maibach H. Stratum corneum adhesive tape stripping: influence of anatomical site, application pressure, duration and removal. *Br J Dermatol* 2004;151:746–752.
- Lopez A, Llinares F, Cortell C, Herraes M. Comparative enhancer effects of Span<sup>®</sup>20 with Tween<sup>®</sup>20 and Azone<sup>®</sup> on the in vitro percutaneous penetration of compounds with different lipophilicities. *Int J Pharm* 2000;202:133–140.
- Magistralne formule 2008, Beograd: Farmaceutsko društvo Srbije; 2008.
- Makai M, Csanyi E, Nemeth Zs, Palinkas J, Eros I. Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. *Int J Pharm* 2003;256:95-107.
- Manconi M, Caddeo C, Sinico C, Valenti D, Mostallino MC, Biggio G, Fadda AM. Ex vivo skin delivery of diclofenac by transcutol containing liposomes and suggested mechanism of vehicle-skin interaction. *Eur J Pharm Biopharm* 2011;78:27-35.

- Marques M, Brown W, Giancaspro G, Davydova N, Chang E, Fringer J, Hauck W, DeStefano A. Challenges in dissolution testing. *Dissolut Technol* 2012;19(3):39-41.
- Marriott JF, Wilson KA, Langley CA, Belcher D. *Pharmaceutical Compounding and Dispensing*, 2<sup>nd</sup> ed. London: Pharmaceutical Press; 2010.
- McPherson TB, Fontane PE, Jackson KD, Martin KS, Berry T, Chereson R, Bilger R. Prevalence of compounding in independent community pharmacy practice. *J Am Pharm Assoc* 2006;46(5):568-573.
- Metzger JO, Eissen M. Concepts on the contribution of chemistry to a sustainable development. Renewable raw materials. *C.R. Chimie* 2004;7:569-581.
- Meyer W, Kacza J, Zschemisch N-H, Godynicki S, Seeger J. Observations on the actual structural conditions in the stratum superficiale dermidis of porcine ear skin, with special reference to its use as model for human skin. *Ann Anat* 2007;189:143-156.
- Minghetti P, Palmieri I, Selmin F. When authorized medicinal products are not available: possible alternatives to meet legitimate expectations of patients. *J Pharm Health Serv Res* 2010;1(3):107-112.
- Mitriaikina S, Müller-Goymann CC. Comparative permeation studies of nondiluted and diluted betamethasone-17-valerate semisolid formulations through isolated human stratum corneum and artificial skin construct. *Skin Pharmacol Physiol* 2009;22:142-150.
- Mohammed D, Yang Q, Guy RH, Matts P, Hadgraft J, Lane ME. Comparison of gravimetric and spectroscopic approaches to quantify stratum corneum removed by tape-stripping. *Eur J Pharm Biopharm* 2012;82(1):171-174.
- Montenegro L, Ademola J, Bonina F, Maibach H. Effect of application time of betamethasone-17-valerate 0.1% cream on skin blanching and stratum corneum drug concentration. *Int J Pharm* 1996;140:51-60.
- Moser K, Kriwet K, Naik A, Kalia YN, Guy RH. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *Eur J Pharm Biopharm* 2001;52:103-112.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- Mugglestone CJ, Mariz S, Lane ME. The development and registration of topical pharmaceuticals. *Int J Pharm* 2012;435:22-26.
- Müller-Goymann CC. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *Eur J Pharm Biopharm* 2004;58:343-356.
- Naegel A, Heisig M, Wittum G. Detailed modelling of skin penetration – An overview. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65:191-207.
- Nahata MC, Allen LV. Extemporaneous drug formulations. *Clin Ther* 2008;30(11):2112-2119.
- Narkar Y. Bioequivalence for topical products-An update. *Pharm Res* 2010;27(12):2590-2601.

- Navidi W, Hutchinson A, N'Dri-Stempffer B, Bunge A. Determining bioequivalence of topical dermatological drug products by tape-stripping. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2008;35(3):337-348.
- N'Dri-Stempffer B, Navidi WC, Guy RH, Bunge AL. Optimizing metrics for the assessment of bioequivalence between topical drug products. *Pharm Res* 2008;25(7):1621-1630.
- Nesseem D. Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. *J Pharm Biomed Anal* 2001;26:387-399.
- Netzlaff F, Lehr C-M, Wertz PW, Schaefer UF. The human epidermis models EpiSkin<sup>®</sup>, SkinEthic<sup>®</sup> and EpiDerm<sup>®</sup>: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur J Pharm Biopharm* 2005;60:167-178.
- Neubert R. Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2011;77:1-2.
- Neubert R, Wohlrab W. In vitro methods for biopharmaceutical evaluation of topical formulations. *Acta Pharm Technol* 1990;36(4):197-206.
- Nicoli S, Bunge AL, Delgado-Charro MB, Guy RH. Dermatopharmacokinetics: Factors influencing drug clearance from the stratum corneum. *Pharm Res* 2009;26(4):865-871.
- OECD Guideline 439 for the Testing of Chemicals - *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Methods. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development, 2010.
- OECD Test Guideline 427: Skin Absorption: *in vivo* Method. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development, 2004.
- OECD Test Guideline 428: Skin Absorption: *in vitro* Method. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development, 2004.
- OECD Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development, 2004.
- OECD Guidance Notes on Dermal Absorption. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development, Draft, 22 October 2010.
- Otto A, du Plessis J, Wiechers JW. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *Int J Cosmet Sci* 2009;31:1-19.
- Özsoy Y, Güngör S, Cevher E. Vehicle effects on in vitro release of tiaprofenic acid from different topical formulations. *Il Farmaco* 2004;59:563-566.
- Peramal VL, Tamburic S, Craig DQM. Characterization of the variation in the physical properties of commercial creams using thermogravimetric analysis and rheology. *Int J Pharm* 1997;155:91-98.
- PermeGear Inc 2012, Equipment for measuring drug permeation. Dostupno sa: <http://www.permegear.com/franz.htm> (poslednji pristup 1.7.2013).
- Pershing L, Bakhtian S, Poncelet G, Corlett J, Shah V. Comparison of skin stripping, in vitro release, and skin blanching response methods to measure dose response and

- similarity of triamcinolone acetonide cream strengths from two manufactured sources. *J Pharm Sci* 2002;91(5):1312-1323.
- Petró É, Balogh Á, Blazsó G, Erős I, Csóka I. In vitro and in vivo evaluation of drug release from semisolid dosage forms. *Pharmazie* 2011;66:936-941.
- Piacquadio D, Kligman A. The critical role of the vehicle to therapeutic efficacy and patient compliance. *J Am Acad Dermatol* 1998;39:S67-73.
- Piispanen P, Persson M, Claesson P, Norin T. Surface properties of surfactants derived from natural products. Part 1: Syntheses and structure/property relationships—solubility and emulsification. *J Surfact Deterg* 2004;7(2):147-159.
- Puglia C, Bonina F, Rizza L, Cortesi R, Merlotti E, Drechsler M, Mariani P, Contado C, Ravani L, Esposito E. Evaluation of percutaneous absorption of naproxen from different liposomal formulations. *J Pharm Sci* 2010;99(6):2819-2829.
- Reddy MB, Stinchcomb AL, Guy RH, Bunge AL. Determining dermal absorption parameters in vivo from tape strip data. *Pharm Res* 2002;19:292-298.
- Rege PR, Vilivalam VD, Collins CC. Development in release testing of topical dosage forms: use of the Enhancer Cell™ with automated sampling. *J Pharm Biomed Anal* 1998;17:1225-1233.
- Remington – The Science and Practice of Pharmacy, 22<sup>nd</sup> ed. London: Pharmaceutical Press; 2012.
- Resolution CM/ResAP(2011)1 on quality and safety assurance requirements for medicinal products prepared in pharmacies for the special needs of patients. Council of Europe, Committee of Ministers; 2011.
- Ribeiro HM, Morais JA, Eccleston GM. Structure and rheology of semisolid o/w creams containing cetyl alcohol/non-ionic surfactant mixed emulsifier and different polymers. *Int J Cosmet Sci* 2004;26:47–59.
- Rosado C, Rodrigues LM. In vivo study of the physiological impact of stratum corneum sampling methods. *Int J Cosm Sci* 2003;25:37-44.
- Russell L, Wiedersberg S, Delgado-Charro B. The determination of stratum corneum thickness. An alternative approach. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;69:861-870.
- Russell LM, Guy RH. Measurement and prediction of the rate and extent of drug delivery into and through the skin. *Expert Opin Drug Deliv* 2009;6(4):355-369.
- Sanghvi P, Collins C. Comparison of diffusion studies of hydrocortisone between the Franz cell and the Enhancer cell. *Drug Dev Ind Pharm* 1993;19(13):1573-1585.
- Savić S. Fizičko-hemijski aspekti i in vitro/in vivo karakterizacija emulzionih sistema sa nejonskim emulgatorom tipa šećernog estera. Doktorska disertacija. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, 2004.
- Savic S, Savic M, Tamburic S, Vuleta G, Vesic S, Müller-Goymann C. An alkylpolyglucoside surfactant as a prospective pharmaceutical excipient for topical formulations: The influence of oil polarity on the colloidal structure and hydrocortisone in vitro/in vivo permeation. *Eur J Pharm Sci* 2007;30:441-450.



- Savic S, Savic M, Vesic S, Vuleta G, Müller-Goymann C. Vehicles based on a sugar surfactant: Colloidal structure and its impact on in vitro/in vivo hydrocortisone permeation. *Int J Pharm* 2006;320:86-95.
- Savic S, Tamburic S, Kovacevic A, Daniels R, Müller-Goymann C. Natural surfactant-based emulsion systems: The influence of common pharmaceutical excipients on colloidal structure and physical stability. *J Dispersion Sci Technol* 2008;29:1276-1287.
- Savic S, Tamburic S, Savic M. From conventional towards novel – natural surfactants in drug delivery systems design: current status and perspectives. *Expert Opin Drug Deliv* 2010;7(3):353-369.
- Savic S, Vuleta G, Daniels R, Müller-Goymann C. Colloidal microstructure of binary systems and model creams stabilized with an alkylpolyglucoside non-ionic emulsifier. *Colloid Polym Sci* 2005;283:439-451.
- Savic S, Weber C, Tamburic S, Savic M, Müller-Goymann C. Topical vehicles based on natural surfactant/fatty alcohols mixed emulsifier: the influence of two polyols on the colloidal structure and in vitro/in vivo skin performance. *J Pharm Sci* 2009;98:2073–2090.
- Schaefer UF, Hansen S, Schneider M, Luengo Contreras J, Lehr C-M. Models for skin absorption and skin toxicity testing. U: Ehrhardt C, Kim KJ, eds. Drug absorption studies. In situ, in vitro and in silico models. New York: Springer, 2008:3–33.
- Seppic 2011, Sepineo SE 68. Dostupno sa: <http://www.seppic.com/human-health/self-emulsifier-sepineo-se68-@/view-460-seproduit.html> (poslednji pristup 1.4.2013)
- Shah VP. IV–IVC for topically applied preparations – a critical evaluation. *Eur J Pharm Biopharm* 2005;60:309–314.
- Shah V, Elkins J, Williams R. Importance of in vitro release measurement in topical dermatological dosage forms. U: Bronaugh R, Maibach H. Topical absorption of dermatological products, Basel: Marcel Dekker, 2002.
- Shokri J, Nokhodchi A, Dashbolaghi A, Hassan-Zadeh D, Ghafourian T, Barzegar Jalali M. The effect of surfactants on the skin penetration of diazepam. *Int J Pharm* 2001;228:99–107.
- Snorraddottir BS, Gudnason PI, Scheving R, Thorsteinsson F, Masson M. Release of anti-inflammatory drugs from a silicone elastomer matrix system. *Pharmazie* 2009;64(1):19-25.
- Stockert J, Blazquez-Castro A, Canete M, Horobin R, Villanueva A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica* 2012;114:785-796.
- Stubenrauch C. Sugar surfactants – aggregation, interfacial, and adsorption phenomena. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2001;6:160-170.
- Subedi RK, Oh SY, Chun M-K, Choi H-K. Recent advances in transdermal drug delivery. *Arch Pharm Res* 2010;33(3):339-351.
- Surber C, Tassopoulos T, Smith EW. Ointments, creams and lotions used as topical drug delivery vehicles. U: Bronaugh R, Maibach H, eds. *Topical absorption of dermatological products*. New York: Marcel Dekker, 2001. 511-517.

- Tadros T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Adv Colloid Interface Sci* 2004;108-109:227-258.
- Tamburic S, Craig DQM, Vuleta G, Milic J. A comparison of electrical and rheological techniques for the characterization of creams. *Int J Pharm* 1996;137:243-248.
- Tasić-Kostov M. Dermokozmetičke emulzije sa lamelarnom tečno-kristalnom fazom kao nosač za laktobionsku kiselinu – ispitivanje koloidne strukture, efikasnosti i bezbednosti. Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, 2012.
- Tasic-Kostov M, Reichl S, Lukic M, Jaksic I, Savic S. Two alkyl polyglucoside natural surfactants varying in chain length in stabilization of lactobionic acid containing emulsions: physicochemical characterization and in vitro irritation potential assessment. *Riv Ital Sostanze Grasse* 2011;88(4):256-264.
- Taylor LJ, Lee RS, Long M, Rawlings A, Tubek J, Whitehead L, Moss G. Effect of occlusion on the percutaneous penetration of linoleic acid and glycerol. *Int J Pharm* 2002;249:157–64.
- Teichmann A, Jacobi U, Ossadnik M, Richter H, Koch S, Sterry W, Lademann J. Differential stripping: Determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. *J Invest Dermatol* 2005;125:264-269.
- Tokumura F, Ohyama K, Fujisawa H, Suzuki M, Nukatsuka H. Time-dependent changes in dermal peeling force of adhesive tapes. *Skin Res Technol* 1999;5:33-36.
- Tokumura F, Ohyama K, Fujisawa H, Nukatsuka H. Seasonal variation in adhesive tape stripping of the skin. *Skin Res Technol* 1999;5:208-212.
- Tokumura F, Yoshiura Y, Homma T, Nukatsuka H. Regional differences in adhesive tape stripping of human skin. *Skin Res Technol* 2006;12:178–182.
- Tsai J-C, Cheng C-L, Tsai Y-F, Sheu H-M, Chou C-H. Evaluation of in vivo bioequivalence methodology for topical clobetasol 17-propionate based on pharmacodynamic modeling using Chinese skin. *J Pharm Sci* 2004;93:207–217.
- United States Pharmacopoeia 34, The National Formulary 29 (USP/NF), Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2011.
- US FDA Guidance: Topical dermatologic corticosteroids: In vivo bioequivalence. Rockville: Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER); 1995.
- US FDA. Extended release oral dosage forms: development, evaluation and application of in vitro/in vivo correlations. Rockville: Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER); 1997a.
- US FDA Guidance for Industry. Nonsterile semisolid dosage forms, scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing, and controls; in vitro release testing and in vivo bioequivalence documentation. Rockville: Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER); 1997b.
- US FDA Draft Guidance for Industry. Topical Dermatological Drug Products NDAs and ANDAs – In Vivo Bioavailability, Bioequivalence, In Vitro Release and Associated

Studies. Rockville: Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER); 1998.

US FDA Compliance Policy Guidance Sec. 460.200 Pharmacy Compounding, Centre for Drug Evaluation and Research; May 2002. Dostupno sa: [http://www.fda.gov/ora/compliance\\_ref/cpg/default.htm](http://www.fda.gov/ora/compliance_ref/cpg/default.htm) (poslednji pristup 1.4.2013)

US Pharmacopeial Convention 2013, USP Compounding Standards and Resources. Dostupno sa: <http://www.usp.org/usp-healthcare-professionals/compounding> (poslednji pristup 5.6.2013)

Voegeli R, Heiland J, Doppler S, Rawlings V, Schreier T. Efficient and simple quantification of stratum corneum proteins on tape strippings by infrared densitometry. *Skin Res Technol* 2007;13(3):242-251.

Vucinic-Milankovic N, Savic S, Vuleta G, Vucinic S. The physicochemical characterization and in vitro/in vivo evaluation of natural surfactants-based emulsions as vehicles for diclofenac diethylamine. *Drug Dev Ind Pharm* 2007;33(3):221-234.

Vuleta G, Milić J, Primorac M, Savić S. Farmaceutska tehnologija I, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Beograd, 2012.

Vuleta G, Savić S. Magistralni lekovi sa kortikosteroidima. *Arh farm* 2008;58(2-3):121-136.

Wagner H, Kostka K-H, Lehr C-M, Schaefer U. Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents. *J Control Release* 2001;75:283-295.

Walters K, Brain K. Topical and transdermal delivery. U: Gibson M. Pharmaceutical preformulation and formulation, 2<sup>nd</sup> ed, New York: Informa Healthcare, 2009.

Watkinson RM, Guy RH, Oliveira G, Hadgraft J, Lane ME. Optimisation of cosolvent concentration for topical drug delivery III – Influence of lipophilic vehicles on ibuprofen permeation. *Skin Pharmacol Physiol* 2011;24:22-26.

Welin-Berger K, Neelissen JAM, Bergenstahl B. The effect of rheological behavior of a topical anaesthetic formulation on the release and permeation rates of the active compound. *Eur J Pharm Sci* 2001;13:309-318.

Weigmann H-J, Lademann J, Meffert H, Schaefer H, Sterry W. Determination of the horny layer profile by tape stripping in combination with optical spectroscopy in the visible range as a prerequisite to quantify percutaneous absorption. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 1999;12:34-45.

Weigmann H-J, Lindemann U, Antoniou C, Tsirikas GN, Stratigos AI, Katsambas A, Sterry W, Lademann J. UV/VIS absorbance allows rapid, accurate, and reproducible mass determination of corneocytes removed by tape stripping. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2003;16(4):217-227.

Wiedersberg S, Leopold CS, Guy RH. Dermatopharmacokinetics of betamethasone 17-valerate: Influence of formulation viscosity and skin surface cleaning procedure. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;71:362-366.

Wiedersberg S, Leopold CS, Guy RH. Bioavailability and bioequivalence of topical glucocorticoids. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;68:453–66.

- Wiegand C, Hipler U-C. Evaluation of biocompatibility and cytotoxicity using keratinocyte and fibroblast cultures. *Skin Pharmacol Physiol* 2009;22:74–82.
- Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. *Adv Drug Deliver Rev* 2004;56:603–618.
- Winfield AJ, Rees JA, Smith I. *Pharmaceutical Practice*, 4<sup>th</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier; 2009.
- Winkler A, Müller-Goymann CC. Comparative permeation studies for  $\delta$ -aminolevulinic acid and its n-butyl ester through stratum corneum and artificial skin constructs. *Eur J Pharm Biopharm* 2002;53:281-287.
- Yariv D, Efrat R, Libster D, Aserin A, Garti N. In vitro permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010;78:185-192.
- Zakon o lekovima i medicinskim sredstvima, Službeni glasnik RS br. 30/2010 i 107/2012.
- Zatz JL. Drug release from semisolids: Effect of membrane permeability on sensitivity to product parameters. *Pharm Res* 1995;12(5):787-789.
- Zgola-Grzeskowiak A, Grzeskowiak T, Franska M, Rzasa A, Lukaszewski Z. Investigations on the biodegradation of alkylpolyglucosides by means of liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Biodegradation* 2008;19:635–642.
- Zhai H, Dika E, Goldovsky M, Maibach H. Tape-stripping method in man: comparison of evaporimetric methods. *Skin Res Technol* 2007;13:207-210.
- Zhang Y, Chan HF, Leong KW. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65(1):104-120.

## 7 Prilozi

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

#### Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu – M21:

Jaksic I, Lukic M, Malenovic A, Reichl S, Hoffmann C, Müller-Goymann C, Daniels R, Savic S. Compounding of a topical drug with prospective natural surfactant-stabilized pharmaceutical bases: physicochemical and in vitro/in vivo characterization. A ketoprofen case study. *Eur J Pharm Biopharm* 2012;80(1):164-175 (IF 3,826/2012).

#### Radovi u međunarodnim časopisima – M23:

Pantelic I, Lukic M, Markovic B, Daniels R, Vesic S, Vuleta G, Savic S. Effect of small changes in natural origin-based emulsion systems on hydrocortisone skin absorption and performance: a comparison of two in vivo methods. *Pharm Dev Technol* (*in press*) doi: 10.3109/10837450.2012.751407 (IF 1,333/2012).

Pantelic I, Lukic M, Markovic B, Lusiana, Hoffmann C, Müller-Goymann C, Milic J, Daniels R, Savic S. Development of a prospective isopropyl alcohol-loaded pharmaceutical base using simultaneous in vitro/in vivo characterization methods of skin performance. *Drug Dev Ind Pharm* (*in press*) doi: 10.3109/03639045.2013.794827 (IF 1,539/2012).

#### Rad u časopisu nacionalnog značaja – M52:

Jakšić I, Lukić M, Rajić M, Jončić-Savić K, Radulović V, Milić J, Savić S. Fizičko-hemijska karakterizacija i procena bezbednosti model podloga sa alkil poliglukozidnim emulgatorom za NSAIL, *Arhiv za farmaciju* 2010; 60: 26-47.

#### Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini – M33:

Pantelic I, Lukic M, Reichl S, Hoffmann C, Lusiana, Milic J, Savic S. Towards standardization of the tape stripping technique as a prospective in vivo approach for dermal bioavailability assessment: comparative in vitro/ex vivo/in vivo study. 8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Istanbul, Turkey, 19-22 March 2012, CD-ROM;

Jakšić I, Lukić M, Reichl S, Hoffmann C, Savić S. Komparativno in vitro/ex vivo/in vivo ispitivanje dermalne raspoloživosti ketoprofena iz emulzionih sistema na bazi alkil poliglukoziida. II Kongres farmaceuta Bosne i Hercegovine sa međunarodnim učešćem, 17-20.11.2011. Banja Luka, Zbornik radova, str.192-194. (usmeno saopštenje)

Jaksic I, Lukic M, Milic J, Daniels R, Savic S. In vivo skin absorption of a model NSAID from alkyl polyglucoside emulsion vehicles: Influence of selected co-solvent and colloidal structure of the system, 5<sup>th</sup> World Congress on Emulsions, Lyon, France, 12-14 October 2010, CD-ROM;

Jakšić I, Lukić M, Milić J, Daniels R, Savić S. In vivo skin absorption of a model NSAID from alkyl polyglucoside emulsion vehicles: Influence of colloidal structure of the system and selected penetration enhancer, 7<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Valletta, Malta, 8-11 March 2010, CD-ROM;

**Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu – M34:**

Pantelić I, Lukic M, Milic J, Vuleta G, Savic S. In vivo comparison of non- and chemically-enhanced skin absorption of antiinflammatory drugs from alkyl polyglucoside-based vehicles. Abstract accepted for 3<sup>rd</sup> Conference on “Innovation in Drug Delivery: Advances in Local Drug Delivery”, Pisa, Italy, 22-25 September 2013.

Pantelić I, Lukic M, Milic J, Vuleta G, Savic S. Tailoring drug thermodynamic activity towards patient's needs: alkyl polyglucoside-stabilized emulsion systems as prospective ready-to-use bases. 9<sup>th</sup> World Surfactant Congress and Business Convention (CESIO), Barcelona, Spain, 10-12 June 2013, P13.

Pantelić I, Lukic M, Milic J, Vuleta G, Savic S. Hydrocortisone dermal bioavailability from alkyl polyglucoside emulsifier-stabilised bases: in vivo skin blanching assay. 100<sup>th</sup> FIP Congress, 3-8. October, Amsterdam, Netherlands, 2012.

Pantelić I, Lukić M, Čalija B, Vuleta G, Daniels R, Savić S. *In vivo* hydrocortisone skin absorption from APG-based topicals: Tape stripping vs. skin blanching. 9<sup>th</sup> Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, 20-22. september, Dubrovnik, Croatia, 2012; PP122.

Jaksic I, Lukic M, Markovic B, Calija B, Milic J, Savic S. Comparison of in vitro/in vivo methods for skin penetration/permeation assessment: A diclofenac-diethylamine case study. 3<sup>rd</sup> PharmSciFair, jun 13-17, 2011, Prag, Češka Republika, p. 131, P-273.

Jaksic I, Lukic M, Daniels R, Reichel S, Milic J, Savic S. Case by case physicochemical and in vitro/in vivo biopharmaceutical characterization of alkyl polyglucoside-based vehicles: ketoprofen as a model drug, 8<sup>th</sup> Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, Graz, Austria, 16-18 September 2010; doi: 10.3797/scipharm.cespt.8.PDD32

Jakšić I, Lukić M, Kostić N, Milić J, Savić S. The influence of natural surfactant-based emulsion vehicles on in vitro liberation profiles of model NSAID, 69<sup>th</sup> International Congress of FIP, Istanbul, Turkey, 3-8 September 2009. p. 199;

Jakšić I, Lukić M, Jončić-Savić K, Milić J, Savić S. The influence of natural surfactant-based emulsion systems with and without isopropyl alcohol on skin absorption in vivo of model NSAID, 69<sup>th</sup> International Congress of FIP, Istanbul, Turkey, 3-8 September 2009. p. 199;

Lukić M, Jakšić I, Perović T, Tasić-Kostov M, Milić J, Savić S. Natural surfactants as potential pharmaceutical excipients in magistral drug preparation: physicochemical characterization and safety evaluation of model vehicles for NSAID, 69<sup>th</sup> International Congress of FIP, Istanbul, Turkey, 3-8 September 2009. p. 199.

**Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu – M64:**

Jakšić I, Lukić M, Milić J, Daniels R, Savić S. Komparativna in vitro/in vivo karakterizacija emulzionih podloga sa alkil poliglukozidnim emulgatorom kao nosača za diklofenak i ketoprofen, Arhiv za farmaciju 2010; 60 (5): 772-773. (V Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, 13-17. oktobar 2010) – Treća nagrada za najbolju poster prezentaciju u okviru Sekcije za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju;

Jakšić I, Lukić M, Milić J, Vuleta G, Savić S, Daniels R. Bioraspoloživost diklofenak-dietilamina iz emulzionih sistema na bazi alkil poliglukozidnog emulgatora: *in vivo tape stripping* metod vs. *in vitro* oslobađanje, Simpozijum Biofarm 2009, Beograd, 22. oktobar 2009, P6.

**Tehničko rešenje kategorije M83 – novi tehnološki postupak:**

Snežana Savić, Jela Milić, Milica Lukić, Ivana Jakšić, Mirjana Rajić, Katarina Jončić-Savić, Gordana Vuleta. Razvoj formulacije podloge na bazi prirodnog emulgatora alkil poliglukozidnog tipa za *ex tempore* izradu magistralnih lekova; 2009 – 2010; U okviru projekta TR 19058 koje finansira Ministarstvo nauke i tehnološkog razvoja

**Tehnička rešenja kategorije M85 – nova metoda:**

Ivana Pantelić, Milica Lukić, Bojan Marković, Jela Milić, Gordana Vuleta, Snežana Savić. Metoda za procenu dermalne raspoloživosti nesteroidnih antiinflamatornih lekova iz preparata za primenu na koži.

Pozitivna recenzija recenzenata prof. dr Nenada Ugrešića i doc. dr Biljane Stojanović prihvaćena na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu 27.12.2012. godine, odlukom broj 2546/3.

Ivana Pantelić, Milica Lukić, Bojan Marković, Jela Milić, Gordana Vuleta, Snežana Savić. Razvoj komplementarnih in vivo metoda za procenu dermalne raspoloživosti kortikosteroida iz preparata za primenu na koži.

Pozitivna recenzija recenzenata prof. dr Sonje Vesić i doc. dr Biljane Stojanović prihvaćena na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu 27.12.2012. godine, odlukom broj 2546/2.

## **7.2 Biografija autora**

Ivana Pantelić rođena je 1982. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu oglednu školu za francuski jezik "Vladislav Ribnikar" i Treću beogradsku gimnaziju. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2001/2002. godine, a diplomirala je 25.05.2007. sa prosečnom ocenom 8,81 i ocenom 10 na diplomskom ispitu.

Doktorske akademske studije iz Farmaceutske tehnologije na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu upisala je školske 2008/2009. godine. U 2009. godini dobila je stipendiju Službe nemačke akademske razmene (DAAD) za istraživački boravak u Nemačkoj u okviru specijalnog programa za Srbiju pod nazivom „Istraživačko iskustvo u Nemačkoj za studente i diplomce iz Srbije”. Saradnju sa Institutom za farmaceutsku tehnologiju Eberhard Karls Univerziteta u Tibingenu koju je tom prilikom ostvarila nastavila je kroz još dve istraživačke posete koje su realizovane 2011. i 2012. godine.

Od oktobra 2007. godine radila je kao saradnik u nastavi, do oktobra 2009. godine kada je izabrana u zvanje asistenta na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. Učestvuje u izvođenju i organizaciji praktične nastave iz predmeta Farmaceutska tehnologija I, Farmaceutska tehnologija II, Kozmetologija i Osnovi farmaceutske biotehnologije.

Tokom 2010. godine učestvuje kao saradnik na projektu tehnološkog razvoja pod nazivom „Razvoj i karakterizacija koloidnih nosača za antiinflamatorne lekove“ (TR-19058), a od 2011. godine na projektu tehnološkog razvoja „Razvoj mikro- i nanosistema kao nosača za lekove sa antiinflamatornim delovanjem i metoda za njihovu karakterizaciju“ (TR-34031) i projektu osnovnih istraživanja „Razvoj molekula sa antiinflamatornim i kardioprotektivnim dejstvom: strukturne modifikacije, modelovanje, fizičko-hemijska karakterizacija i formulaciona ispitivanja“ (OI-172041) Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Govori engleski (Cambridge Certificate of Proficiency in English) i francuski jezik (Course de Langue et Civilisation Française de la Sorbonne).



### 7.3 Izjava o autorstvu

Potpisana: Ivana Pantelić  
broj indeksa: 18/08

#### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Dermalna raspoloživost lekova sa antiinflamatornim delovanjem iz podloga sa šećernim emulgatorom: komparativna primena metoda *in vitro/in vivo* karakterizacije

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 06.09.2013. godine

Pantelić Ivana

## **7.4 Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije**

Ime i prezime autora: Ivana Pantelić

Broj indeksa: 18/08

Studijski program: Doktorske akademske studije iz Farmaceutске tehnologije

Naslov rada: Dermalna raspoloživost lekova sa antiinflamatornim delovanjem iz podloga sa šećernim emulgatorom: komparativna primena metoda *in vitro/in vivo* karakterizacije

Mentor: prof. dr Snežana Savić

Potpisana: Ivana Pantelić

Izjavljujem da je štampana verzija mog dokorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada. Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 06.09.2013. godine

  
\_\_\_\_\_

## 7.5 Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Dermalna raspoloživost lekova sa antiinflamatornim delovanjem iz podloga sa šećernim emulgatorom: komparativna primena metoda *in vitro/in vivo* karakterizacije

koja je moje autorsko delo.

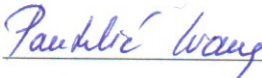
Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 06.09.2013. godine

  
\_\_\_\_\_