

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Sanela M. Savić

PARENTERALNE NANOEMULZIJE SA
SLABO RASTVORLJIVIM
PSIHOFARMAKOLOŠKIM LEKOVIMA:
FORMULACIJA, OPTIMIZACIJA I *IN VIVO*
PROCENA DISPOZICIJE

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET



Sanela M. Savić

PARENTERALNE NANOEMULZIJE SA
SLABO RASTVORLJIVIM
PSIHOFARMAKOLOŠKIM LEKOVIMA:
FORMULACIJA, OPTIMIZACIJA I *IN VIVO*
PROCENA DISPOZICIJE

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Sanela M. Savić

PARENTERAL NANOEMULSIONS WITH
POORLY WATER-SOLUBLE
PSYCHOPHARMACOLOGICAL DRUGS:
FORMULATION, OPTIMIZATION AND *IN*
VIVO DISPOSITION EVALUATION

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta; deo rada urađen je na Katedri za farmakologiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu Univerziteta u Nišu, na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu, i na Institutu za farmaceutsku tehnologiju Eberhard–Karls Univerziteta u Tibingenu, Nemačka.

MENTOR

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

ČLANOVI KOMISIJE

1. _____

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

2. _____

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

3. _____

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

4. _____

Dr sc. Danijela Randelović, naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju

Datum odbrane _____

Želim da izrazim duboku zahvalnost svim dragim ljudima koji su dali neprocenljiv naučni, tehnički i moralni doprinos ovom radu:

◆ *Prof. dr Snežani Savić*, mom mentoru, izvanrednoj ženi i naučniku, za nesebičnu pomoć i podršku, posvećenost, dragoceno vreme i ekspertizu tokom čitavog procesa stvaranja ove doktorske disertacije.

◆ *Prof. dr Nebojši Cekiću*, za ukazano poverenje, bezrezervnu moralnu i profesionalnu podršku, motivaciju i dragocene savete tokom svih etapa izrade disertacije.

◆ *Prof. dr Miroslavu Saviću*, za neograničen entuzijazam za nauku i izvanredne diskusije koje smo imali tokom pripreme publikacija i izrade doktorske disertacije.

◆ *Prof. dr Jeli Milić*, za stručne sugestije, ohrabrenja i vredne komentare koji su doprineli konačnom uobličavanju disertacije.

◆ Naučnom savetniku *dr Danijeli Randelović*, za stručnu pomoć u eksperimentalnom radu i korisne savete tokom pripreme publikacija i oblikovanja doktorske disertacije.

◆ *Prof. dr Rolfu Danijelsu*, na ukazanoj prilici da se deo eksperimentalnog rada sprovede na Institutu za farmaceutsku tehnologiju Eberhard–Karls Univerziteta u Tübingenu.

◆ Docentu *dr Bojanu Markoviću* sa Katedre za farmaceutsku hemiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, kolegama sa Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, i naročito kolegama sa Katedre za farmakologiju i Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, a posebno mojoj kolegini i prijatelju *Tanji Ilić*, za nesebičnu, stalnu podršku i razumevanje tokom svih faza izrade disertacije.

◆ Mojoj porodici, posebno roditeljima i suprugu, koji me svakodnevno podsećaju na sve što je dobro na ovom svetu.

Parenteralne nanoemulzije sa slabo rastvorljivim psihofarmakološkim lekovima: formulacija, optimizacija i *in vivo* procena dispozicije

SAŽETAK

Da bi se obezbedila brza/kontrolisana isporuka lekovite supstance u mozak i poboljšala njena biološka raspoloživost na ciljnom mestu dejstva, i posledično terapijski efekat, neophodno je savladati brojne ključne izazove, pre svega restriktivna svojstva krvno-moždane barijere, kao i kritične karakteristike same lekovite supstance (slaba rastvorljivost, značajan metabolizam prvog prolaza, nespecifična biodistribucija, efluks od strane *P*-glikoproteina). Među nanotehnološkim strategijama koje se koriste za poboljšanje ciljne isporuke lekova u mozak, poslednjih godina povećana pažnja fokusirana je na nanoemulzije kao obećavajuće nosače za parenteralnu isporuku slabo rastvorljivih centralno-aktivnih lekovitih supstanci, zahvaljujući njihovim brojnim privlačnim prednostima, uključujući biokompatibilnost, biodegradabilnost, fizičku stabilnost, jednostavan *scale up*, visok solubilizacioni kapacitet za lipofilne lekovite supstance, moguće povećanje biološke raspoloživosti, kontrolisano oslobađanje i ciljnu isporuku u različite organe. Iako se lipidne nanoemulzije tradicionalno primenjuju u parenteralnoj ishrani, kao i za solubilizaciju i intravensku isporuku nekoliko lipofilnih lekovitih supstanci, neophodno je ulaganje dodatnih napora u cilju optimizacije formulacije, stabilnosti, isporuke lekova, i uopšte *in vivo* ponašanja ovih sistema, što ovoj temi daje obnovljen i sve veći značaj.

Na osnovu navedenog, cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je razvoj i optimizacija ulje-u-vodi nanoemulzija za parenteralnu primenu slabo rastvorljivih psihofarmakoloških lekovitih supstanci, kao i procena sposobnosti razvijenih nanoemulzija da poboljšaju preuzimanje u mozak inkorporirane model lekovite supstance.

U tu svrhu, primenom koncepta eksperimentalnog dizajna formulisane su placebo i nanoemulzije sa lekovitom supstancom, izrađene metodom homogenizacije pod visokim pritiskom i detaljno okarakterisane u pogledu veličine i raspodele veličina kapi, površinskog naelektrisanja, viskoziteta, morfologije, lek–nosač interakcija, dugoročne stabilnosti i stabilnosti na autoklaviranje. Diazepam, referentni benzodiazepin koji se

uobičajeno koristi u predkliničkim ispitivanjima novih psihofarmakoloških lekovitih supstanci, i risperidon, temeljno ispitan i klinički dokazan atipični antipsihotik sa smanjenom tendencijom izazivanja ekstrapiramidalnih neželjenih efekata, inkorporirani su u nanoemulzije kao modeli lipofilnih, u vodi slabo rastvorljivih lekovitih supstanci. Tokom razvoja formulacije, kompjuterski generisan, pun faktorski ili generalni faktorski eksperimentalni dizajn korišćeni su za identifikaciju i procenu efekata i interakcija različitih formulacionih i procesnih parametara (sadržaj uljane faze, vrsta lecitina, vrsta koemulgatora, vrsta vodene faze, prisustvo lekovite supstance i temperatura homogenizacije) i utvrđivanje njihove povezanosti sa kritičnim atributima kvaliteta razvijenih nanoemulzija (veličina kapi, indeks polidisperznosti, zeta potencijal i viskozitet), a u cilju definisanja optimalnih uslova koji će dovesti do nanoemulzija sa željenim fizičko-hemijskim karakteristikama. Dodatno, primenom tehnike reverzne dijalize sa vrećicama procenjena je brzina oslobađanja model lekovite supstance iz odabranih, optimizovanih nanoemulzija, uz karakterizaciju dobijenih profila oslobađanja primenom različitih matematičkih modela.

Imajući u vidu da sam nanoemulzioni sistem može da utiče na farmakokinteičko ponašanje inkorporirane lekovite supstance, i posledično na njen terapijski efekat, poseban cilj ovog istraživanja bio je da se ispituju farmakokinetički i *in vivo* profili dispozicije razvijenih formulacija nanoemulzija sa diazepamom i risperidonom kao model lekovitim supstancama i da se proceni uticaj sastava nanoemulzije, pre svega rastuće koncentracije ulja i vrste koemulgatora, na farmakokinetiku inkorporirane model lekovite supstance, uključujući efikasnost isporuke u mozak, nakon intraperitonealne primene serije nanoemulzija kod pacova. Pored toga, u cilju detaljnog razjašnjavanja da li bihejvioralni efekti lekovite supstance primenjene u vidu parenteralnih nanoemulzija mogu biti odraz profila koncentracija u plazmi i moždanom tkivu, sprovedena je farmakodinamska studija na pacovima, sa krajnjim ciljem utvrđivanja potencijalnih veza između fizičko-hemijskih osobina lekovite supstance inkorporirane u nanoemulzioni nosač i njene farmakokinetike, biodistribucije i farmakodinamike.

Prikazano istraživanje pokazalo je podesnost metodologije eksperimentalnog dizajna u proceni istovremenog uticaja različitih formulacionih i procesnih faktora i njihovih interakcija na fizičko-hemijska svojstva izrađenih nanoemulzija. Rezultati su pokazali da ne samo ispitivani pojedinačni faktori, već interakcije između ovih faktora, značajno

utiču na kritične karakteristike razvijenih nanoemulzionih sistema (veličinu kapi, indeks polidisperznosti, zeta potencijal, viskozitet). Fizičko-hemijska karakterizacija i procena stabilnosti pokazale su zadovoljavajuć opseg veličina kapi (160–220 nm), relativno usku raspodelu veličina ($< 0,15$), visoko površinsko naelektrisanje (oko -50 mV do -60 mV), nizak viskozitet (12 ± 9 mPa·s), kao i odličnu dugoročnu stabilnost (najmanje godinu dana na $25 \pm 2^\circ\text{C}$) i stabilnost nakon sterilizacije parom (121°C , 15 min) dizajniranih nanoemulzija, potvrđujući njihovu pogodnost za parenteralnu primenu i isporuku slabo rastvorljivih lekovitih supstanci. Mikroskopija atomskih sila je potvrdila rezultate određivanja veličine kapi, pokazujući ujednačenu distribuciju sferičnih kapi sa prosečnim dijametrom oko 200–250 nm, dok su rezultati diferencijalne skenirajuće kalorimetrije i FT-IR spektroskopije upućivali da su diazepam i risperidon molekularno dispergovani u ispitivanim uzorcima nanoemulzija, bez bilo kakve hemijske interakcije sa drugim sastojcima. *In vitro* ispitivanje brzine oslobađanja model lekovite supstance iz formulisanih parenteralnih nanoemulzija pokazalo je bifazne profile oslobađanja, sa 40–50% oslobođenog diazepamama nakon 60 min i preko 95% oslobođenog risperidona nakon 180 min, pri čemu se kinetika oslobađanja mogla opisati Korsmeyer–Peppas modelom. *In vivo* farmakokinetička studija odabranih nanoemulzija diazepamama sa rastućom koncentracijom uljane faze (20%, 30% i 40%, m/m smeše triglicerida srednje dužine lanca i sojinog ulja u odnosu 4:1), pokazala je diskretne razlike u farmakokinetici diazepamama, koje su se odlikovale brзом i intenzivnom inicijalnom distribucijom lekovite supstance u moždano tkivo pacova iz nanoemulzija sa 20% i 30% uljane faze, što ukazuje na njihovu primenljivost u urgentnim stanjima. Slično tome, različiti i nepravilni (nepredvidivi) farmakokinetički profili risperidona u moždanom tkivu pacova detektovani su nakon intraperitonealne primene odabranih nanoemulzija risperidona kostabilizovanih različitim koemulgatorima (polisorbat 80, poloksamer 188, Solutol HS 15), što ukazuje da je površina kapi nanoemulzija, tj. sastav međupovršinskog filma, najverovatnije ključni faktor u određivanju prolaska inkorporirane lekovite supstance kroz krvno-moždanu barijeru. Sa aspekta ciljne isporuke, moglo se zaključiti da bi među ispitivanim nanoemulzijama, nanoemulzija kostabilizovana polisorbatom 80 i nanoemulzija bez koemulgatora u sastavu, mogle biti najpogodnije za isporuku risperidona u mozak; rezultati farmakokinetičkih i ispitivanja distribucije u tkiva su pokazali poboljšanje vrednosti farmakokinetičkih parametara u

plazmi, mozgu i jetri pacova, što je rezultovalo 1,2–1,5 puta povećanom rlativnom biološkom raspoloživošću, 1,1–1,8 puta smanjenom distribucijom u jetru i oko 1,3 puta poboljšanim preuzimanjem u mozak ukupnog aktivnog oblika risperidona nakon intraperitonealne primene navedenih nanoemulzija, u poređenju sa rastvorom. U bihevioralnoj studiji, dve ispitivane nanoemulzije risperidona pokazale su izraženu redukciju bazalne i, što je još značajnije, amfetaminom-indukovane lokomotorne aktivnosti kod pacova, sa brzim početkom antipsihotičnog dejstva, pri čemu je efekat trajao najmanje 90 min nakon injektovanja.

Posmatrani zajedno, prikazani nalazi potvrđuju upotrebljivost razvijenih *tailor-made* parenteralnih nanoemulzija kao nosača za poboljšanu isporuku u mozak slabo rastvorljivih psihofarmakoloških lekovitih supstanci, što dalje ukazuje na njihovu obećavajuću primenu u hitnim stanjima.

Ključne reči: parenteralna nanoemulzija; slabo rastvorljiva lekovita supstanca; ciljna isporuka u mozak; eksperimentalni dizajn; mikroskopija atomskih sila; lek–nosač interakcija; stabilnost; tehnika reverzne dijalize sa vrećicama; farmakokinetika; antipsihotična efikasnost.

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska tehnologija

UDK broj: 661.12:615.015:615.215(043.3)

Parenteral nanoemulsions with poorly water-soluble psychopharmacological drugs: formulation, optimization and *in vivo* disposition evaluation

ABSTRACT

In order to provide rapid/controlled drug delivery to the brain and improve its bioavailability at the target site, and consequently its therapeutic effect, a number of key challenges must be overcome, primarily the restrictive properties of the blood–brain barrier as well as the critical properties of the drug itself (poor water-solubility, significant first-pass metabolism, nonspecific biodistribution, and *P*-glycoprotein efflux). Among the reported nanotechnological strategies for enhancing drug delivery and targeting to the brain, an increasing attention has been focused more recently on nanoemulsions as promising carriers for parenteral delivery of poorly water-soluble centrally-acting drugs, having in mind their numerous appealing features, including biocompatibility, biodegradability, physical stability, ease to scale up, high solubilization capacity for lipophilic drugs, possibly enhanced bioavailability, controlled drug release, and organ targeting. Although lipid nanoemulsions have been traditionally employed for parenteral nutrition and to solubilize and intravenously deliver several lipophilic drugs, additional efforts are required in order to optimize nanoemulsion formulation, stability, drug delivery and overall *in vivo* behavior, giving this topic a renewed and growing interest.

Based on this, the aim of the present work was to develop and optimize oil-in-water nanoemulsions for parenteral delivery of poorly water-soluble psychopharmacological drugs, and to evaluate their ability to improve the brain uptake of the incorporated drug. For this purpose, placebo and drug-loaded nanoemulsions were designed with the aid of experimental design, prepared by high pressure homogenization and thoroughly characterized for their droplet size, size distribution, surface charge, viscosity, morphology, drug–vehicle interactions, long-term stability, and stability to autoclaving. Diazepam, the referent benzodiazepine commonly used in preclinical studies of novel psychotropic drugs, and risperidone, a thoroughly examined and clinically proven atypical antipsychotic agent exhibiting a reduced propensity for causing extrapyramidal

side effects, were chosen as poorly water-soluble model compounds to be incorporated into nanoemulsion droplets. During the formulation development, a computer generated full factorial or general factorial experimental design was employed to identify and estimate the effects and interactions of multiple formulation and preparation parameters (oil content, lecithin type, co-emulsifier type, aqueous phase type, drug presence, and homogenization temperature) and to establish their relationships with critical quality attributes of developed nanoemulsions (droplet size, polydispersity index, zeta potential, and viscosity), in order to find optimal conditions leading to the nanoemulsions with desired physicochemical features. In addition, the *in vitro* release of model drug from selected optimized nanoemulsion formulations was also examined using the reverse dialysis bag technique, and drug release kinetics was evaluated through several mathematical models.

Bearing in mind that nanoemulsion system on its own may affect the pharmacokinetic behavior of incorporated drug, and consequently its therapeutic effect, the special objective of this work was to investigate the pharmacokinetic and *in vivo* disposition profiles of developed drug-loaded nanoemulsions and to evaluate the impact of nanoemulsion composition, particularly increasing oil content and co-emulsifier type, on drug pharmacokinetics, including brain targeting efficiency, after intraperitoneal administration of a series of nanoemulsions in rats. Furthermore, in order to elaborate whether the behavioral effects of drug delivered via parenteral nanoemulsions might have mirrored the plasma and brain drug concentration patterns, a pharmacodynamic study was carried out in rats, with the final aim of establishing prospective relationships between the physicochemistry of the drug incorporated in the carrier, and its pharmacokinetics, biodistribution and pharmacodynamics.

The present investigation showed the usefulness of experimental design methodology in the assessment of the simultaneous influence of several formulation and process factors and their interactions on the nanoemulsion physicochemical properties. The results indicated that not only factors alone, but also their interactions had significant effect on the critical nanoemulsion characteristics (droplet size, polydispersity index, zeta potential, viscosity). Physicochemical and stability characterization revealed the proper size range (160–220 nm), narrow size distribution (< 0.15), high surface charge (around -50 mV to -60 mV), low viscosity (12 ± 9 mPa·s), as well as excellent long-term

stability (at least one year at $25 \pm 2^\circ\text{C}$) and thermal sterilization stability (121°C , 15 min) of developed nanoemulsions, thus proving their suitability for parenteral administration and delivery of poorly water-soluble drugs. Atomic force microscopy corroborated the size measurement results, demonstrating uniform distribution of spherical droplets with the mean diameter around 200–250 nm, whereas differential scanning calorimetry and FT-IR spectroscopy indicated that diazepam and risperidone were molecularly dispersed in the investigated nanoemulsions, without chemical interactions with other ingredients. *In vitro* drug release study showed biphasic release profiles, with 40–50% of diazepam and above 95% of risperidone released from tested nanoemulsions within 60 min and 180 min, respectively, while the kinetic release process could be described by Korsmeyer–Peppas model.

In vivo pharmacokinetic study of selected diazepam-loaded nanoemulsions with increasing oil content (20%, 30%, and 40%, w/w of medium-chain triglycerides–soybean oil mixture at 4:1 ratio) demonstrated subtle differences in diazepam pharmacokinetics, characterized by fast and intense initial distribution into rat brain of diazepam from nanoemulsions containing 20% and 30% of oil phase, suggesting their applicability in urgent situations. Similarly, different and erratic brain profiles of risperidone were found in rats after intraperitoneal administration of selected nanoemulsions costabilized with different co-emulsifiers (polysorbate 80, poloxamer 188, Solutol HS 15), suggesting that nanoemulsion droplet surface, i.e., composition of the stabilizing film, was probably the key factor determining the blood–brain barrier passage of risperidone. From the targeting point of view, it could be deduced that among the tested nanoemulsions, the polysorbate 80-costabilized one and coemulsifier-free formulation could be preferable for risperidone delivery to the brain; pharmacokinetic and tissue distribution results demonstrated improved plasma, liver, and brain pharmacokinetic parameters, resulting in 1.2–1.5-fold increased relative bioavailability, 1.1–1.8-fold decreased liver distribution, and about 1.3-fold improved brain uptake of risperidone active moiety following intraperitoneal administration of these nanoemulsions relative to solution in rats. In behavioral study, two investigated risperidone-loaded nanoemulsions showed pronounced reduction in basal and, more pertinently, amphetamine-induced locomotor activity in rats, with an early onset of antipsychotic action, and this effect lasted at least 90 min after drug injection.

Together, these findings corroborate the applicability of developed parenteral nanoemulsions with tailor-made properties as carriers for enhanced brain delivery of poorly water-soluble psychopharmacological drugs, further suggesting their promise in emergency situations.

Keywords: parenteral nanoemulsion; poorly water-soluble drug; brain targeting; experimental design; atomic force microscopy; drug–vehicle interaction; stability; reverse dialysis bag technique; pharmacokinetics; antipsychotic efficiency.

Scientific field: Pharmacy

Specific scientific field: Pharmaceutical Technology

UDK No: 661.12:615.015:615.215(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Parenteralne nanoemulzije – Definicija i klasifikacija	3
1.1.1. Prva generacija nanoemulzija.....	4
1.1.2. Druga generacija nanoemulzija.....	6
1.1.3. Nanoemulzije druge generacije sa produženim vremenom cirkulacije u krvi – Ciljna isporuka lekovite supstance	8
1.1.4. Treća generacija nanoemulzija.....	9
1.2. Sastav nanoemulzija – Izbor ekscipijenas.....	10
1.2.1. Komponente uljane faze.....	13
1.2.2. Emulgatori.....	15
1.2.3. Komponente vodene faze	18
1.3. Izrada nanoemulzija	20
1.3.1. Homogenizacija pod visokim pritiskom	21
1.3.2. Mikrofluidizacija.....	25
1.3.3. Primena ultrazvuka.....	26
1.3.4. Metod difuzije rastvarača/Spontani emulgujući metod.....	27
1.3.5. Fazno-inverzni metod.....	28
1.4. Metodologija eksperimentalnog dizajna	30
1.5. Fizičko-hemijska karakterizacija i procena stabilnosti nanoemulzija	33
1.5.1. Analiza veličine i raspodele veličina kapi.....	34
1.5.2. Mikroskopska analiza.....	35
1.5.3. Analiza zeta potencijala	37
1.5.4. Reološka analiza.....	38
1.5.5. Analiza fazne raspodele lekovite supstance u nanoemulziji	39
1.5.6. Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija.....	40
1.6. <i>In vitro</i> ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance iz nanoemulzija	43
1.7. Sudbina nanoemulzija u organizmu nakon parenteralne primene	47
1.7.1. Mehanizmi eliminacije parenteralnih nanoemulzija	48
1.7.1.1. Eliminacija nanoemulzija zasnovana na metabolizmu endogenih hilomikrona.....	48

1.7.1.2. Eliminacija nanoemulzija pomoću mononuklearnog fagocitnog sistema	49
1.7.2. Biodistribucija parenteralnih nanoemulzija	52
1.7.3. Koncept diferencijalne adsorpcije proteina.....	55
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	59
3. EKSPERIMENTALNI DEO	63
3.1. Materijali.....	63
3.2. Metode	63
3.2.1. Ispitivanje rastvorljivosti.....	63
3.2.2. Izrada nanoemulzija	64
3.2.3. Metodologija eksperimentalnog dizajna	66
3.2.4. Karakterizacija nanoemulzija.....	69
3.2.4.1. Analiza veličine kapi	69
3.2.4.2. Mikroskopska analiza	70
3.2.4.3. Analiza zeta potencijala.....	71
3.2.4.4. Reološka analiza	71
3.2.4.5. Merenje pH vrednosti	72
3.2.4.6. Merenje električne provodljivosti.....	72
3.2.4.7. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija	72
3.2.4.8. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom/FT-IR spektroskopija.....	73
3.2.5. Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija	73
3.2.6. <i>In vitro</i> ispitivanje brzine oslobađanja model lekovite supstance iz nanoemulzija	73
3.2.7. Farmakokinetički i bihejvioralni eksperimenti	74
3.2.7.1. Životinje.....	74
3.2.7.2. <i>In vivo</i> farmakokinetičke i studije biodistribucije	74
3.2.7.3. Studije vezivanja za proteine plazme i moždanog tkiva – Određivanje slobodne frakcije lekovite supstance	78
3.2.7.4. <i>In vivo</i> farmakodinamska studija.....	79
3.2.8. Statistička analiza.....	80
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	81

4.1. Rezultati i diskusija prve faze eksperimentalnog rada.....	81
4.1.1. Izrada i karakterizacija nanoemulzija.....	81
4.1.2. Metodologija eksperimentalnog dizajna	89
4.1.2.1. Pun faktorski dizajn	89
4.1.2.2. Generalni faktorski dizajn	97
4.1.3. Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija dizajniranih prema punom faktorskom i generalnom faktorskom dizajnu	105
4.2. Rezultati i diskusija druge faze eksperimentalnog rada.....	108
4.2.1. Nanoemulzije sa inkorporiranom model lekovitom supstancom dobijene variranjem udela uljane faze i tipa koemulgatora – fizičko-hemijska karakterizacija i procena dugoročne stabilnosti.....	108
4.2.1.1. Nanoemulzije diazepama dobijene variranjem udela uljane faze	108
4.2.1.2. Nanoemulzije risperidona dobijene variranjem tipa koemulgatora.....	112
4.2.2. Interakcije lek–nosač i karakterizacija nanoemulzija primenom tehnika DSC, FT-IR i AFM	119
4.2.3. <i>In vitro</i> ispitivanje brzine oslobađanja model lekovite supstance iz nanoemulzija	126
4.3. Rezultati i diskusija treće faze eksperimentalnog rada	131
4.3.1. <i>In vivo</i> farmakokinetičke i studije biodistribucije	131
4.3.1.1. Nanoemulzije sa diazepamom kao model lekovitom supstancom	131
4.3.1.2. Nanoemulzije sa risperidonom kao model lekovitom supstancom	135
4.3.2. <i>In vivo</i> farmakodinamska studija na primeru nanoemulzija risperidona.....	151
5. ZAKLJUČAK.....	156
6. LITERATURA	163
7. PRILOZI.....	180
7.1. Publikovani i saopšteni radovi koji čine deo doktorske disertacije	180
7.2. Biografija autora	183
7.3. Izjava o autorstvu.....	185
7.4. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije.....	186
7.5. Izjava o korišćenju	187

1. UVOD

Ulje-u-vodi (U/V) nanoemulzije sa veličinom kapi u submikronskom opsegu, najčešće 200–400 nm, više od pola veka bezbedno se koriste u parenteralnoj ishrani za isporuku esencijalnih masnih kiselina i velike količine energije. Imajući u vidu dobro dokumentovanu biokompatibilnost, biodegradabilnost, dobru fizičku (kinetičku) stabilnost i relativno jednostavnu proizvodnju, poslednjih godina postoji sve veće interesovanje za razvoj nanoemulzija kao obećavajućih koloidnih nosača lekovitih/biološki aktivnih supstanci za različite puteve primene, kao što su peroralna, rektalna, dermalna/transdermalna, oftalmološka, intranazalna, i posebno parenteralna primena (Baker i Naguib, 2005; Hörmann i Zimmer, 2016; Müller i sar., 2012; Tamilvanan, 2009; 2004; Sznitowska i sar., 2001a, 2001b). Uzimajući u obzir karakteristike formulacije i fizičko-hemijska svojstva, potencijalne prednosti nanoemulzija kao nosača lekovitih supstanci jesu niska koncentracija surfaktanta, ujednačena i veoma mala veličina kapi, nizak viskozitet i visok solubilizacioni kapacitet za lipofilne lekovite supstance. Dodatno, poboljšana penetracija kroz biološke barijere, povećanje biološke raspoloživosti, smanjenje iritacije i/ili toksičnosti, produženo oslobađanje i ciljna isporuka lekovite supstance u različite organe (pr. mozak) mogu se očekivati nakon primene nanoemulzionih sistema (Araújo i sar., 2011; Benita i Levy, 1993; Constantinides i sar., 2008; Hippalgaonkar i sar., 2010; Hörmann i Zimmer, 2016; Klang i Valenta, 2011; Sadurni i sar., 2005; Sasikumar i Kamalasanan, 2017; Singh i sar., 2017; Tamilvanan, 2009; Wu, 2007; Zhou i sar., 2010).

Da bi se povećala biološka raspoloživost i postigla terapijska koncentracija lekovite supstance na ciljnom mestu delovanja, neophodno je prevazići različite biološke barijere koje nameće određeni put primene. Tako na primer, i pored značajnog napretka postignutog u razvoju savremenih strategija za ciljnu isporuku lekova u mozak, efikasno lečenje bolesti/poremećaja centralnog nervnog sistema (CNS), kao što su neoperativni tumori, multipla skleroza, Parkinsonova bolest, Alchajmerova bolest, epilepsija ili psihijatrijski poremećaji, ostaje izazov zbog krvno-moždane barijere (KMB) koja je glavna prepreka da lek, u terapijski relevantnoj koncentraciji, dospe na mesto dejstva (Shinde i sar., 2011; Wong i sar., 2012). Među strategijama koje se koriste za savladavanje ove barijere i ciljnu isporuku lekova u mozak, kako bi se poboljšao

terapijski odgovor i smanjili neželjeni efekti, koloidni nanočestični sistemi privlače sve veću pažnju. Među lipidnim nanonosačima, nanoemulzije, posebno one sa modifikovanom površinom (oblaganje hidrofiličnim, polietoksilovanim surfaktantima, PEG-ilovanje), pružaju dodatnu prednost jer mogu da zaobiđu retikuloendotelni sistem (RES) u većem stepenu, čime se produžava vreme zadržavanja u cirkulaciji i povećava potencijal za poboljšanu isporuku lekovite supstance u mozak (Hörmann i Zimmer, 2016; Kumar i sar., 2009, 2008; Rahman i sar., 2010; Sasikumar i Kamalasanan, 2017; Shinde i sar., 2011).

Na osnovu navedenih činjenica, ne iznenađuje da nanoemulzije predstavljaju privlačnu alternativu za isporuku slabo rastvorljivih lekovitih supstanci koje deluju na CNS (kakve su diazepam i risperidon) parenteralnim putem, naročito u urgentnim stanjima (kada je potrebna brza isporuka leka u mozak) i kada postoje problemi sa gutanjem. Mada se „lipidne“ nanoemulzije tradicionalno primenjuju u parenteralnoj ishrani, a neke su klinički odobrene za intravensku isporuku lipofilnih lekova (pr. diazepam, propofol, etomidat) (Constantinides i sar., 2008; Li i sar., 2011; Wu, 2007), do sada je publikovano samo nekoliko radova na temu nanoemulzija kao perspektivnih nosača za poboljšanu isporuku lekovitih supstanci u mozak nakon parenteralne primene (Kandadi i sar., 2011; Madhusudhan i sar., 2007; Prabhakar i sar., 2013; Shah i sar., 2014). Visoki zahtevi koje u pogledu kvaliteta i bezbednosti nameće parenteralni put primene, zatim specifične karakteristike psihofarmakoloških lekovitih supstanci (slaba rastvorljivost u vodi, značajan metabolizam prvog prolaza, nespecifična biodistribucija, efluks od strane P-glikoproteina), uticaj različitih faktora (formulacionih, procesnih i prisustva lekovite supstance) na fizičko-hemijska svojstva i stabilnost nanoemulzija, kao i uticaj samog nanoemulzionog sistema kao nosača na ponašanje inkorporirane lekovite supstance (oslobađanje iz nanoemulzije, farmakokinetičke performanse i, posledično, terapijski efekat), čine razvoj parenteralnih nanoemulzija naročito izazovnim i zahtevaju ulaganje određenih napora u cilju optimizacije formulacije, stabilnosti, isporuke lekova, i uopšte *in vivo* ponašanja ovih sistema (Floyd, 1999; Hörmann i Zimmer, 2016; Klang i Valenta, 2011; Li i sar., 2011; Sasikumar i Kamalasanan, 2017; Singh i sar., 2017).

1.1. Parenteralne nanoemulzije – Definicija i klasifikacija

Nanoemulzije se definišu kao termodinamički nestabilne koloidne disperzije sastavljene od dve tečnosti koje se ne mešaju (ulje i voda), pri čemu je jedna tečnost dispergovana u drugoj (uz dodatak emulgatora) u vidu malih, sferičnih kapi. Nanoemulzije mogu biti tipa ulje-u-vodi (U/V) ili voda-u-ulju (V/U), zavisno od toga da li je ulje, u vidu kapi, dispergovano u vodi, ili obrnuto (McClements, 2012; Tamilvanan 2009; 2004). Strogo gledano, nanoemulzije su emulzije sa veličinom kapi ispod 100 nm, analogno nanočesticama iste veličine (Henry i sar., 2009; Mason i sar., 2006). Danas se, međutim, ovaj termin koristi za sve metastabilne emulzije sa veličinom kapi ispod jednog mikrona, koje se generalno nazivaju submikronskim emulzijama (Klang i Valenta, 2011). U principu, nanoemulzije (poznate i kao miniemulzije, ultrafine emulzije, submikronske emulzije) uglavnom se opisuju kao U/V emulzije sa veličinom kapi ispod 1000 nm, najčešće u rasponu 100–500 nm (Klang i sar., 2012; Klang i Valenta, 2011; Li i sar., 2011), mada se navodi i opseg veličina 50–200 nm (Tadros i sar., 2004). Zavisno od veličine kapi, nanoemulzije mogu biti translucetne ili transparentne (veličina kapi ispod 100 nm) i neprovidne ili mlečne (veličina kapi iznad 100 nm), a plavkasta nijansa ukazuje na pojavu Rejljevog rasipanja svetlosti od malih kapi nanoemulzije (Klang i Valenta, 2011; Mason i sar., 2006).

Prve nanoemulzije, poznate kao lipidne injekcione emulzije ili intravenske emulzije masti, uvedene su u kliničku praksu pre više od pola veka i od tada se uspešno koriste kao visokokalorični, neglukozni izvor energije i esencijalnih masnih kiselina u parenteralnoj ishrani (Buys i sar., 2015; Hörmann i Zimmer, 2016). Zahvaljujući jedinstvenim karakteristikama kao što su biokompatibilnost, relativno jednostavna proizvodnja, fizička stabilnost, i pre svega povećana solubilizacija lipofilne lekovite supstance, poboljšana penetracija kroz biološke barijere, te povećana biološka raspoloživost (Rossi i Leroux, 2007), poslednjih godina, polje terapijske nenutritivne primene ovih submikronskih lipidnih emulzija prošireno je na njihovu upotrebu (1) kao antidota („*lipid rescue*“) u tretmanu sistemske toksičnosti lokalnim anestheticima ili drugih lipofilnih lekova (pr. blokatori kalcijumovih kanala, beta-blokatori, psihotropni lekovi, antiaritmici); (2) kao obećavajućeg adjuvansa u tretmanu miokardijalnog ishemijsko-reperfuzionog oštećenja; i posebno (3) kao nosača slabo rastvorljivih,

lipofilnih lekovitih supstanci za različite puteve primene, naročito za parenteralnu primenu (Buys i sar., 2015).

1.1.1. Prva generacija nanoemulzija

Idući putem razvoja ultimativno boljeg koloidnog nosača lekovite supstance kako bi se omogućila njena specifična, ciljna isporuka u određene organe/delove tela i/ili povećala resorpcija, parenteralne nanoemulzije mogu se klasifikovati u tri generacije (Tamilvanan, 2009; 2004). Nanoemulzije prve generacije primarno se smatraju izvorom energije/kalorija, odnosno izvorom hranljivih masti – triglicerida, koji se u organizmu metabolišu do (esencijalnih) masnih kiselina; tradicionalno se primenjuju u parenteralnoj ishrani u vidu intravenske infuzije, samostalno ili u kombinaciji sa drugim izvorima energije (glukoza, aminokiseline), kod pacijenata koji ne mogu da uzimaju hranu peroralnim putem. Strukturno, ove nanoemulzije predstavljaju U/V submikronske emulzije kapi triglicerida (uglavnom sojinog ulja, alternativno smeše sojinog ulja sa trigliceridima srednje dužine lanca, maslinovim ili ribljim uljem), stabilizovanih fosfolipidima iz jajeta, sa prosečnim dijametrom oko 160–400 nm i negativno naelektrisanom površinom. Pored toga, sadrže glicerol za podešavanje toničnosti, što između ostalog omogućava bezbednu primenu u venu, i α -tokoferol kao antioksidans (Tamilvanan, 2009; 2004; Teitelbaum i sar., 2015).

Unutrašnja struktura nanoemulzija je složena i čine je raznovrsne čestice, naime, uljane kapi obložene monoslojem emulgatora, uljane kapi obložene oligoslojevima emulgatora, dvostruke emulzije kapi, i verovatno male unilamelarne vezikule. Nakon intravenske primene, ove nanoemulzije imitiraju endogene/prirodne lipoproteine bogate trigliceridima, kakvi su hilomikroni, u pogledu brzog vezivanja apolipoproteina, lipolize od strane lipoproteinske lipaze i preuzimanja u jetru (Tamilvanan, 2009; 2004). I pored višedecenijske uspešne primene u parenteralnoj ishrani, prva generacija lipidnih emulzija i dalje predstavlja aktuelni predmet izučavanja sa aspekta sastava (odnos omega-6 i omega-3 nezasićenih masnih kiselina), stabilnosti (veličina kapi), doziranja, brzine infuzije, te bezbednosti primene, kako bi se izbegli eventualni neželjeni efekti (imunološki, inflamatorni, oštećenje jetre, sindrom predoziranja mastima) i obezbedila najveća korist za pacijenta (Driscoll, 2015; Teitelbaum i sar., 2015). Primeri odabranih, komercijalno dostupnih nanoemulzija za parenteralnu ishranu prikazani su u tabeli 1.1.

Tabela 1.1. Primeri registrovanih nanoemulzija za parenteralnu ishranu (prilagođeno iz Rozentur i sar., 2010)

Zaštićeni naziv preparata	Sastav (% m/v)			
	Ulje	Emulgator/ Stabilizator	Osmotski agens	Proizvođač
Intralipid® 10%/20%	Sojino ulje 10%/20%	Lecitin jajeta 1,2%	Glicerol 2,25%	Fresenius Kabi
Ivelip® 10%/20%	Sojino ulje 10%/20%	Lecitin jajeta 1,2%; Natrijum-oleat 0,03%	Glicerol 2,5%	Clintec/ Baxter
Lipofundin® 10%	Ulje pamuka 10%	Sojin lecitin 0,75%	Sorbitol 5%	B. Braun
Lipofundin® MCT/LCT 10%/20%	Sojino ulje 5%/10%, MCT 5%/10%	Lecitin jajeta 0,8%/1,2%	Glicerol 2,5%	B. Braun
Lipofundin® S 10%/20%	Sojino ulje 10%/20%	Sojin lecitin 0,75%/1,2%	Ksilitol 5%	B. Braun
Lipoplus Lipidem® 20%	Sojino ulje 10%, MCT 8%, Omega-3 TG 2%	Lecitin jajeta 1,2%	Glicerol 2,5%	B. Braun
Liposyn® 10%/20%	Suncokretovo ulje 10%/20%	Lecitin jajeta 1,2%	Glicerol 2,5%	Abbott
Lipovenoes® 10% PLR	Sojino ulje 10%	Lecitin jajeta 0,6%	Glicerol 2,5%	Fresenius Kabi
Lipovenoes® MCT 20%	Sojino ulje 10%, MCT 10%	Lecitin jajeta 1,2%; Natrijum-oleat 0,03%	Glicerol 2,5%	Fresenius Kabi
SMOF lipid® 20%	Sojino ulje 6%, MCT 6%, Maslinovo ulje 5%, Riblje ulje 3%	Lecitin jajeta 1,2%	Glicerol 2,5%	Fresenius Kabi
ClinOleic® 20%	Sojino ulje 4% Maslinovo ulje 16%	Lecitin jajeta 1,2%; Natrijum-oleat 0,03%	Glicerol 2,25%	Clintec/ Baxter
Omegaven® 10%	Riblje ulje 10%	Lecitin jajeta 1,2%	Glicerol 2,5%	Fresenius Kabi
Structolipid® 20%	Strukturirani TG 20% (Sojino ulje 10%, MCT 10%, LCFA: MCFA 64:36	Lecitin jajeta 1,2%	Glicerol 2,2%	Fresenius Kabi

MCT: trigliceridi srednje dužine lanca dobijeni iz kokosovog ili palminog ulja; TG: trigliceridi;
LCFA: dugolančane masne kiseline; MCFA: masne kiseline srednje dužine lanca.

1.1.2. Druga generacija nanoemulzija

Problem slabe rastvorljivosti lekovitih supstanci i njihova formulacija već godinama privlači sve veću pažnju i predstavlja jednu od vodećih tema u razvoju farmaceutskih preparata. Do sada, oko 10% lekova prisutnih na tržištu, 40% lekova u različitim fazama razvoja u farmaceutskoj industriji, i čak oko 60% novosintetisanih lekovitih supstanci-kandidata pokazuje slabu rastvorljivost (manje od 0,1 mg/L) i, posledično, smanjenu biološku raspoloživost. Ako se tome doda i metabolizam prvog prolaza, efluks od strane *P*-glikoproteina, kao i potreba za brzim nastupom dejstva u stanjima hitnosti, ili nemogućnost uzimanja oralnih oblika, razvoj parenteralnih preparata slabo rastvorljivih lekovitih supstanci izgleda kao razumna, ali ne i jednostavna alternativa (Müller i sar., 2004). Vrlo često, konvencionalni pristupi kao što su podešavanje pH vrednosti, upotreba korastvarača, kompleksiranje sa ciklodekstrinima, solubilizacija u smeši surfaktanta i organskog rastvarača, i njihove kombinacije, nisu dovoljni da se postignu željeni rezultati. U tom slučaju, koloidni nanočestični sistemi poput liposoma, čvrstih lipidnih nanočestica, nanosuspenzija i nanoemulzija mogu imati prednost (Rabinow, 2004; Strickley, 2004).

Pored pogodnih fizičko-hemijskih karakteristika, sposobnost solubilizacije značajnih količina lipofilne lekovite/biološki aktivne supstance u uljanoj fazi nanoemulzije ili na ulje–voda međupovršini, postavlja nanoemulzione sisteme na mesto obećavajućih nosača za isporuku slabo rastvorljivih lekova, sa širokim spektrom primena: od povećane solubilizacije i stabilizacije inkorporirane supstance, preko poboljšane penetracije kroz biološke barijere i povećane biološke raspoloživosti, do produženog oslobađanja i ciljne isporuke leka u određene organe (pr. mozak). Nanoemulzije koje se primenjuju u ove svrhe označavaju se kao druga generacija nanoemulzija (Tamilvanan, 2009; 2004). Primeri klinički odobrenih lipidnih nanoemulzija za intravensku isporuku lipofilnih lekovitih supstancu prikazani su u tabeli 1.2.

Tabela 1.2. Primeri registrovanih nanoemulzija za intravensku primenu slabo rastvorljivih lekovitih supstanci (Rossi i Leroux, 2007; Rozentur i sar., 2010)

Zaštićeni naziv preparata	Lekovita supstanca	Indikacija/ Upotreba	Sastav	Proizvođač
Diazemuls®	Diazepam	<i>Status epilepticus</i> , eksitacija, anksioznost,	Sojino ulje, acetilovani monogliceridi,	Kabi-Pharmacia, Švedska
Diazepam-Lipuro®	Diazepam	napetost, konvulzije, mišićni spazam, tetanus, delirijum	lecitin jajeta, glicerol, voda za injekcije	B. Braun, Nemačka
Etomidate-Lipuro®	Etomidat	Opšta Anestezija	Lipofundin MCT/LCT	B. Braun, Nemačka
Diprivan®	Propofol	Opšta Anestezija	Intralipid	AstraZeneka, Velika Britanija
Propofol-Lipuro®	Propofol	Opšta Anestezija	Sojino ulje, trigliceridi srednje dužine lanca, lecitin jajeta, natrijum- oleat, glicerol, voda za injekcije	B. Braun, Nemačka
Limethason®	Deksametazon- palmitat	Hronični reumatoidni artritis	Intralipid	Green Cross, Japan
Lipo-NSAID® Ropion®	Flurbiprofen- aksetil	Postoperativni i kancerski bol	Intralipid	Kaken Pharmaceutical Co., Japan
Liple® (Lipo-PGE1)	Alprostadil (prostaglandin E1)	Oboljenja perifernog vaskularnog sistema, otvoreni <i>ductus arteriosus</i>	Sojino ulje, lecitin jajeta, oleinska kiselina, glicerol	Green Cross, Japan
Cleviprex®	Klevidipin-butirat	Snižavanje krvnog pritiska	Intralipid	The Medicine Co., SAD
Vitalipid®	Vitamins A, D ₂ , E, K ₁	Parenteralna ishrana	Intralipid	Kabi-Pharmacia, Švedska
Fluosol-DA®	Perfluorodekalin, Perfluorotripropil- amin	Veštački supstituenti krvi	Lecitin jajeta, Pluronic F-68, kalijum-oleat, glicerol	Green Cross, Japan

1.1.3. Nanoemulzije druge generacije sa produženim vremenom cirkulacije u krvi – Ciljna isporuka lekovite supstance

Imajući u vidu brzu eliminaciju parenteralno primenjenih nanoemulzija iz sistemske cirkulacije, bilo preuzimanjem od strane RES-ćelija (makrofage jetre i slezine) ili ulaskom u metabolički put hilomikrona, kada se dizajniraju kao nosači za ciljnu isporuku lekovite supstance u organe/tkiva koja nisu RES, ili da služe kao cirkulišući rezervoar iz koga se lekovita supstanca postepeno (konstantno) oslobađa, veoma je važno da se obezbedi dovoljno dugo vreme zadržavanja ovih nanoemulzija u cirkulaciji kako bi one odgovorile svojoj nameni (Hörmann i Zimmer, 2016; Liu i Liu, 1995; Tamilvanan, 2009; 2004). Smatra se, na primer, da preopterećenje ili zasićenje RES-receptora ili iscrpljivanje faktora opsonizacije usled prisustva velikog broja malih nanoemulzionih kapi, primenom pojedinačnih velikih doza ili ponovljene primene nanoemulzija, može da dovede do povećanog zadržavanja injektovanih nanoemulzionih kapi u cirkulaciji i, posledično, da utiče na profil distribucije lekovite supstance (Tamilvanan, 2009; 2004). Pokazano je, takođe, da prisustvo sfingomijelina na uljevodna međupovršini može da produži vreme cirkulacije nanoemulzije u krvi i smanji njeno preuzimanje u jetru i slezinu (Takino i sar., 2004); sfingomijelin ima veći sadržaj zasićenih acil lanaca i veći kapacitet za stvaranje vodoničnih veza u poređenju sa prirodnim fosfatidilholinom, što može da izmeni rigidnost monosloja i interakcije sa komponentama krvi (Rossi i Leroux, 2007).

Među značajnim mehanizmima za produženje poluvremena cirkulacije u krvi, dva do sada najviše ispitivana pristupa kod nanoemulzija druge generacije podrazumevaju upotrebu strukturiranih lipida (pr. 1,3-specifični trigliceridi, Hedeman i sar., 1996) u uljanom jezgru finalne nanoemulzije ili, više realističnu, modifikaciju površine nanoemulzionih kapi upotrebom koeumulgatora koji sadrže visoko hidrofилne polioksietilen (POE)- i polietilenglikol (PEG)-lance (Hörmann i Zimmer, 2016; Liu i Liu, 1995; Tamilvanan, 2009; 2004). Modifikacijom ujjane faze ili U/V međupovršinskog filma nanoemulzije omogućava se, naime, izbegavanje lipolize pod dejstvom lipoproteinske lipaze (LPL), adsobovanje apolipoproteina i preuzimanje u jetru, čime se može produžiti vreme cirkulacije u plazmi i samim tim izmeniti *in vivo* dispozicija inkorporirane lekovite supstance nakon parenteralne primene (Tamilvanan, 2009; 2004).

Zahvaljujući efektu sternog odbijanja i povećanju hidrofilitnosti površine, dodatak surfaktanata na bazi POE (pr. polisorbit 80, poloksamer 188) u inače hidrofobne fosfolipidima-stabilizovane nanoemulzije sprečava adsorbovanje proteina plazme (opsonina) te prepoznavanje od strane fagocitnih ćelija, čime se produžava vreme cirkulacije u krvi i, u izvesnoj meri, omogućava pasivna ciljna isporuka lekovite supstance u određene organe. Slično tome, cirkulišuće vreme nanoemulzija može značajno da se produži i oblaganjem površine nanoemulzionih kapi PEG-om, upotrebom PEG-konjugovanih fosfolipida, kakav je PEG-fosfatidiletanolamin – strategija poznata kao PEG-ilovanje (Hörmann i Zimmer, 2016; Liu i Liu, 1995; Tamilvanan, 2009; 2004). Aktivnost PEG derivata u produženju vremena cirkulacije nanoemulzije zavisi od dužine PEG lanca, gustine na površini kapi i konformacije (Hörmann i Zimmer, 2016; Liu i Liu, 1995). Pored toga što obezbeđuje sternu stabilizaciju, prisustvo PEG lanca na površini nanonanoemulzije, takođe, omogućava kovalentno vezivanje ciljnih liganada – antitela, na krajevima PEG lanaca, čime se povećava specifičnost nosača za ciljna tkiva i obezbeđuje aktivna isporuka lekovite supstance (Chen i Liu, 2012; Hörmann i Zimmer, 2016; Tamilvanan, 2009; 2004).

Budućnost parenteralnih nanoemulzija u pogledu ciljne isporuke (pasivne i aktivne) leži upravo u njihovoj funkcionalizaciji – površinskoj modifikaciji/PEG-ilovanju; vezivanjem „ciljnih liganada“ kao što su monoklonska antitela (OX26 i 8D3 antitela usmerena na transferinski receptor; 83-14 antitelo usmereno na insulinski receptor), ćelijski penetrirajući peptidi (trans-aktivator transkripcije, TAT) i/ili supstrati za receptore (apolipoproteini, transferin, laktoferin), isporuka lekovite supstance u inače teško dostupne organe/tkiva, u ovom slučaju CNS, može biti značajno poboljšana (Wong i sar., 2012).

1.1.4. Treća generacija nanoemulzija

Povezivanje prednosti sternog stabilizujućeg efekta emulgatora i pozitivno naelektrisane površine nosača dovelo je do razvoja treće generacije nanoemulzija koje odlikuje jedinstvena osobina: produženo vreme zadržavanja u plazmi nakon parenteralne primene (usled smanjene tendencije preuzimanja u RES) i olakšana penetracija lekovite supstance u ćelije, verovatno mehanizmom endocitoze (usled pogodne elektrostatičke interakcije pozitivno naelektrisanih kapi sa negativno naelektrisanim molekulima

bioloških membrana). Katjonizacija površine nanoemulzionih kapi može se postići dodatkom katjonskih supstanci poput lipida (stearilamin, oleilamin), polimera (hitozan) i surfaktanata (cetiltrimetilamonijum-bromid), tokom izrade nanoemulzija. Pozitivno naelektrisane nanoemulzije mogu se koristiti kao nosači širokog opsega različitih supstanci – lipofilnih, amfifilnih, polianjonskih, uključujući DNK i oligonukleotide (Tamilvanan, 2009; 2004).

1.2. Sastav nanoemulzija – Izbor ekscipijenasa

Uspeh nanoemulzija kao sistema za isporuku lekovitih supstanci kritično je povezan sa njihovim sastavom (uljana faza, vodena faza, emulgator, i često koemulgator); izbor odgovarajućih funkcionalnih, biokompatibilnih ekscipijenasa, naročito surfaktanata/emulgatora, u odgovarajućoj koncentraciji, jedan je od ključnih faktora koji određuje formiranje, stabilnost, fizičko-hemijska i međupovršinska svojstva, kao i funkcionalne performanse izrađenih nanoemulzionih sistema. Surfaktanti, naime, mogu da utiču na interakciju nosača sa ciljnim mestom dejstva i/ili inkorporiranom lekovitom supstancom, te na oslobađanje lekovite supstance, dispoziciju i terapijski efekat. Prema tome, racionalan izbor odgovarajućih ekscipijenasa, naročito emulgator/koemulgator smeša (vrsta, poreklo, priroda, koncentracija, međupovršinska svojstva), od presudnog je značaja za efikasan dizajn nanoemulzija kao nosača lekovitih/biološki aktivnih supstanci za različite, specifične primene (Adjonu i sar., 2014; Klang i Valenta, 2011; McClements, 2011).

Bilo da se koriste u parenteralnoj ishrani ili kao nosači lekovitih supstanci, parenteralne nanoemulzije, kao i svi parenteralni preparati, treba da zadovolje sve zahteve koje nameće parenteralni put primene; treba da budu sterilne, apirogene, izotonične, biokompatibilne, biodegradabilne, netoksične, neimunogene, da ne izazivaju iritaciju i hemolizu, i da su fizički i hemijski stabilne. Pored toga, posebni zahtevi postavljaju se za veličinu kapi, koja treba da bude dovoljno mala kako bi se izbegle tromboembolijske komplikacije (manja od 1 μm , obično u opsegu 100–500 nm), i sadržaj masnih kiselina, koji treba da bude strogo kontrolisan kako bi se izbegli negativni sporedni efekti na imuni sistem, jetru i pluća. Američka farmakopeja u monografiji „Lipidne injekcione emulzije“ navodi zahteve za kvalitet koje lipidne emulzije za parenteralnu primenu treba

da ispune i održe tokom roka upotrebe (najčešće 18–24 meseca): prosečna veličina kapi ≤ 500 nm; zaprinski procenat uljanih kapi većih od 5 μm (PFAT₅) $\leq 0,05\%$; pH vrednost 6,0–9,0; sadržaj masnih kiselina $\leq 0,07$ mEq/g (Driscoll, 2015; 2006). Da bi se ovi zahtevi ispunili, ekscipijensi i uslovi proizvodnje moraju biti pažljivo odabrani. U tabeli 1.3 dat je opšti pregled sastava nanoemulzija za parenteralnu primenu.

Tabela 1.3. Reprezentativna lista ulja, emulgatora i drugih pomoćnih supstanci korišćenih u formulacijama parenteralnih nanoemulzija (prilagođeno iz Cannon i sar., 2008; Floyd, 1999; Rossi i Leroux, 2007; Rozentur i sar., 2010)

Ekscipijensi	Uobičajen i/ili hemijski naziv/Zaštićen naziv/ Strukturna formula	Preporučena koncentracija (%)
Ulja	Sojino ulje	10–20
	Suncokretovo ulje	10–20
	Susamovo ulje	20
	Pamukovo ulje	10
	Maslinovo ulje	20
	Ricinusovo ulje	20
	Riblje ulje	10
	Frakcionisano kokosovo ulje/Trigliceridi srednje dužine lanca, MCT/Miglyol® 810, 812; Neobee® M5; Captex® 300	10–20
	Vitamin E/D- α -tokoferol	–
	Skvalen	10
	Lecitin (iz jajeta, iz soje); Fosfatidilholin/ Lipoid® E80; Lipoid® S75; Phospholipon® 90	1–3
Emulgatori/ Koemulgatori	<p>R₁, R₂ = Ostatak masne kiseline</p>	

Tabela 1.3. (nastavak)

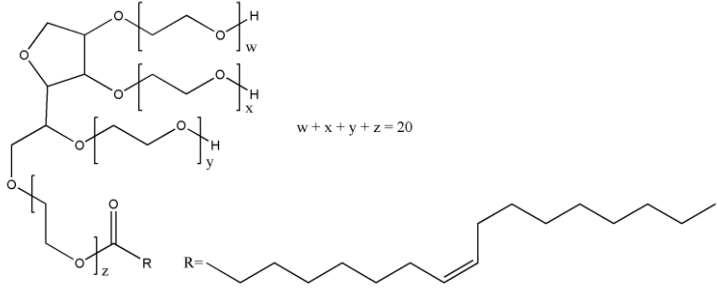
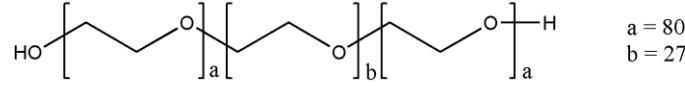
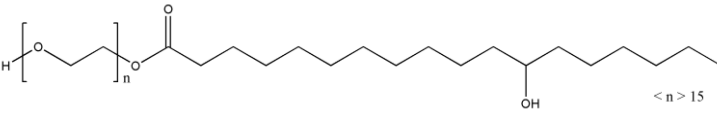
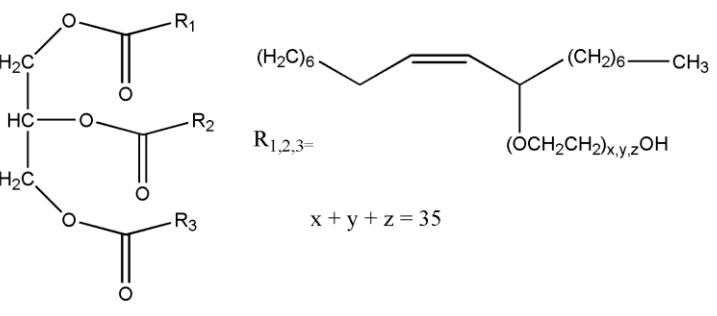
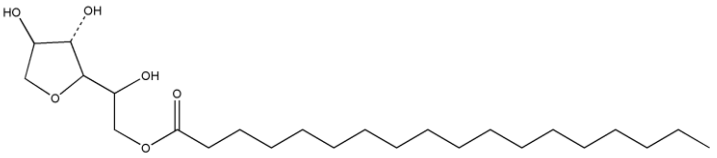
Ekscipijensi	Uobičajen i/ili hemijski naziv/Zaštićen naziv/ Strukturna formula	Preporučena koncentracija (%)
	<p>Polisorbat 80/Polioksietilen 20 sorbitanmonooleat/Tween® 80</p> <p style="text-align: right;">< 4</p> 	
	<p>Poloksamer 188/Polioksietilen-polioksipropilen blok kopolimer/Pluronic® F-68</p> <p style="text-align: right;">1,5–10</p> 	
Emulgatori/ Koemulgatori	<p>Polioksietilen-660-hidroksistearat; Polioksil/makrogol 15 hidroksistearat/Solutol® HS 15</p> <p style="text-align: right;">—</p> 	
	<p>Ricinusovo ulje, polioksil 35/Cremophor® EL</p> <p style="text-align: right;">10</p> 	
	<p>Sorbitanoleat/Span® 80</p> <p style="text-align: right;">—</p> 	

Tabela 1.3. (nastavak)

Ekscipijensi	Uobičajen i/ili hemijski naziv/Zaštićen naziv/ Strukturna formula	Preporučena koncentracija (%)
Sredstva za podešavanje toničnosti	Glicerol	2,25–2,5
	Sorbitol	5
	Ksilitol	5
Sredstva za podešavanje pH vrednosti	Natrijum hidroksid	q.s. (pH 6–9)
	Hlorovodonična kiselina	
Antioksidansi	α -Tokoferol	0,001–0,05
	Butilhidroksitoluen	0,02
	Askorbinska kiselina	0,01
	Natrijum-metabisulfit	0,2
	Cistein	0,5
Stabilizatori	Oleinska kiselina	–
	Natrijum-oleat	0,03
Konzervansi	Benzilalkohol	0,5–1
	Benzalkonijum-hlorid	0,01
	Metilparaben; propilparaben	0,18; 0,02
	Fenol	0,5
Helatna sredstva	Dinatrijum-edetat/EDTA	0,005–0,1

1.2.1. Komponente uljane faze

U ranoj fazi razvoja, izbor ulja za izradu nanoemulzija vođen je pre svega rastvorljivošću i/ili stabilnošću lekovite supstance; generalno se očekuje da će odabrano ulje imati maksimalni solubilizacioni kapacitet za lek kandidat. Dodatno, moguć uticaj na biodistribuciju lekovite supstance, a zatim i čistoća i cena ulja (naročito kada govorimo o industrijskoj proizvodnji), svakako su faktori koje treba uzeti u obzir (Floyd, 1999; Rossi i Leroux, 2007; Rozentur i sar., 2010). Primeri najčešće korišćenih ulja za izradu parenteralnih nanoemulzija prikazani su u tabeli 1.3. Kada se pogledaju nanoemulzije za parenteralnu primenu dostupne na tržištu (tabele 1.1 i 1.2), može se videti da se uljana faza uglavnom zasniva na dugolančanim trigliceridima (engl. *long-chain triglycerides*, LCT) poreklom iz biljnih izvora (sojino ulje, suncokretovo ulje, ulje pamuka). Ova ulja smatraju se glavnim izvorom energije u parenteralnoj ishrani i izvorom esencijalnih masnih kiselina (pr. linolna, α -linolenska) (Floyd, 1999; Rossi i Leroux, 2007; Rozentur i sar., 2010). LCT sadrže masne kiseline sa 14, 16, 18, 20, i 22 ugljenikova atoma, bez i sa jednom ili više dvostrukih veza (zasićene, mono- i polinezasićene). Prečišćeno soyino ili suncokretovo ulje sadrži LCT sa visokim udelom

omega-6 polinezasićenih masnih kiselina (linolna kiselina čini 50% prisutnih masnih kiselina), dok maslinovo ulje sadrži LCT sa omega-9 mononezasićenim masnim kiselinama. Brojni *in vitro* eksperimenti i neke kliničke studije su pokazali da nanoemulzije zasnovane samo na sojinom ulju mogu da ispolje štetan, imunosupresivni efekat koji se pripisuje omega-6 polinezasićenim masnim kiselinama, koje mogu delovati proinflamatorno, imunosupresivno i prokoagulaciono. U cilju smanjenja sadržaja linolne kiseline primenjena su dva pristupa: razblaživanje sojinog ulja drugim, inertnim uljem (trigliceridi srednje dužine lanca, maslinovo ulje) ili delimična zamena sojinog ulja uljem koje i samo ima korisne efekte (riblje ulje) (Tamilvanan, 2009; 2004).

Upotreba triglicerida srednje dužine lanca (engl. *medium-chain triglycerides*, MCT) u formulacijama lipidnih emulzija, uglavnom u kombinaciji sa LCT, intenzivno se povećala tokom 1970-ih godina. MCT se dobijaju hidrolizom palminog ulja i reesterifikacijom sa glicerolom frakcionisanih zasićenih masnih kiselina koje sadrže 6, 8, 10, i 12 ugljenikovih atoma (uglavnom kaprilna i kaprinska). MCT imaju oko 100 puta veću rastvorljivost u vodi i, stoga, bolji solubilizacioni kapacitet za lipofilne aktivne supstance u poređenju sa LCT (Floyd, 1999; Rossi i Leroux, 2007; Rozentur i sar., 2010). Serija kliničkih studija je pokazala da mešane lipidne emulzije koje sadrže MCT i LCT u odnosu 1:1 (m/m) imaju prednost nad konvencionalnim LCT emulzijama i, između ostalog, zbog smanjenja neželjenih efekata u jetri i plućima (Rozentur i sar., 2010). Takođe, korišćenjem MCT kao uljane faze dobijaju se kapi manje veličine nego u slučaju nanoemulzija sa LCT (Tamilvanan, 2009). Zbog povećane sposobnosti da rastvore veće količine liposolubilnih lekovitih supstanci, MCT, kao i ricinusovo ulje, nalaze sve veću primenu u nanoemulzijama sa inkorporiranom lekovitom supstancom. Da bi se povećao solubilizacioni kapacitet LCT, u uljanu fazu se mogu dodati masne kiseline i estri kao što su oleinska kiselina i etiloleat, ali se onda bezbednost nanoemulzija dovodi u pitanje, te je potrebno strogo kontrolisati njihov sadržaj (Rozentur i sar., 2010).

Poslednjih godina, nanoemulzije sa ribljim uljem dobijaju sve veću pažnju; riblje ulje, naime, sadrži proizvode esterifikacije glicerola sa eikozapentaenoinskom i dokozaheksaenoinskom kiselinom (omega-3 nezasićene masne kiseline sa 20 i 22 ugljenikova atoma, i 5 i 6 dvostrukih veza, respektivno) za koje je pokazano da imaju

korisne biološke aktivnosti u razvoju retine i mozga, funkcionisanju imunog sistema, endotelnoj funkciji, zgrušavanju krvi i prevenciji srčanih aritmija (Deckelbaum i sar., 2004). Takođe, umesto triglicerida, kao alternativno biokompatibilno ulje u solubilizaciji visoko lipofilnih lekovitih supstanci navodi se vitamin E (DL- α -tokoferol). Formulacija submikronske emulzije paklitaksela (Tocosol) sa vitamina E kao uljanom fazom (Constantinides i sar. 2006; 2004; 2000) pokazala je manju toksičnost i veću antitumorsku aktivnost kod miševa u odnosu na komercijalnu formulaciju paklitaksela (Tocol), i trenutno se nalazi u fazi III kliničkih studija.

Još jedan primer ulja koja zahvaljujući svojim jedinstvenim svojstvima (poboljšanje stabilnosti, biokompatibilnost) nalaze široku primenu u formulaciji stabilnih i netoksičnih parenteralnih nanoemulzija kao nosača za isporuku vakcina i lekovitih supstanci jesu skvalen i njegov hidrogenizovani oblik, skvalan. Nanoemulzije koje sadrže skvalen olakšavaju solubilizaciju, modifikovano oslobađanje i preuzimanje u ćelije lekovitih supstanci, adjuvanasa i vakcina. Prema hemijskoj strukturi skvalen je linearni triterpen i dobija se iz ulja ajkuline jetre, maslinovog ulja, ulja pšeničnih klica. Skvalen se često koristi u kombinaciji sa drugim uljima kako bi se sprečilo Ostvaldovo sazrevanje (engl. *Ostwald ripening*) i povećala stabilnost nanoemulzija; naime, zahvaljujući izrazito maloj rastvorljivosti u vodi, molekuli skvalena ne difunduju kroz vodeni medijum, čime se onemogućava Ostvaldovo sazrevanje. Sa druge strane, zahvaljujući velikom površinskom naponu, mogu se dobiti nanoemulzije sa malom veličinom kapi. Skvalen je, međutim, osetljiv na oksidaciju, zbog čega je neophodno dodavanje antioksidanasa i pufera za kontrolu pH vrednosti (Fox, 2009).

Posebnu vrstu ulja za izradu parenteralnih nanoemulzija predstavljaju perfluorougljovodonici, hemijski inertni, sintetski molekuli koji se sastoje od atoma ugljenika i fluora i mogu da rastvore velike količine kiseonika (Spahn, 1999). Primer perfluorokarbonskih emulzija koje se ispituju kao kontrastni agensi ili nosači za transport kiseonika kao alternativa transfuziji krvi (veštački supstituenti krvi) su Imavist (ranije poznat kao Imagent) i Oxygent, respektivno (Rossi i Leroux, 2007).

1.2.2. Emulgatori

Sposobnost surfaktanata da se zahvaljujući svojoj dualnoj, amfifilnoj prirodi adsorbuju na ulje–voda međupovršini omogućava im da igraju glavnu ulogu u formiranju i

stabilizaciji nanoemulzija: (1) snižavanjem međupovršinskog napona sistema smanjuje se Laplasov pritisak (razlika pritisaka između unutrašnjosti i spoljašnjosti kapi), a otuda je i stres potreban za lomljenje kapi smanjen; (2) formiranjem međupovršinskog filma koji odvaja uljane i vodene domene i obezbeđuje efektivnu strukturno-mehaničku barijeru, kao i elektrostatičke, sterne ili elektrosterne sile koje sprečavaju koalescenciju novonastalih kapi (Adjonu i sar., 2014; Hippalgaonkar i sar., 2010; Tadros i sar., 2004). Generalno je prepoznato da specifična svojstva surfaktanata, kao što su kritična micelarna koncentracija, hidrofilno-lipofilni balans (HLB), spontana zakrivljenost i kritični parametar pakovanja, diktiraju statička i dinamička svojstva nanoemulzija – fazno ponašanje, mikrostrukturu, stabilnost, reologiju, kao i solubilizaciona i međupovršinska svojstva (McClements, 2011). Pored uloge emulgatora/stabilizatora, surfaktanti u nanoemulzijama takođe mogu da poboljšaju solubilizaciju lekovite supstance, smanje toksičnost i poboljšaju penetraciju/resorpciju kroz biološke barijere (Klang i Valenta, 2011).

Generalno, za formulaciju i stabilizaciju nanoemulzija mogu da se koriste različiti površinski aktivni agensi, uključujući konvencionalne niskomolekularne surfaktante, proteine i polisaharide (Adjonu i sar., 2014; McClements, 2012), pri čemu se kinetički stabilne nanoemulzije mogu dobiti primenom razumno malih koncentracija surfaktanata (1,2–5%) (Tadros i sar., 2004; Klang i Valenta, 2011). Primeri surfaktanata koji se uobičajeno koriste u formulaciji nanoemulzija za parenteralnu primenu prikazani su u tabeli 1.3. Lecitini su još uvek emulgatori izbora u smislu biokompatibilnosti/toksičnosti/tolerabilnosti; nalaze se među najbezbednijim emulgatorima (GRAS status, engl. *generaly recognized as safe*) i stoga se tradicionalno primenjuju u razvoju parenteralnih nanoemulzija. Dobijaju se iz obnovljivih izvora (seme soje, žumance jajeta) ekološki prihvatljivim procesom, i mogu se dalje hidrogenizovati ili tretirati enzimima kako bi se dobili zasićeni i enzimski modifikovani oblici lecitina, koji se takođe smatraju prirodnim i mogu se bezbedno koristiti u razvoju farmaceutskih preparata (Klang i Valenta, 2011; van Hoogevest i Wendel, 2014).

Termin „lecitin“ se originalno pripisuje čistom fosfatidilholinu kao najrasprostranjenijem fosfolipidu i glavnoj komponenti prirodnog lecitina. Danas se, međutim, naziv lecitin obično koristi za kompleksnu smešu različitih fosfatida/fosfolipida u kombinaciji sa različitim količinama drugih supstanci, kao što su

trigliceridi i masne kiseline. Pored fosfatidilholina, drugi uobičajeni fosfolipidi u smešama lecitina su fosfatidiletanolamin, fosfatidilinozitol, fosfatidilserin, fosfatidna kiselina, sfingomijelin, lizofosfolipidi i drugi glicerol fosfolipidi kompleksnog sastava masnih kiselina. Zavisno od strukture polarne glave i pH vrednosti sistema, fosfatidilholin i fosfatidiletanolamin su cviterjonski i nenaelektrisani na neutralnom pH, dok su fosfatidna kiselina, fosfatidilserin i fosfatidilinozitol negativno naelektrisani, te mogu da obezbede dovoljno negativno površinsko naelektrisanje emulzionih kapi, dovodeći tako do elektrostatičke repulzije i, posledično, povećane stabilnosti nanoemulzionog sistema. Pošto sam fosfatidilholin ne poseduje dovoljno naelektrisanje da se dobiju nanoemulzije koje će biti dovoljno dugo stabilne, prirodne smeše lecitina su poželjnije u razvoju formulacija parenteralnih nanoemulzija ([Hippalgaonkar i sar., 2010](#); [Klang i Valenta, 2011](#); [Rossi i Leroux, 2007](#); [Rozentur i sar., 2010](#); [van Hoogevest i Wendel, 2014](#)).

Sistematične studije u kojima su ispitivani efekti različitih derivata fosfolipida na formiranje i stabilnost emulzija ukazale su da razlike u strukturi fosfolipida, poput dužine ugljovodoničnog lanca, stepena zasićenja acil lanaca, kao i prirode polarne glave, mogu značajno da utiču na njihova fizičko-hemijska svojstva i, posledično, na formiranje, karakteristike i stabilnost nanoemulzija na bazi lecitina ([Washington, 1996](#)). Zabeleženo je, međutim, da iako dobra, emulgujuća svojstva samog lecitina nisu dovoljna za dobijanje nanoemulzija zadovoljavajuće dugoročne stabilnosti. Lecitin je generalno previše hidrofoban i njegova geometrija molekula nije savršeno pogodna za formiranje zakrivljenih površina. Da bi se dobile stabilne nanoemulzije, neophodno je da se prilagodi HLB i modifikuju karakteristike pakovanja lecitina, što će obezbediti dovoljnu fleksibilnost međupovršinskog filma da zauzme različite zakrivljenosti neophodne za formiranje nanoemulzija ([Trotta i sar., 2002](#); [Hippalgaonkar i sar., 2010](#); [Klang i Valenta, 2011](#)). U tu svrhu, mogu se dodati različiti tipovi kosurfaktanata koji sa lecitinom formiraju gusto pakovan, kompleksan film na ulje–voda međupovršini, i to: anjonski surfaktanti poput natrijum-oleata, natrijum-holata ili natrijum-deoksiholata; nejonski surfaktanti sa sternim voluminoznim grupama, kao što su polioksietilen-polioksipropilen blok kopolimeri (polosameri, pr. Poloxamer/Koliphor 188), acetilovani monogliceridi, tiloksapol, polisorbati (pr. Tween 20 ili 80), polietoksilovano ili hidrogenizovano ricinusovo ulje (Cremophor EL ili RH, respektivno), ili polioksitelen

stearat (Solutol HS 15); i katjonski surfaktanti poput stearylamina, oleilamina, hitozana, benzalkonijum-hlorida. Potrebno je naglasiti da je većina ovih surfaktanata, izuzev katjonskih, odobrena od strane različitih farmakopeja i regulatornih tela za parenteralnu primenu i mogu se, stoga, uzeti u obzir prilikom dizajniranja parenteralnih nanoemulzija kao nosača lekovitih supstanci, mada bezbednost svake specifične kombinacije treba da bude potvrđena (Rossi i Leroux, 2007; Rozentur i sar., 2010).

Problemi vezani za upotrebu klasičnih surfaktanata (lecitina) u nanoemulzijama potiču od toga što su fosfolipidi podložni oksidativnoj i hidrolitičkoj degradaciji, koja ima za posledicu nepovoljne promene u izgledu i mirisu nanoemulzija nakon određenog perioda čuvanja. Osim toga, smeše lecitina imaju visok potencijal za stvaranje agregata, što dovodi do formiranja vezikularnih i multilamelarnih struktura u toku izrade nanoemulzija. Uprkos decenijama istraživanja na ovom polju, još uvek nije u potpunosti razjašnjeno mogu li se ove strukture izbeći i da li njihovo prisustvo ima negativan efekat na dugoročnu stabilnost nanoemulzija (Klang i sar., 2011). Iako je uloga lecitina kao emulgatora davno utvrđena, kompleksno ponašanje fosfolipida u nanoemulzijama, još uvek nije u potpunosti predvidivo (Klang i Valenta, 2011).

1.2.3. Komponente vodene faze

Premda se uljana faza i emulgatori smatraju najvažnijim ekscipijensima u procesu dizajniranja specifičnih formulacija nanoemulzija, dodatne supstance su potrebne kako bi se obezbedile fiziološka pH vrednost i toničnost, zatim da bi se nanoemulzije zaštitile od oksidacije i razdvajanja faza ili degradacije lekovite supstance, i u nekim slučajevima da bi se zaštitile od mikrobiološke kontaminacije. S tim u vezi, sredstva za podešavanje toničnosti, za podešavanje pH vrednosti, konzervansi, i retko hidrofilni antioksidansi, predstavljaju glavne komponente vodene faze nanoemulzija (Rozentur i sar., 2010).

Da bi se izbeglo oštećenje ćelija u kontaktu sa formulacijom (pr. hemoliza eritrocita), parenteralne nanoemulzije treba da budu osmotski kompatibilne, odnosno izotonične sa krvnom plazmom. U cilju podešavanja toničnosti na željenu vrednost (280–300 mOsmol/kg) dodaju se izotonična sredstva koja ne narušavaju dugoročnu fizičku stabilnost nanoemulzija. Kao izotonični agens obično se preporučuje glicerol koji se inače može naći u sastavu gotovo svih nanoemulzija za parenteralnu ishranu ili isporuku lekovitih supstanci (tabele 1.1 i 1.2), u koncentraciji od 2,25–2,5%, čime se obezbeđuje

osmolalnost od 285–290 mOsmol/kg (Benita i Levy, 1993; Rossi i Leroux, 2007; Rozentur i sar., 2010). Pored uloge sredstva za izotonizaciju, pokazano je da glicerol u kombinaciji sa propilenglikolom dovodi do smanjenja veličine kapi, kao i do povećanja stabilnosti nanoemulzionog sistema (Floyd, 1999; Hippalgaonkar i sar., 2010). Osim glicerola, kao pogodna sredstva za izotonizaciju parenteralnih nanoemulzija mogu se koristiti i sorbitol i ksilitol (Benita i Levy, 1993; Rossi i Leroux, 2007; Rozentur i sar., 2010). Glukoza se generalno ne koristi za podešavanje toničnosti jer interaguje sa lecitinom i dovodi do promene boje nanoemulzija (Floyd, 1999; Hippalgaonkar i sar., 2010).

Da bi se obezbedila fiziološka kompatibilnost i održala fizičko-hemijska stabilnost, poželjno je da pH vrednost parenteralnih nanoemulzija bude između 7 i 8. Na taj način obezbeđuje se adekvatna jonizacija fosfatnih grupa lecitina, postiže optimalno naelektrisanje na površini nanoemulzionih kapi i ujedno sprečava hidrolizu estara masnih kiselina iz ulja i fosfolipida. Niže pH vrednosti (ispod 5) treba izbegavati, jer se elektrostatičko odbijanje između kapi smanjuje, što vodi ka destabilizaciji sistema. Za podešavanje pH vrednosti parenteralnih nanoemulzija koriste se male količine vodenih rastvora natrijum-hidroksida ili hlorovodonične kiseline (Benita i Levy, 1993). Pufere treba izbegavati jer elektroliti mogu da katalizuju hidrolizu lipida. Kada se primenjuju toplotne metode sterilizacije, poželjno je da se pH vrednost nanoemulzije podesi na oko 8, jer tokom sterilizacije pH opada usled hidrolize triglicerida i fosfolipida i povećanja sadržaja slobodnih masnih kiselina (Floyd, 1999; Hippalgaonkar i sar., 2010).

S obzirom da su trigliceridi iz ulja i fosfolipidi iz lecitina osetljivi na oksidaciju, neophodno je preduzeti odgovarajuće mere kako bi se ova pojava eliminisala ili redukovala, što se najčešće postiže dodatkom antioksidanasa (tabela 1.3), uglavnom α -tokoferola, u uljanu fazu nanoemulzije (Benita i Levy, 1993; Rossi i Leroux, 2007; Rozentur i sar., 2010). Kada je potrebno, mogu se koristiti i hidrosolubilni antioksidansi, kao što su natrijum-bisulfit, natrijum-metabisulfit, askorbinska kiselina (Boquet i Wagner, 2012; Floyd, 1999).

Prisustvo komponenata prirodnog porekla (lectin, ulja) u formulacijama parenteralnih nanoemulzija čini da ove nanoemulzije budu dobar medijum za rast i razvoj mikroorganizama, naročito kada su u višedoznim pakovanjima. Mikroorganizmi mogu da promene fizičko-hemijska svojstva (pr. boju, miris, pH) i fizičku stabilnost

nanoemulzija, a mogu predstavljati i opasnost po zdravlje. Da bi se sprečila mikrobiološka kontaminacija, prilikom izrade nanoemulzija dodaju se konzervansi (rastvaraju se u vodenoj fazi) (Benita i Levy, 1993; Rossi i Leroux, 2007; Rozentur i sar., 2010), pri čemu se mora voditi računa o njihovom uticaju na fizičku stabilnost nanoemulzije (Han i Washington, 2005). Primeri najčešće korišćenih konzervanasa u parenteralnim preparatima navedeni su u tabeli 1.3. Uprkos fizičko-hemijskoj kompatibilnosti, istraživanja su pokazala da ni parabeni (Młynarczyk i sar., 2008), ni benzalkonijum-hlorid ne mogu da ostvare zadovoljavajuću antibakterijsku efikasnost u lipidnim nanoemulzijama, verovatno usled neadekvatne fazne raspodele između različitih unutrašnjih struktura lipidne nanoemulzije. Otuda, za efikasnu zaštitu od mikrobiološke kontaminacije lipidnih nanoemulzija stabilizovanih lecitinom, veće koncentracije antimikrobnih sredstava ili njihove kombinacije mogu biti neophodne (Rozentur i sar., 2010).

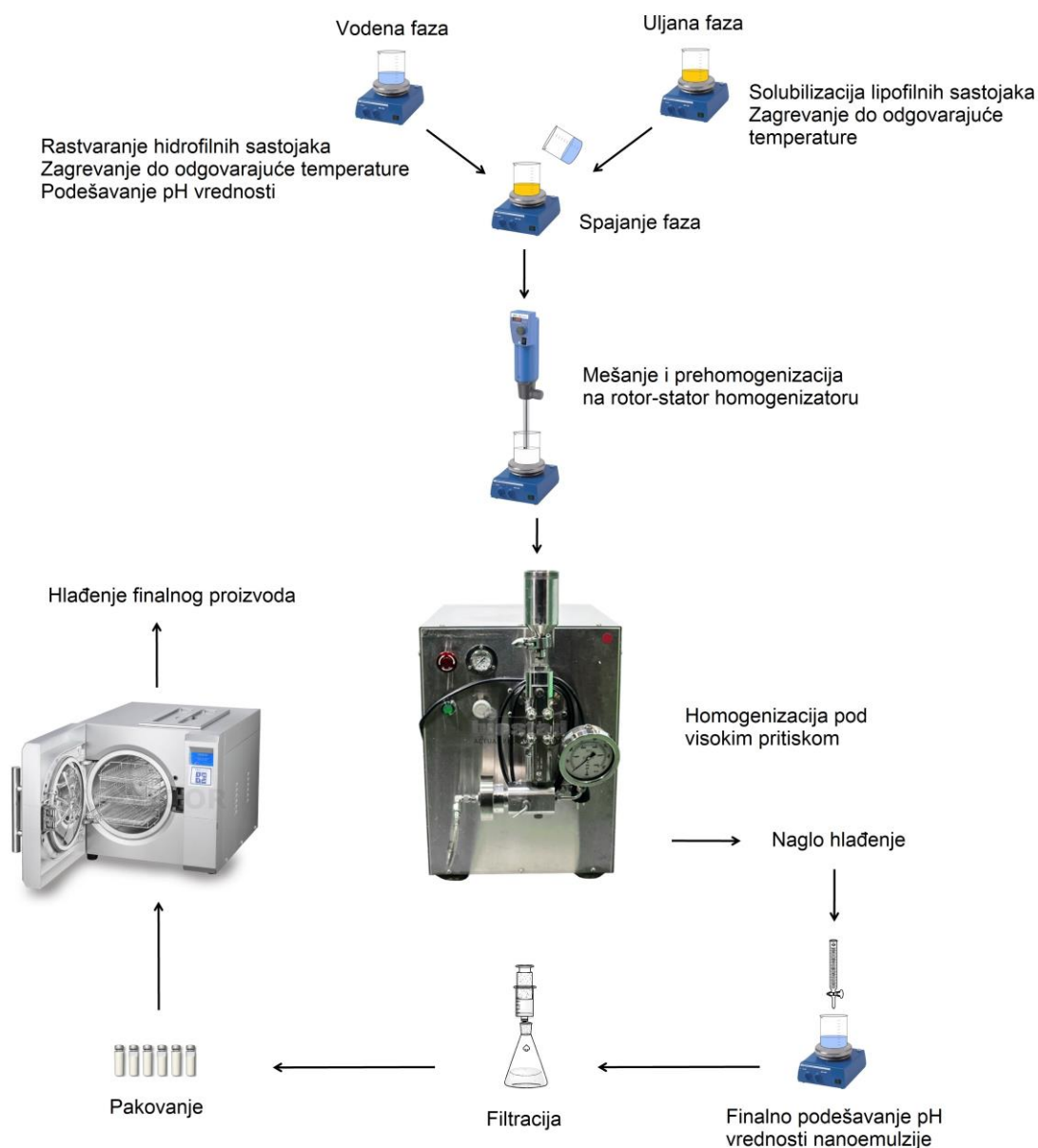
1.3. Izrada nanoemulzija

Nanoemulzije se izrađuju iz ulja, vode, emulgatora i, često, koemulgatora, i pošto su termodinamički nestabilni sistemi, uvek zahtevaju dovođenje neke spoljašnje energije sistemu, kako bi se odvojene faze konvertovale u stabilnu koloidnu disperziju (McClements, 2012; 2011). Zavisno od bazičnog fizičko-hemijskog mehanizma usitnjavanja/lomljenja kapi, metode za izradu nanoemulzija mogu se podeliti u dve grupe: visokoenergetske i niskoenergetske metode. Visokoenergetske metode zasnivaju se na primeni mehaničkih uređaja koji generišu intenzivne sile koje omogućavaju mešanje i usitnjavanje uljane i vodene faze dovodeći do formiranja malih nanoemulzionih kapi; takve su homogenizacija pod visokim pritiskom (engl. *high pressure homogenization*, HPH), mikrofluidizacija i primena ultrazvuka. Niskoenergetske metode zasnivaju se, pak, na fizičko-hemijskim svojstvima samog ulje–voda–surfaktant sistema, odnosno energiji samih komponenata nanoemulzije koje se mešaju na specifičan način, pod određenim uslovima (sastav, temperatura). Otuda, razvoju nanoemulzija primenom niskoenergetskih metoda mora da prethodi istraživanje kumulativnog ponašanja ulja, surfaktanata, kosurfaktanata, lekovite supstance, hidrofilno-lipofilnog balansa (HLB) upotrebljene smeše ulje–surfaktant, i radne

temperature. Primer niskoenergetskih metoda su metod evaporacije (difuzije) rastvarača, spontani emulgujući metod i fazno-inverzni temperaturni (PIT) metod (Klang i Valenta, 2011; McClements, 2011; Singh i sar., 2017; Tadros i sar., 2004).

1.3.1. Homogenizacija pod visokim pritiskom

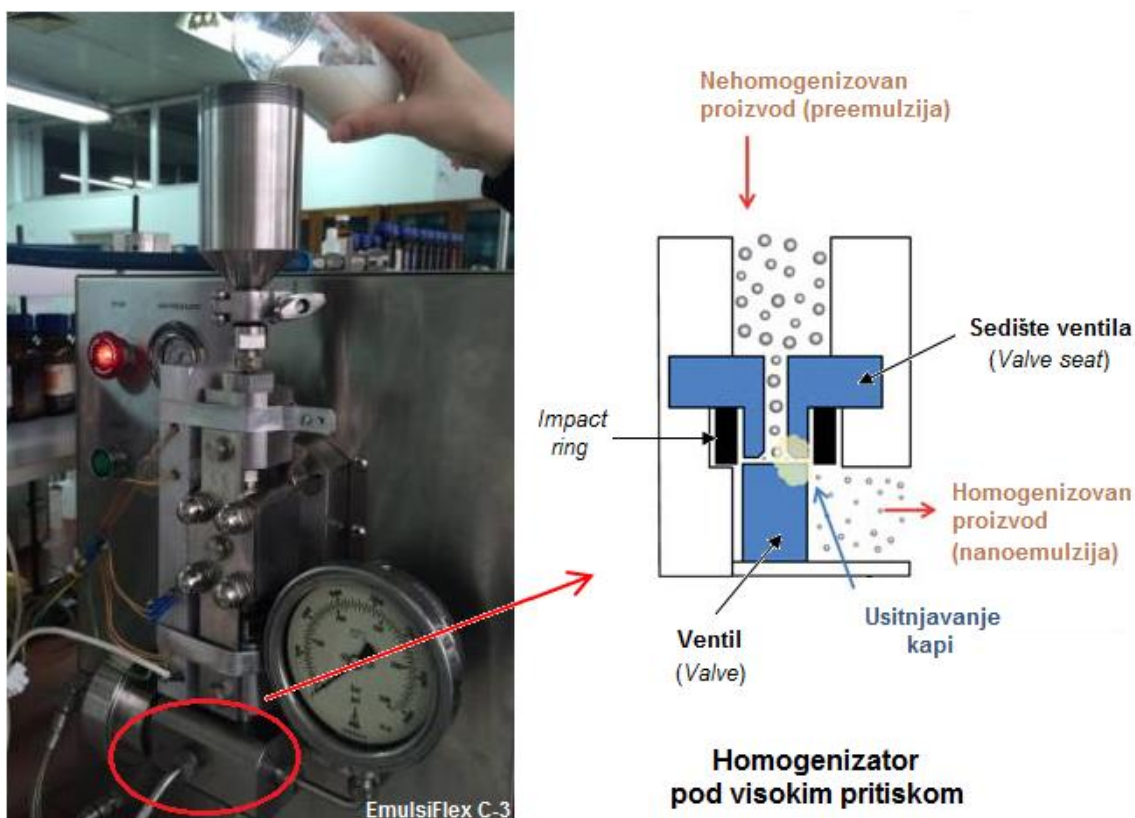
Zahvaljujući brojnim prednostima, kao što su, između ostalog, mogućnost dobijanja male, homogene i stabilne veličine kapi i relativno jednostavan *scale-up* (prenošenje procesa sa laboratorijskog na industrijski nivo), HPH predstavlja metodu izbora za dobijanje nanoemulzija, naročito onih zasnovanih na lecitinu. Uprkos brojnim modifikacijama, bazični princip smanjenja veličine kapi tokom HPH, koji se inače zasniva na smicanju, turbulenciji i kavitaciji, nije se promenio do danas (Jahnke, 1998). Standardna procedura dobijanja nanoemulzija u homogenizatorima pod visokim pritiskom obuhvata više koraka (slika 1.1). Najpre se odvojeno pripremaju uljana faza (ulje, lipofilni emulgator, antioksidans, lipofilna lekovita supstanca) i vodena faza (voda, hidrofilni surfaktant, osmotski agens), uz mešanje na magnetnoj mešalici. U zavisnosti od toga da li se izvodi topla (oko 50°C) ili hladna homogenizacija (oko 25°C), uljana i vodena faza se po potrebi zagreju. Da bi se smanjilo početno opterećenje mikroorganizmima i uklonili eventualno prisutni pirogeni, dobijene faze treba profilirati, posebno u slučaju formulacija za parenteralnu primenu. U narednom koraku, uljana i vodena faza se mešaju i prehomogenizuju na rotor-stator homogenizeru (pr. Ulltra-Turrax, Silverson emulsifier), čime se dobija homogena, ali gruba emulzija sa veličinom kapi od nekoliko mikrometara. Konačno, dobijena preemulzija propušta se kroz homogenizator pod visokim pritiskom (pr. EmulsiFlex, Gaulin Homogeniser, Micron Lab), pri unapred definisanom pritisku (obično 500–800 bar, ili više), temperaturi i broju prolazaka kroz homogenizator (obično 5–10 ciklusa). Dobijena nanoemulzija namenjena za parenteralnu primenu se nakon podešavanja pH vrednosti filtrira pod aseptičnim uslovima i/ili sterilise parom (Klang i sar., 1998; Klang i Valenta, 2011).



Slika 1.1. Shematski prikaz postupka dobijanja parenteralnih nanoemulzija tehnikom homogenizacije pod visokim pritiskom (prilagođeno iz [Klang i sar., 1998](#); [Rozentur i sar., 2010](#)).

Najčešće korišćeni homogenizatori pod visokim pritiskom su *piston-gap* homogenizatori. Uređaj se sastoji od klipne pumpe pod visokim pritiskom, čiji je zadatak da obezbedi energiju neophodnu za homogenizaciju, i ventila za homogenizaciju, koga čine sedište (fiksirano) i ventil (pokretan) sa zazorom/međuprostorom između, čija se veličina može podešavati i u kome se vrši homogenizacija. U toku procesa homogenizacije, proizvod koji se homogenizuje (pr.

preemulzija) potiskuje se pod visokim pritiskom u ventilni prostor. Kada stigne do uzanog otvora ($< 10 \mu\text{m}$), brzina proticanja tečnosti se jako povećava, što je praćeno naglim porastom dinamičkog i padom statičkog pritiska. U jednom trenutku, statički pritisak se smanjuje ispod pritiska pare tečnosti, tečnost počinje da ključa i obrazuju se mehurići gasa, koji zatim implodiraju i stvaraju talase (kavitacija). Proizvod zatim stiže do prstena na koji udara. Iznenađna promena energije u komori pri prelasku proizvoda iz šire u jako uzanu cev izaziva turbulenciju, smicanje i kavitaciju, a kao rezultat delovanja ovih kombinovanih sila dolazi do smanjenja veličine kapi (Jahnke, 1998; McClements, 2011; Klang i Valenta, 2011). Princip rada homogenizatora pod visokim pritiskom prikazan je na slici 1.2.



Slika 1.2. Shematski prikaz principa rada homogenizatora pod visokim pritiskom (preuzeto i prilagođeno iz Jahnke, 1998; McClements, 2011).

Tokom procesa emulgovanja koji se odvija u homogenizatoru pod visokim pritiskom dolazi do deformacije i lomljenja (usitnjavanja) kapi, adsorpcije emulgatora na novoformiranu međupovršinu, kolizije i, verovatno, rekoalescencije novonastalih kapi

(Floury i sar., 2004a; 2004b). Veličina kapi nanoemulzije koja se može dobiti primenom HPH određena je ravnotežom između lomljenja i rekoalescencije kapi (Floury i sar., 2004a; 2004b) i zavisi od tipa homogenizatora, uslova homogenizacije (intenzitet energije, vreme trajanja, temperatura), sastava uzoraka (vrsta i koncentracija ulja i emulgatora) i fizičko-hemijskih svojstava uljane i vodene faze (međupovršinski napon, viskozitet) (McClements, 2011). Najvažniji parametri koji utiču na efekat homogenizacije, tj. veličinu kapi nanoemulzije dobijene HPH postupkom, prikazani su u tabeli 1.4. Ako se, na primer, kao emulgator koristi lecitin (gotovo uvek kod parenteralnih nanoemulzija), a nanoemulzije izrađuju visokoenergetskim postupkom, veličina kapi koja se može dobiti kreće se u opsegu 150–300 nm, i teško da se primenom konvencionalne metode mogu dobiti kapi manjeg dijametra (Baspinar i sar., 2010; Hoeller i sar., 2009; Yilmaz i Borchert, 2005). Uzrok ove pojave je verovatno fosfatidilholin koji ulazi u sastav lecitina i koji obrazuje lamelarne strukture koje onemogućavaju dobijanje kapi manjih od 100 nm (Klang i Valenta, 2011). Dalje, sa povećanjem sadržaja ulja, povećava se i broj sudara kapi, usled čega može doći do koalescencije tokom emulgovanja, te porasta veličine kapi (Tadros i sar., 2004).

Tabela 1.4. Faktori koji utiču na veličinu kapi nanoemulzija tokom procesa homogenizacije pod visokim pritiskom (Jahnke, 1998)

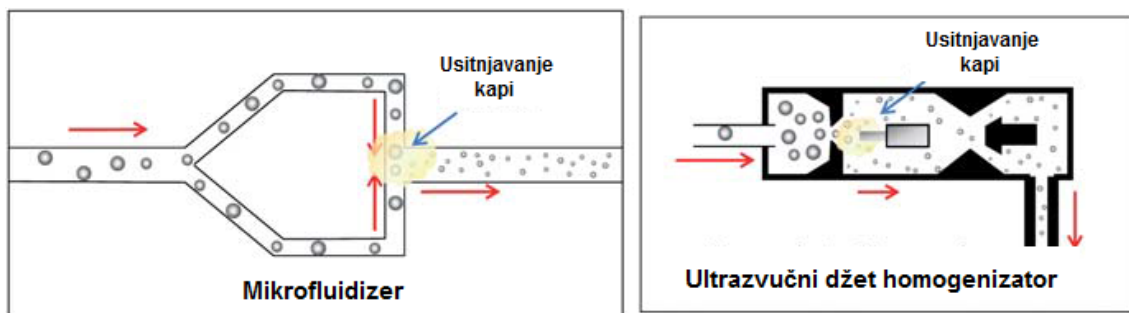
Karakteristike formulacije	Geometrija homogenizacionog ventila	Parametri procesa
Viskozitet dispergovane faze	Efektivni dijametar	Pritisak homogenizacije
Viskozitet kontinuirane faze	Poluprečnik ulaza	Povratni pritisak
Gustina svake faze	Dužina ležišta	Temperatura
Međupovršinski napon	Veličina otvora na mestu homogenizacije	Kapacitet
Koncentracija emulgatora	Udaljenost udara	Broj stupnjeva sa pritiskom
Kinetika emulgatora (brzina oblaganja površine kapi)		Broj prolazaka (ciklusa)
Gustina oblaganja		
Stepen tvrdoće dispergovane faze		
Koncentracija dispergovane faze		
Napon pare kontinuirane faze		
Inicijalna veličina kapi		

Veličina kapi nanoemulzije obično može da se smanji povećanjem unosa energije usled dužeg vremena homogenizacije (tj. povećanja broja prolazaka kroz homogenizator) ili

većeg pritiska (van Nieuwenhuyzen i Szuhaj, 1998; McClements, 2011). Takođe, do nastanka manjih kapi nanoemulzije može doći izvođenjem homogenizacije na povišenoj temperaturi, povećanjem koncentracije emulgatora (usled povećanog zapreminskog odnosa emulgator–ulje), smanjenjem zapreminske frakcije ulja, smanjenjem viskoziteta uljane faze, kao i smanjenjem veličine kapi preemulzije (Jahnke, 1998; Tadros i sar., 2004; Zhou i sar., 2010). Generalno, da bi se dobila nanoemulzija optimalnih karakteristika (mala veličina i uska raspodela veličina kapi), te zadovoljavajuće fizičke stabilnosti, i sprečilo *over*-procesuiranje (prekomerna primena mehaničke sile) do koga najčešće dolazi usled povećanog broja ciklusa homogenizacije i/ili nedovoljne koncentracije emulgatora potrebnog za oblaganje površina novonastalih kapi, poželjno je da se za svaku formulaciju utvrde optimalni uslovi izrade (Klang i Valenta, 2001). Kada povećanje broja ciklusa homogenizacije preko određene granice više ne dovodi do smanjenja veličine kapi, ili se čak uočava blago povećanje veličine kapi, postignut je plato (Cortés-Muñoz i sar., 2009).

1.3.2. Mikrofluidizacija

Mikrofluidizeri po dizajnu dosta podsećaju na homogenizatore pod visokim pritiskom, jer takođe koriste pumpu koja potiskuje tečnost pod visokim pritiskom kroz uzani otvor kako bi se olakšalo usitnjavanje kapi; razlika je, međutim, u dizajnu kanala kroz koje prolazi tečnost u uređaju (slika 1.3). Princip rada mikrofluidizera sastoji se u tome da se prethodno do određenog stepena homogenizovana tečnost (gruba emulzija) potiskuje pod pritiskom u komoru koja se sastoji od keramičkih mikrokanala postavljenih tako da se tečnost koja ulazi u kanal razdvaja u dve odvojene struje. Ove dve struje se zatim rekombinuju pri vrlo velikim brzinama protoka, pri čemu se proizvode jake sile smicanja, udara i kavitacije koje dovode do smanjenja veličine kapi i nastanka ultrafine emulzije (Klang i Valenta, 2011; McClements 2011; Singh i sar., 2017). Studije su pokazale da se manja veličina kapi može dobiti povećanjem pritiska homogenizacije, povećanjem broja prolazaka kroz mikrofluidizer, povećanjem koncentracije emulgatora, i smanjenjem odnosa viskoziteta dispergovane i kontinuirane faze (McClements 2011).



Slika 1.3. Shematski prikaz principa rada mikrofluidizera i ultrazvučnog mlaznog (*jet*) homogenizera (preuzeto i prilagođeno iz [McClements, 2011](#)).

1.3.3. Primena ultrazvuka

Ultrazvučne metode za izradu nanoemulzija zasnivaju se na primeni ultrazvučnih talasa velikog intenziteta (frekvencija > 20 kHz). Mogu da se koriste za dobijanje nanoemulzija *in situ* (mešanje uljane i vodene faze) ili za redukciju veličina kapi prethodno formirane grube emulzije. *Bench-top* laboratorijski sonikatori koji se široko koriste za dobijanje malih serija nanoemulzija sastoje se od ultrazvučne sonde sa piezoelektričnim kristalom koji konvertuje električne talase u intenzivne potisne talase ([Mahdi Jafari i sar., 2006](#)). Kada se sonda uroni u uzorak, ultrazvučni talasi generišu mehuriće gasa koji nastavljaju da rastu dok ne implodiraju (kavitacija); implozija stvara udarne talase koji dovode do mlaznog protoka okolne tečnosti, potiskujući dispergovane kapi i smanjujući njihovu veličinu ([Singh i sar., 2017](#)). Sama procedura izrade nanoemulzija primenom ultrazvuka obuhvata više koraka: prvo se odvojeno pripremaju uljana i vodena faza, uz slabo mešanje i zagrevanje; zatim se izrađuje gruba emulzija dodavanjem homogene uljane faze u vodenu fazu uz mehaničko mešanje; dobijena emulzija se zatim izlaže dejstvu ultrazvuka pri različitim amplitudama, u kratkim vremenskim intervalima, dok se ne dobije nanoemulzija željenih karakteristika ([Klang i Valenta, 2011](#); [Singh i sar., 2017](#)). Istraživanja su pokazala da se veličina kapi smanjuje sa povećanjem vremena sonikacije, ulazne snage i koncentracije emulgatora ([Leong i sar., 2009](#); [McClements, 2011](#)). Za komercijalnu, industrijsku proizvodnju nanoemulzija razvijeni su homogenizatori na bazi ultrazvuka sa kontinuiranim protokom ([slika 1.3](#)), kod kojih uzorak prolazi kroz posebnu kolonu/kanal koja sadrži element za generisanje ultrazvučnih talasa ([McClements, 2011](#); [Singh i sar., 2017](#)). I pored toga što je prilično brza, jednostavna i ne zahteva skupu opremu kao što su

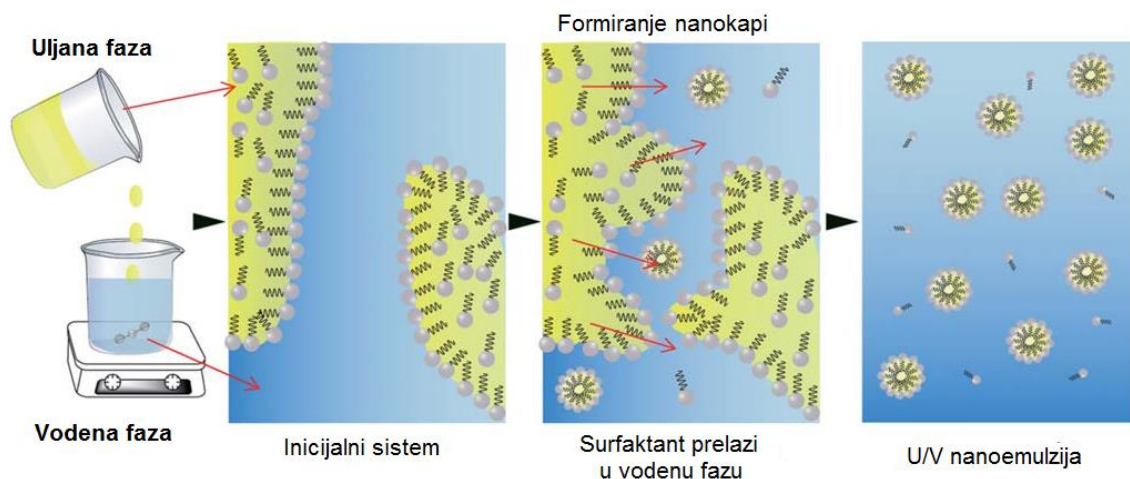
homogenizatori pod visokim pritiskom, ova metoda nije puno zastupljena u izradi nanoemulzija. Razlog može biti to što je optimizacija procesnih parametara veoma zahtevna; dodatno, uzorci se izlažu toplotnom stresu, te je neophodno obezbediti njihovo adekvatno hlađenje (Klang i Valenta, 2011).

1.3.4. Metod difuzije rastvarača/Spontani emulgujući metod

Fizičko-hemijski mehanizam koji leži u osnovi formiranja nanoemulzija ovom metodom jeste prelazak komponente koja se meša sa vodom (organski rastvarač i/ili surfaktant) iz uljane/organske faze u vodenu fazu nanoemulzije. Procedura podrazumeva pripremu dve faze – vodene, koja sadrži hidrofilni surfaktant, i uljane faze, koja sadrži ulje, lekovitu supstancu, lipofilni surfaktant i organski rastvarač koji se delimično meša sa vodom (pr. aceton ili etilacetat). Organska faza se zatim postepeno dodaje u vodenu fazu uz mešanje, pri čemu rastvarač i/ili surfaktant koji se meša sa vodom prelazi iz organske u vodenu fazu, što stvara veliku silu turbulencije na ulje–voda međupovršini, dovodi do povećanja ulje–voda međupovršine, te spontanog formiranja uljanih kapi okruženih vodenom fazom kroz proces pupljenja (slika 1.4). Organski rastvarač se nakon toga uklanja evaporacijom (Bouchemal i sar., 2004; Kelmann i sar., 2007; McClements, 2011; Singh i sar., 2017).

Da bi se dobila mala veličina kapi nanoemulzije, obično je potrebno imati veliki odnos komponente koja se meša sa vodom i ulja u organskoj fazi, pre mešanja (Klang i Valenta, 2011; McClements, 2011; Singh i sar., 2017). Ovom metodom se ne mogu dobiti nanoemulzije stabilizovane lecitinom kao jedinim emulgatorom, te se lecitin najčešće kombinuje sa nejonskim sternim stabilizatorima (pr. sorbitanski estri (Span[®]-ovi), polisorbati (Tween[®]-ovi)). Koncentracija surfaktanata je veća nego u klasičnim nanoemulzijama (najmanje 10%), a veličina kapi je obično komparabilna sa onom koja se dobija HPH metodom (Bouchemal i sar., 2004; Kelmann i sar., 2007). Istraživanja su pokazala da tzv. samo-(nano)emulgujući sistemi dobijeni niskoenergetskom metodom uglavnom ispoljavaju široku raspodelu veličina kapi (Klang i Valenta, 2011). Još jedan nedostatak metode je moguće prisustvo organskog rastvarača ili korastvarača u finalnom proizvodu (Bouchemal i sar., 2004). Činjenica da lecitin sam nije u stanju da formira mikroemulzione strukture u vodenim ternarnim sistemima, sem ako se ne dodaju kosurfaktant ili korastvarač, ukazuje da sistemi dobijeni spontanim

emulgovanjem nemaju istu mikrostrukturu kao nanoemulzije dobijene visokoenergetskim metodama (Klang i Valenta, 2011).

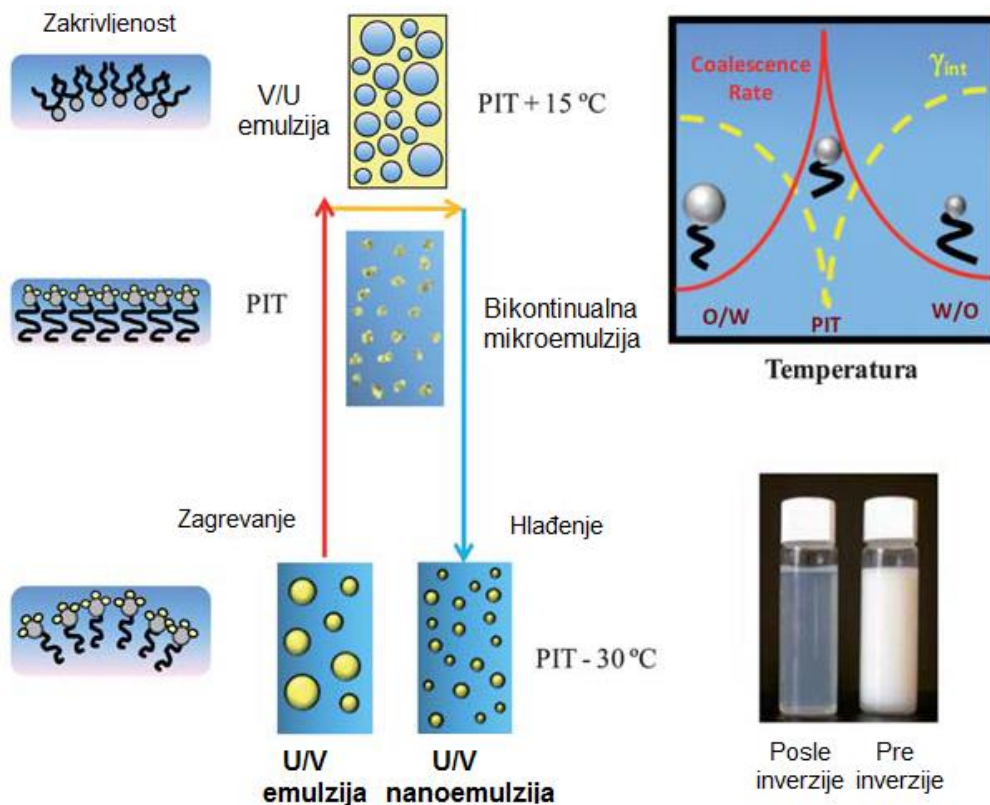


Slika 1.4. Shematski prikaz dobijanja nanoemulzija spontanim emulgujućim metodom (preuzeto i prilagođeno iz McClements, 2011).

1.3.5. Fazno-inverzni metod

Fazno-inverzni temperaturni (engl. *phase inversion temperature*, PIT) metod podrazumeva kontrolisanu, uređenu konverziju jednog tipa emulzije u drugi (pr. U/V u V/U, ili *vice versa*) preko intermedijarne, bikontinualne faze (slika 1.5). U osnovi ove inverzije leže promene u fizičko-hemijskim svojstvima surfaktanata (optimalnoj zakrivljenosti međupovršinskog filma, geometriji molekula ili rastvorljivosti u uljanoj i vodenoj fazi) sa promenom temperature. Temperatura na kojoj sistem ulje–voda–surfaktant prelazi iz U/V emulzije u V/U emulziju poznata je kao temperatura inverzije faza (PIT). (Anton i sar., 2007; Izquierdo i sar., 2005; 2004; McClements, 2011; Singh i sar., 2017). Do formiranja nanoemulzije dolazi spontano, rušenjem mikroemulzionog sistema, bilo naglim hlađenjem (klasični PIT metod) (Izquierdo i sar., 2004) ili razblaživanjem vodom (*emulsion inversion point* (EIP) metod, poznat i kao *phase inversion composition* (PIC) metod, *catastrophic phase inversion* (CPI) metod ili metod titracije vodom), na fazno-inverznoj temperaturi (Kotta i sar., 2015; Sajjadi, 2006). Čitav postupak izvodi se uz slabo mešanje, bez ekstremnog smicanja (Anton i sar., 2007; McClements, 2011; Singh i sar., 2017). Interesantno je da se fazno-inverzni

metod ranije navodio kao metod preemulgovanja koji prethodi homogenizaciji pod visokim pritiskom (Klang i Valenta, 2011).



Slika 1.5. Shematski prikaz izrade nanoemulzija fazno-inverznim temperaturnim metodom (preuzeto i prilagođeno iz McClements, 2011).

Glavni nedostatak nanoemulzija dobijenih fazno-inverznim metodama je visoka koncentracija surfaktanata (do 40%) potrebna za dobijanje kapi zadovoljavajuće veličine i monomodalne distribucije. Generalno se smatra da nanoemulzije zasnovane na lecitinu, dobijene na ovaj način, imaju nepovoljnije karakteristike u pogledu veličine i raspodele veličina kapi u poređenju sa nanoemulzijama dobijenim klasičnim metodama (Klang i Valenta, 2011). Takođe, vrlo je malo podataka koji govore o dugoročnoj stabilnosti ovako izrađenih nanoemulzija; formulacije su uglavnom stabilne svega nekoliko meseci (Izquierdo i sar., 2004).

1.4. Metodologija eksperimentalnog dizajna

Lipidne nanoemulzije za parenteralnu primenu moraju, između ostalog, da ispune dva važna kriterijuma: prvo, sastojci moraju biti bezbedni i netoksični; drugo, veličina kapi dispergovane uljane faze mora biti veoma mala, a distribucija kapi po veličini uska, jer velike kapi mogu da izazovu emboliju. Iz tih razloga, broj ulja i emulgatora dostupnih za upotrebu kod ovakvih nanoemulzija je veoma ograničen, a tehnike proizvodnje su od ključne važnosti. Primenjen proces proizvodnje utiče kako na veličinu uljanih kapi, tako i na stabilnost nanoemulzije tokom čuvanja (Bock i sar., 1998). U skladu sa načinom primene, parenteralne nanoemulzije, kao što je prethodno diskutovano, izrađuju se iz visoko bezbednih i biokompatibilnih ulja (MCT, sojino, suncokretovo, maslinovo, riblje) i emulgatora (fosfolipidi, polisorbati, poloksameri), najčešće HPH metodom (Floyd, 1999; Klang i Valenta, 2011; Sadurni i sar., 2005; Yilmaz i Borchert, 2005; Yuan i sar., 2008). Dobro je poznato da parametri formulacije, parametri procesa izrade, kao i inkorporiranje lekovite supstance u unutrašnju, uljanu fazu nanoemulzije, mogu značajno da utiču na fizičko-hemijska svojstva i stabilnost, a posledično, na *in vivo* farmakokinetičko ponašanje, te efikasnost razvijenih nanoemulzionih sistema (Baspinar i sar., 2010; Benita i Levy, 1993; Davis i sar., 1987; Floyd, 1999; Hippalgaonkar i sar., 2010; Jumaa i Müller, 2002; Nordén i sar., 2001; Sila-on i sar., 2008; Yilmaz i Borchert, 2005; Yuan i sar., 2008). Tabela 1.5 daje prikaz čitavog niza različitih formulacionih i procesnih parametara koje je važno razmotriti prilikom formulisanja i izrade/proizvodnje parenteralnih nanoemulzija.

Mada je uticaj navedenih kompleksnih faktora (tabela 1.5) na osobine kritične za kvalitet i stabilnost nanoemulzija (veličina i raspodela veličina kapi, površinsko naelektrisanje) dokumentovan, malo je podataka u literaturi koji govore o njihovom zajedničkom efektu, a čije su dobro razumevanje i kontrola posebno poželjni kada se dizajniraju nanoemulzije sa željenim, optimalnim karakteristikama. U tom smislu, kao naročito koristan alat u razvoju i optimizaciji nanoemulzija kao perspektivnih nosača slabo rastvorljivih lekovitih supstanci, prepoznata je metodologija eksperimentalnog dizajna (Floyd, 1999; Klang i Valenta, 2011; Li i sar., 2017).

Tabela 1.5. Formulacioni i procesni parametri koji mogu da utiču na kritična fizičko-hemijska svojstva, naročito veličinu i raspodelu veličina kapi nanoemulzija (Bock i sar., 1998)

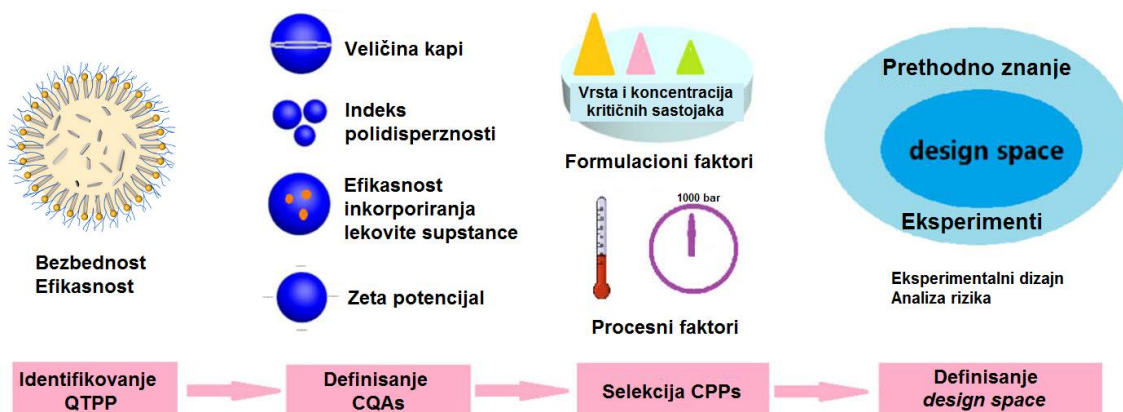
Formulacioni Parametri	Ulja	Izvor Sastav/čistoća Koncentracija koja se koristi
	Emulgujući agensi	Izvor Sastav/čistoća Koncentracija koja se koristi
	Ostale komponente	Vrsta i koncentracija
	Aktivna supstanca	Vrsta i koncentracija
Procesni Parametri	Inkorporiranje emulgatora i drugih sastojaka formulacije	Rastvaranje ili suspendovanje u vodenoj fazi Rastvaranje ili suspendovanje u uljanoj fazi
	Gruba emulzija	Redosled mešanja individualnih faza Dužina trajanja homogenizacije Intenzitet homogenizacije Temperatura homogenizacije
	Homogenizacija pod visokim pritiskom	Temperatura homogenizacije Pritisak homogenizacije Broj ciklusa homogenizacije

Zapravo, prilikom razvoja i optimizacije nanoemulzija obično se primenjuje tradicionalni „*one-factor-at-a-time*“ metod koji se karakteriše promenom samo jednog faktora u vremenu, dok se ostali drže konstantnim tokom ispitivanja. Na taj način procenjuje se efekat odabrane promenljive pod određenim uslovima, pretpostavljajući da su ispitivane promenljive nezavisne jedna od druge, te se interakcije između njih ne uzimaju u obzir. Posledica toga je da dobijeni, prividno optimalni, eksperimentalni rezultat može biti pogrešan (Carbone i sar., 2012; Pey i sar., 2006; Solè i sar., 2010). Nasuprot tome, istovremeno variranje faktora, na dva ili više nivoa, kao što je to u eksperimentalnom dizajnu, pruža mogućnost da se otkriju potencijalno značajne interakcije. Prema tome, eksperimentalni dizajn omogućava ne samo da se dobije veliki broj informacija izvođenjem najmanjeg broja eksperimenata, nego i da se proceni kako direktan efekat svake pojedinačne promenljive, tako i efekat njihovih interakcija na karakteristike formulacije (Kelmann i sar., 2007; Neilloud i sar., 2003; Vitorino i sar., 2011). Ipak, sistematično ispitivanje istovremenog uticaja više formulacionih i/ili procesnih parametara na fizičko-hemijske osobine i stabilnost (parenteralnih) nanoemulzija, primenom koncepta eksperimentalnog dizajna, do sada je sprovedeno u svega nekoliko studija (pun faktorski dizajn – Kelmann i sar., 2007; Marín-Quintero i

sar., 2013; centralni kompozitni dizajn – Musa i sar., 2013; Zainol i sar., 2012; dizajn smeše – Jumaa i sar., 1998; Samiun i sar., 2016).

Zahvaljujući očekivanim prednostima koje se odnose na razumevanje proizvoda i procesa i obezbeđivanje definisanog kvaliteta proizvoda, a oslanjajući se na postojeće znanje, sprovedene eksperimente i upravljanje rizikom, primena koncepta dizajniranja kvaliteta (engl. *quality by design*, QbD) u razvoju i optimizaciji nanoemulzija, iako relativno nova, dosta obećava (Li i sar., 2017). Na slici 1.6 ilustrovani su koraci u implementaciji QbD koncepta prilikom razvoja nanoemulzija:

- (1) Definisanje profila kvaliteta ciljnog proizvoda (engl. *quality target product profile*, QTPP), na osnovu prethodnog znanja i *in vivo* relevantnosti (rastvorljivost lekovite supstance, farmaceutski oblik, put primene, oslobađanje lekovite supstance), odnosno očekivane bezbednosti i efikasnosti (Rathore, 2009);
- (2) Identifikovanje kritičnih atributa kvaliteta (engl. *critical quality attributes*, CQAs), oslanjajući se na prethodno znanje i istraživačko iskustvo – najčešće veličina kapi, raspodela veličina, površinsko naelektrisanje, efikasnost inkapsuliranja lekovite supstance i stabilnost (Li i sar., 2017);
- (3) Odabir kritičnih procesnih parametara (engl. *critical process parameters*, CPPs) – formulacionih (vrsta i koncentracija komponenata) i procesnih (metod dobijanja), na osnovu prethodnog znanja i procene rizika (Li i sar., 2017);
- (4) Definisanje eksperimentalnog prostora (engl. *design space*) nakon sprovođenja eksperimentalnog dizajna i analize rizika (Rathore, 2009);
- (5) Definisanje strategije procesne kontrole – kontrola se sprovodi tokom čitavog procesa kako bi se osigurala konzistentnost i prethodno definisan kvalitet proizvoda (Yu i sar., 2014);
- (6) Validacija procesa – proverava se da li proizvod dobijen u okviru *design space*-a ispunjava zadate kriterijume kvaliteta (Li i sar., 2017).



Slika 1.6. Mapa primene „Quality by Design“ (QbD) koncepta u razvoju i optimizaciji nanoemulzija (prilagođeno iz Li i sar., 2017).

1.5. Fizičko-hemijska karakterizacija i procena stabilnosti nanoemulzija

Bilo da se koriste kao izvor esencijalnih masnih kiselina, izvor energije/kalorija, ili kao nosači slabo rastvorljivih lekovitih supstanci, poznavanje i kontrola bazičnih fizičko-hemijskih osobina i stabilnosti parenteralnih nanoemulzija predstavlja jedan od suštinskih aspekata u razvoju kvalitetnih, bezbednih i efikasnih proizvoda za kliničku upotrebu (Driscoll, 2015). U tom smislu, prvi korak u inače sveobuhvatnoj karakterizaciji parenteralnih nanoemulzija, relevantan za njihovu upotrebu i razvoj, jeste analiza veličine i raspodele veličina kapi. Drugi važan deo karakterizacije čini određivanje elektrostatickog površinskog potencijala. Još jedan relevantni deo karakterizacije obuhvata morfološku analizu razvijenih formulacija nanoemulzija (Haskell, 1998; Silva i sar., 2012). Postoji niz razloga zašto je dobijanje informacija o navedenim fizičko-hemijskim parametrima poželjan, neizostavni deo razvoja parenteralnih nanoemulzija. Prvo, potencijalna fizička stabilnost nanoemulzija često se može predvideti na osnovu veličine i površinskog naelektrisanja kapi; manje i naelektrisane kapi su rezistentnije na flokulaciju i sedimentaciju u poređenju sa sistemima koji sadrže veće, nanaelektrisane kapi; manja veličina kapi je indikator poboljšane kinetičke stabilnosti. Drugo, mehanizmi nastanka nanoemulzija mogu se bolje razumeti na osnovu kvantitativne karakterizacije proizvoda dobijenih pod različitim uslovima, a rezultati služe kao povratna informacija za bolje razumevanje i optimizaciju uslova izrade ili sastava formulacije. Treće, funkcionalna svojstva,

odnosno performanse nanoemulzija *in vivo*, mogu se ponekad kontrolisati, ako ne u potpunosti objasniti, na osnovu razmatranja veličine kapi. Na kraju, bezbednost formulacija parenteralnih nanoemulzija može se bolje proceniti ako se odsustvo većih kapi može da garantuje (Haskell, 1998).

1.5.1. Analiza veličine i raspodele veličina kapi

Prvi i najvažniji korak u karakterizaciji svake parenteralne nanoemulzije, kako sa aspekta kvaliteta i satbilnosti, tako i sa aspekta bezbednosti, jeste opis raspodele veličina kapi, što podrazumeva prosečnu veličinu i indeks polidisperznosti (engl. *polydispersity index*, PDI), kao meru za širinu distribucije kapi po veličini. Pažljivim praćenjem raspodele veličina kapi kod intravenskih emulzija masti utvrđeno je da parenteralne nanoemulzije mogu da sadrže kapi u širokom opsegu veličina: 100–400 nm, 700–1000 nm, i čak 1000–3000 nm. Prisustvo ovako različitih populacija veličina kapi u istoj formulaciji može biti posledica neefikasnog procesa homogenizacije ili nestabilnosti nanoemulzije (Benita i Levy, 1993; Rozentur i sar., 2010). Promene koje se ne mogu videti vizuelnim pregledom, mogu zapravo postojati u veličini male frakcije kapi nanoemulzije, i mogu dovesti do ozbiljnih neželjenih efekata ako veličina kapi prelazi 1–2 μm (Rozentur i sar., 2010). Osim toga, uljane kapi veće od 5 μm su klinički neprihvatljive jer mogu da izazovu plućnu emboliju (Benita i Levy, 1993). Prema tome, neophodno je odrediti veličine različitih populacija kapi nanoemulzije, čak i ako su one prisutne u malom broju (Benita i Levy, 1993; Rozentur i sar., 2010). Pored veličine kapi, PDI je drugi kritičan parametar koji opisuje kvalitet i homogenost nanoemulzije; može imati vrednost od 0 (monodisperzna raspodela) do 0,5 (relativno široka raspodela), pri čemu vrednosti manje od 0,1 ili 0,2 ukazuju na relativno usku, unimodalnu raspodelu veličina kapi i dobar kvalitet nanoemulzionog sistema, te na bolju stabilnost protiv destabilizacionih fenomena kakvo je Ostvaldovo sazrevanje. Za parenteralne nanoemulzije vrednosti PDI do 0,25 smatraju se prihvatljivim (Anton i sar., 2007; Klang i Valenta, 2011; Müller i sar., 2004).

Američka farmakopeja u poglavlju <729> pod nazivom „Raspodela veličina kapi u lipidnim injekcionim emulzijama“ navodi prosečan prečnik kapi i standardnu devijaciju raspodele veličina kapi (raspon različitih prečnika kapi distribuiranih oko prosečnog prečnika) kao neophodne karakteristike veličine kapi lipidnih injekcionih emulzija za

intravensku primenu. Posebno značajne u pogledu stabilnosti i bezbednosti su količine uljanih kapi koje čine tzv. „*large-diameter tail*“ raspodele veličina. Ova dva regiona raspodele veličina kapi – prosečna veličina kapi i „*large-diameter tail*“ – moraju se držati u okviru specificiranih granica, a metode koje se koriste za njihovo određivanje (metod I i metod II, respektivno) moraju biti validirane (USP39–NF34, 2016). Za određivanje prosečne veličine kapi i standardne devijacije raspodele veličina kapi, prema USP <729> može se primeniti bilo koja od dve uobičajene tehnike rasipanja svetlosti: tehnika dinamičkog rasipanja svetlosti, poznata i kao foton korelaciona spektroskopija (engl. *photon correlation spectroscopy*, PCS), ili tehnika klasičnog rasipanja svetlosti zasnovana na Mie teoriji, odnosno laserska difrakcija (engl. *laser diffraction*, LD). Nezavisno od koncentracije dispergovane uljane faze (10–30%), hidrodinamički prosečan prečnik kapi (engl. *intensity-weighted mean droplet diameter*) lipidnih injekcionih emulzija mora biti manji od 500 nm (Driscoll, 2015; USP39–NF34, 2016). Prema USP <729>, za određivanje sadržaja kapi velikog dijametra (> 5 µm) u lipidnim injekcionim emulzijama koristi se metod zatamnjenja (engl. *light obscuration*) ili gašenja svetlosti (engl. *light extinction*) koji se zasniva na tehnici optičkog određivanja veličine pojedinačnih čestica (engl. *single-particle optical sensing*), pri čemu se navodi da zapreminski procenat uljanih kapi većih od 5 µm (PFAT₅) ne sme preći 0,05% (Driscoll, 2015; USP39–NF34, 2016).

Dobijanje pouzdanih vrednosti za prosečnu veličinu kapi, razumevanje ograničenja povezanih sa merenjem ovog parametra i poznavanje efekata polidisperznosti veoma su važni za pravilnu interpretaciju dobijenih rezultata. Takođe, treba imati na umu da različite metode često daju različite rezultate, ne nužno zato što je jedna metoda bolja od druge, nego zato što se zasnivaju na različitim fizičkim principima. Ovo je posebno važno ako se za poređenje uzoraka koriste podaci dobijeni različitim metodama, ili čak različitom implementacijom iste metode, jer mogu dovesti do pogrešnih zaključaka (Haskell, 1998).

1.5.2. Mikroskopska analiza

U kontekstu karakterizacije i procene stabilnosti nanoemulzija, optičke tehnike rasipanja svetlosti (PCS, LD) pokazuju određena ograničenja: (1) nemogućnost detektovanja male populacije većih kapi prisutnih u nanoemulziji (Benita i Levy, 1993); (2) nemogućnost

detektovanja prisustva drugih agregata surfaktanata (pr. liposomalne vezikule, lamelarne strukture) koji su česti sporedni proizvodi HPH i treba da se uzmu u obzir (Klang i sar., 2011); (3) nemogućnost razlikovanja sfernih kapi od čestica varijabilnog oblika ili kristala lekovite supstance (Klang i sar., 2012); (4) razblaživanje uzorka pre merenja usled čega reverzibilni destabilizacioni fenomeni kao što su flokulacija ili pojava većih agregata mogu ostati neprimećeni (Klang i Valenta, 2011). Da bi se prevazišla navedena ograničenja preporučuje se upotreba dodatnih metoda karakterizacije kao što su nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija (Nordén i sar., 2001; Takegami i sar., 2008), infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (Klang i Valenta, 2011) i, naročito, mikroskopska analiza.

Optička svetlosna mikroskopija se može smatrati najjednostavnijom metodom za ispitivanje mikrostrukture nanoemulzija. Međutim, ova tehnika je beskorisna za egzaktnu vizuelizaciju nanokapi ispod 500 nm (Benita i Levy, 1993). U kontekstu nanoemulzija, primena svetlosne mikroskopije ograničena je na detekciju destabilizacionih fenomena kao što su koalescencija i Ostvaldovo sazrevanje (Jumaa i Müller, 1998b; Welin-Berger i Bergenstahl, 2000) ili praćenje faznih promena. Takođe, može da se koristi za detekciju prisustva većih agregata kapi (Baker i Naguib, 2005; Cortés-Muñoz i sar., 2009) ili nerastvorenih kristala lekovite supstance (Akkar i Müller, 2003; Araújo i sar., 2011), dok kretanje u pozadini slike ukazuje na prisustvo kapi nanovelicina koje su u Braunovom kretanju (Klang i sar., 2012). Za tačnu vizuelizaciju strukture nanoemulzija i određivanje veličine kapi, neophodna je veća rezolucija; u tom smislu, elektronska mikroskopija postaje neophodan alat za karakterizaciju nanoemulzija. Među tehnikama elektronske mikroskopije, transmisiona elektronska mikroskopija u kombinaciji sa kriogenom tehnikom pripreme uzorka (*cryo*-TEM) predstavlja metodu izbora za ispitivanje nanoemulzija u njihovom originalnom, nativnom stanju, pri čemu se dobijaju informacije o veličini, obliku kapi i unutrašnjoj strukturi nanoemulzionog sistema i omogućava jasna diferencijacija između uljanih kapi nanovelicina i drugih struktura eventualno prisutnih u nanoemulziji, kao što su vezikule, micle, tečni kristali (Fox, 2009; Klang i sar., 2012). Alternativno se u iste svrhe može koristiti i *freeze-fracture* TEM (Klang i Valenta, 2011).

U novije vreme, među mikroskopskim tehnikama, nedavno razvijena mikroskopija atomskih sila (engl. *atomic force microscopy*, AFM) takođe je našla uspešnu primenu u

karakterizaciji nanoemulzija, obično za potvrđivanje rezultata određivanja veličine kapi (Cortés-Muñoz i sar., 2009; Fang i sar., 2004; Preetz i sar., 2010; Takegami i sar., 2008). U pitanju je brza, moćna i relativno neinvazivna tehnika pomoću koje se mogu dobiti informacije ne samo o veličini i raspodeli veličina kapi, nego i o obliku kapi, morfologiji površine, kao i mogućem procesu agregacije u nanoemulzionom sistemu (Rouzi i sar., 2008; Vitorino i sar., 2011).

1.5.3. Analiza zeta potencijala

Deo standardne procedure u sveobuhvatnoj karakterizaciji parenteralnih nanoemulzija predstavlja i procena zeta potencijala (ZP). ZP približno karakteriše naelektrisanje na površini emulgovanih kapi ulja i jedan je od parametara koji određuju njihovu fizičku stabilnost; veliko površinsko naelektrisanje kapi smatra se, naime, jednim od ključnih faktora u održavanju stabilnosti nanoemulzija (Klang i Valenta, 2011). Da bi se obezbedila dovoljno visoka energetska barijera koja dovodi do odbijanja susednih kapi i rezultira stvaranjem stabilnih nanoemulzija, potrebno je postići visoke apsolutne vrednosti ZP, obično iznad 30 mV (Benita i Levy, 1993; Rozentur i sar., 2010). Smatra se da će stabilnost lipidnih nanoemulzija biti optimizovana kada elektrostatički naelektrisane kapi imaju ZP od -40 mV do -50 mV (Driscoll, 2015). Vrednost ZP, međutim, ne treba posmatrati kao garanciju za stabilnost, jer drugi relevantni faktori nisu obuhvaćeni ovim parametrom (Akkar i Müller, 2003). S druge strane, treba imati u vidu da je ZP inherentna karakteristika sistema, i da se njegove značajnije promene najčešće ne odigravaju kod fizički stabilnih sistema. Nanoemulzije stabilizovane smešom fosfolipida, kao što je to u većini registrovanih parenteralnih nanoemulzija (tabele 1.1 i 1.2), pokazuju negativnu vrednost ZP u opsegu 30–50 mV (Rozentur i sar., 2010).

Površinski potencijal, a shodno tome i ZP nanoemulzionih kapi zavisi od stepena jonizacije komponenata koje formiraju međupovršinski film (Benita i Levy, 1993; Rozentur i sar., 2010). Na ZP nanoemulzija, naročito stabilizovanih lecitinom, mogu da utiču brojni faktori kao što su pH vrednost nanoemulzije, prisustvo elektrolita (jonska jačina), prisustvo katjonskih molekula (Silva i sar., 2012). Niža pH vrednost, na primer, rezultuje nižim ZP usled smanjenja stepena jonizacije nekih fosfolipida (pr. fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina i fosfatidne kiseline) na površini kapi (Benita i

Levy, 1993; Davis i sar., 1987), što dalje može značajno uticati na fizičku stabilnost nanoemulzije. Za procenu ZP obično se primenjuju tehnike mikroeletroforeze ili laserske Doppler elektroforeze/anemometrije koje podrazumevaju merenje elektroforetske pokretljivosti kapi u električnom polju, koja se zatim prevodi u ZP (Klang i Valenta, 2011). Posebno pitanje prilikom određivanja ovog parametra jeste uticaj koji sastav kontinuirane faze može imati na površinski potencijal nanoemulzionih kapi, s obzirom da su konstituenti površine u ravnoteži sa *bulk* medijumom. Kako je razblaživanje uzorka obično preduslov za merenje, prilikom poređenja rezultata iz različitih eksperimenata treba biti svestan uticaja, ako se već ne može da kontroliše, upotrebljenog disperzionog medijuma (Haskell, 1998).

Povećanje negativnih vrednosti ZP nanoemulzija na bazi lecitina, do koga može doći tokom čuvanja ili sterilizacije parom, a koje je najčešće praćeno istovremenim smanjenjem pH vrednosti, obično se pripisuje hidrolizi molekula lecitina, što ima za posledicu formiranje lizolecitina i slobodnih masnih kiselina, koje dalje doprinose većem negativnom naelektrisanju površina kapi, čime se navodno povećava stabilnost nanoemulzija (Baspinar i sar., 2010; Klang i Valenta, 2011). Slobodne masne kiseline mogu takođe da nastanu hidrolizom emulgovanih triglicerida do odgovarajućih mono- i diglicerida, mada se ova reakcija smatra relativno sporom u poređenju sa razgradnjom diacilfosfatidil derivata u fosfolipidima (Benita i Levy, 1993). Opisano povećanje ZP može se, međutim, smatrati samo delimično korisnim, jer je formiranje slobodnih masnih kiselina udruženo sa smanjenjem pH vrednosti, što promoviše dalju degradaciju kroz hidrolizu triglicerida i fosfolipida i destabilizuje nanoemulziju (Baker i Naguib, 2005). Iako se smanjenje pH vrednosti nanoemulzija u toku studija dugotrajne stabilnosti odvija sporo, preporučuje se podešavanje pH neposredno nakon izrade, kao i stabilizacija lecitina, na primer primenom antioksidanasa (Klang i Valenta, 2011).

1.5.4. Reološka analiza

Viskozitet nanoemulzija zasnovanih na lecitinu, kakve su inače sve parenteralne nanoemulzije, obično je veoma nizak, a ponašanje, osim pri veoma velikim brzinama smicanja, Njutnovsko. Za određivanje viskoziteta nanoemulzija koriste se različiti viskozimetri i reometri pogodni za tečne sisteme. Viskozitet nanoemulzija je važan parametar ne samo sa aspekta primene, već i sa aspekta izrade/emulgovanja. Uočeno je

da se manja veličina kapi nanoemulzije može dobiti ukoliko je viskozitet preemulzije veći (Zhou i sar., 2010). Povećanje viskoziteta može da dovede do formiranja manjih kapi jer je stepen koalescencije tokom HPH smanjen; uljane kapi ne mogu da se kreću tako slobodno i brzo. Prema tome, povećanje viskoziteta kontinuirane faze može da smanji učestalost kolizije kapi (Cortés-Muñoz i sar., 2009; Zhou i sar., 2010). Međutim, takođe je uočeno da ukoliko je viskozitet uljane faze veći, treba primeniti veći pritisak homogenizacije da bi se dobile manje kapi nanoemulzije (Jumaa and Müller, 1998b; Yilmaz i Borchert, 2005). Ako je viskozitet kritično visok, a pritisak nedovoljan, može se očekivati veliko povećanje veličine kapi. Razlog je što visok viskozitet može da oteža kretanje lecitina, čime se sprečava da molekuli surfaktanata brzo pokriju uljane kapi tokom izrade, što ima za posledicu povećanje koalescencije (Zhou i sar., 2010). Primenom različitih udela uljane faze, kao i različitih uslova izrade u smislu pritiska i broja ciklusa homogenizacije, mogu se dobiti nanoemulzije veoma različitih viskoziteta (Cortés-Muñoz i sar., 2009). S obzirom da su flokulacija i koalescencija uljanih kapi generalno udružene sa povećanjem viskoziteta, sprovođenje reološke analize je neizostavan deo u proceni stabilnosti nanoemulzija, takođe (Hippalgaonkar i sar., 2010)

1.5.5. Analiza fazne raspodele lekovite supstance u nanoemulziji

Distribucija lekovite supstance u nanoemulziji podrazumeva kompleksan dinamički proces i zavisi od specifičnih svojstava lekovite supstance kao što su lipofilnost, molekulska masa, struktura i rastvorljivost u uljanoj fazi nanoemulzije. Profil raspodele lekovite supstance u nanoemulziji može da utiče na profil oslobađanja lekovite supstance; sporije oslobađanje se očekuje u slučajevima kada je lekovita supstanca inkorporirana u uljano jezgro (Klang i Valenta, 2011). Otuda, analiza *in vitro* oslobađanja lekovite supstance iz nanoemulzija najpre zahteva poznavanje raspodele lekovite supstance u različitim fazama nanoemulzije (Benita i Levy, 1993; Levy i Benita, 1990). Lekovita spstanca u nanoemulziji može biti lokalizovana u uljanoj fazi, na ulje–voda međupovršini, u vodenoj fazi, ili pak u micelama ili liposomima prisutnim u vodenoj fazi (Wang i sar., 2006; Nordén i sar., 2001; Młynarczyk i sar., 2008). Lipofilni molekuli se primarno raspoređuju u uljano jezgro kapi ili fosfolipidni monosloj, mada se određene količine mogu inkorporirati i u fosfolipidni dvosloj liposoma u vodenoj fazi. Hidrofilni molekuli, s druge strane, naći će se pre svega u

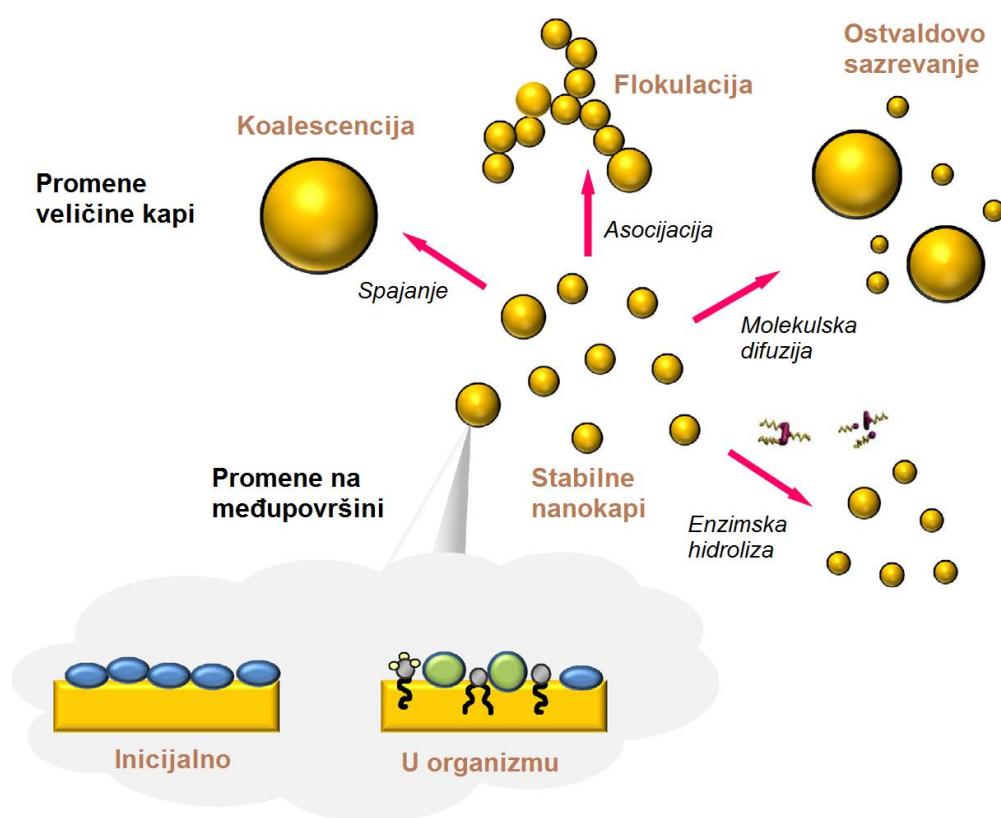
vodenoj fazi ili u sedištu liposoma. Amfifilni molekuli se uglavnom distribuiraju u fosfolipidni sloj nanokapi, a takođe se mogu naći u liposomima ili formirati agregate u vodenoj fazi (Klang i Valenta, 2011).

Za ispitivanje efikasnosti inkorporiranja/kvantifikaciju fazne raspodele lekovite supstance u nanoemulzijama mogu da se koriste različite metode kao što su ultrafiltracija, ultracentrifugiranje, gel filtracija i mikrodijaliza (Benita i Levy, 1993). Separacione metode zasnovane na ultrafiltraciji/ultracentrifugiranju omogućavaju procenu sadržaja lekovite supstance u uljanoj fazi, na međupovršini ulje–voda (indirektno, iz razlike ukupne koncentracije lekovite supstance u intaktnoj nanoemulziji i koncentracija lekovite supstance u uljanoj i vodenoj fazi), kao i u spoljašnjoj vodenoj fazi nanoemulzije. S obzirom da kod ultracentrifugiranja na kraju dolazi do rušenja strukture nanoemulzije i moguće redistribucije lekovite supstance, validnost metode se dovodi u pitanje (Klang i Valenta, 2011). Za analizu raspodele lekovite supstance u različitim fazama nanoemulzije, bez narušavanja strukture, može da se koristi i elektronska paramagnetna rezonantna spektroskopija (Ahlin i sar., 2003).

1.5.6. Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija

Nanoemulzije su termodinamički nestabilni sistemi zbog pozitivne slobodne energije povezane sa stvaranjem ulje–voda međupovršine; naime, slobodna energija koloidne disperzije (uljane kapi u vodi) veća je od slobodne energije odvojenih faza (ulje i voda), što ima za posledicu rušenje sistema tokom vremena, na primer, usled razdvajanja uslovljenog gravitacijom, flokulacije, koalescencije, i/ili Ostvaldovog sazrevanja. Brzina, međutim, kojom se ovi procesi dešavaju kod nanoemulzija značajno se razlikuje u poređenju sa konvencionalnim emulzijama, zbog male veličine kapi nanoemulzija i efekata zakrivljenosti površine. Na primer, nanoemulzije su stabilnije na gravitaciono razdvajanje, flokulaciju i koalescenciju, a manje stabilne na Ostvaldovo sazrevanje. Ako se, međutim, obezbedi dovoljna energetska barijera između dve faze (uljane i vodene), nanoemulzije će biti kinetički stabilne (McClements, 2012; 2011). Otuda, jedan od glavnih fokusa naučnika leži upravo u kreiranju nanoemulzija koje će imati dovoljno dugu kinetičku stabilnost da se omogući njihova komercijalna primena. Kinetička stabilnost nanoemulzija može da se poboljša kontrolom njihovog sastava (pr. uljana i vodena faza) i mikrostrukture (pr. raspodela veličina kapi), ili inkorporiranjem supstanci

poznatih kao stabilizatori, kao što su emulgatori, modifikatori teksture, sredstva za kvašenje ili usporivači sazrevanja. Prema tome, odgovarajućim izborom vrste ulja, vrste emulgatora, njihovih koncentracija, i uslova izrade, mogu se dobiti nanoemulzije zadovoljavajuće kinetičke stabilnosti (meseći i godine) (McClements, 2012; 2011). Neke potencijalne promene u veličini kapi i površinskim svojstvima nanoemulzija do kojih može doći tokom čuvanja, ali i nakon primene *in vivo* prikazane su na slici 1.7. U tom smislu, pored fizičko-hemijske stabilnosti, može se govoriti i o „biološkoj“ stabilnosti parenteralnih nanoemulzija (Keck i sar., 2013).



Slika 1.7. Opšti pregled potencijalnih promena u veličini kapi i površinskim svojstvima parenteralnih nanoemulzija tokom čuvanja ili nakon primene (preuzeto i prilagođeno iz McClements, 2013).

Dobra dugoročna fizička stabilnost čini nanoemulzione sisteme jedinstvenim (Tadros i sar., 2004), a proističe iz činjenice da su konvencionalni destabilizacioni fenomeni, poput kriminga (engl. *creaming*, raslojavanje) i koalescencije, uveliko sprečeni ili usporeni usled Braunovog kretanja malih kapi koje se suprotstavlja gravitaciji (Klang i

sar., 2012; Tadros i sar., 2004; Wooster i sar., 2008). Nanoemulzije su, takođe, otpornije na flokulaciju usled visokoefikasne sterne stabilizacije (Tadros i sar., 2004). Glavni izvor nestabilnosti nanoemulzija je Ostvaldovo sazrevanje, koje predstavlja tendenciju malih kapi da se sjedine u veće, a javlja se kao posledica razlika u rastvorljivosti malih i velikih kapi (Klang i Valenta, 2011; Mason i sar., 2006); male kapi emulzije imaju veću lokalnu rastvorljivost ulja u vodi od većih kapi zbog razlika u Laplasovom pritisku (Wooster i sar., 2008). U toku ovog procesa, dakle, dolazi do molekulske difuzije ulja iz malih kapi na veće kroz kontinuiranu fazu, odnosno veće kapi u emulziji rastu (postaju veće) na račun manjih kapi (Klang i Valenta, 2011; Wooster i sar., 2008). Ovo sporo povećanje veličine kapi će konačno, tokom vremena, dovesti do separacije (odvajanja) faza nanoemulzije (Welin-Berger i Bergenstahl, 2000). Do Ostvaldovog sazrevanja dolazi kada je veličina kapi u opsegu 100–500 nm i manja (Klang i Valenta, 2011), a može se sprečiti dodatkom ulja sa veoma malom rastvorljivošću u vodi (pr. skvalen) i/ili inkorporiranjem polimernih surfaktanata nerastvorljivih u vodenoj fazi, a koji se čvrsto adsorbuju na U/V međupovršinu (pr. A-B-A blok kopolimeri) (Tadros i sar., 2004).

Procena stabilnosti parenteralnih nanoemulzija sprovodi se podrvrgavanjem uzoraka studijama ubrzanog i normalnog starenja. U literaturi se od ubrzanih testova navode sterilizacija parom (5–30 min, 121°C), prekomerno mućkanje (oscilatorno kretanje, 100 obrtaja/min, 48 h, 25°C) i ciklusi zamrzavanja-odmrzavanja (Benita i Levy, 1993). Ovi testovi se generalno koriste za predviđanje roka upotrebe i smatraju se najrelevantnijim za stresne uslove kojima nanoemulzije mogu biti izložene tokom sterilizacije, transporta i čuvanja (Benita i Levy, 1993; Rozentur i sar., 2010). Dugoročne studije stabilnosti parentralnih nanoemulzija izvode se čuvanjem uzoraka tokom određenog vremena (preko 10 meseci, obično 18–24 meseca), na temperaturama u opsegu od 4°C do 40°C (pr. 4, 25 i 37°C, Levy i Benita, 1991). Treba naglasiti da rezultati ispitivanja stabilnosti dobijeni tokom ubrzanih testova koji se sprovode na povišenim temperaturama generalno ne reflektuju stvarnu stabilnost nanoemulzija kada se one čuvaju na normalnim temperaturama (Benita i Levy, 1993). Velika neusklađenost uočena između predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti mogla bi se objasniti nestabilnošću nanoemulzija i degradacijom fosfolipida na povišenim temperaturama. Nanoemulzije izložene velikim varijacijama temperature podležu dramatičnim fizičko-hemijskim promenama, tako da može doći do narušavanja njihovog fizičkog integriteta. Prema

tome, dugoročna stabilnost nanoemulzija, i posledično indukovana zaštita lekovite supstance osetljive na hidrolizu, ne mogu se predvideti na osnovu eksperimenata sprovedenih na visokim temperaturama (Benita i Levy, 1993; Rozentur i sar., 2010). Tokom ispitivanja stabilnosti, uzorci čuvani pod različitim uslovima posmatraju se kritički na pojavu vidljivih znakova razdvajanja faza i promene organoleptičkih osobina, i prate u određenim vremenskim intervalima na promene u sadržaju lekovite supstance, veličini i raspodeli veličina kapi, površinskom naelektrisanju, pH vrednosti, električnoj provodljivosti, viskozitetu, i hemijskom sastavu. Pored ovih ispitivanja, za procenu roka upotrebe takođe je potrebno uključiti ispitivanja za utvrđivanje sterilnosti i odsustva pirogena, validiranim, priznatim mikrobiološkim metodama (Benita i Levy, 1993; Rozentur i sar., 2010).

1.6. *In vitro* ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance iz nanoemulzija

Primena parenteralnih nanoemulzija kao nosača za kontrolisanu ili ciljnu isporuku lekovite supstance suočena je sa dva glavna problema; prvo, kontrolisati brzinu oslobađanja lekovite supstance iz nosača, i drugo, postići specifično, željeno *in vivo* ponašanje. Prvi problem je ozbiljan jer je vreme oslobađanja lekovite supstance iz nanoemulzija izuzetno kratko, te je teško upratiti kako nanoemulziona kapi nose lekovitu supstancu do ciljnog mesta. Pod ovakvim okolnostima nanoemulzije se posmatraju kao pogodni nosači samo za hidrofobne lekovite supstance koje se ne mogu formulirati u vidu parenteralno prihvatljivog rastvora. Izuzetak su lekovite supstance čvrsto vezane (usled velike hidrofobnosti) za nanoemulziona kapi; ovakve supstance će se oslobađati iz kapi tokom njihove cirkulacije u krvi, pošto se lokalni *sink* uslovi u plazmi iznova kontinuirano obezbeđuju. Količina oslobođene lekovite supstance zavisiće od lokalne raspodele iz čega proističe da je oslobađanje pre termodinamički kontrolisan negoli kinetički kontrolisan proces. Na brzinu oslobađanja lekovite supstance može da utiče veliki broj lokalnih faktora kao što su brzina protoka u cirkulaciji, particioni koeficijent ($\log P$) lekovite supstance i specifične interakcije sa komponentama krvi (pr. proteinima plazme). Iako ovo donosi neke interesantne mogućnosti, mnogo je poželjnije da oslobađanje lekovite supstance bude kontrolisano

faktorima formulacije nego da bude zavisno od veoma varijabilnih bioloških faktora (Washington, 1998).

Postoje dve granične situacije za oslobađanje lekovite supstance iz nanoemulzija; prva, u kojoj je difuzija lekovite supstance kroz nanoemulzione kapi ta koja ograničava brzinu oslobađanja, i druga, u kojoj je transport lekovite supstance kroz međupovršinu ograničavajući faktor. U slučaju kontrolisane difuzije, brzina oslobađanja lekovite supstance zavisiće od viskoziteta uljane faze i difuzionog koeficijenta lekovite supstance u ulju; za klasične lekovite supstance inkorporirane u trigliceridne nanoemulzije očekuje se vreme oslobađanja reda 10 μ s. Jedini izvodljiv način da se ovo oslobađanje uspori na potreban nivo (minuti i sati) jeste da se izvrši drastična promena u viskozitetu, odnosno da nanoemulziona kap postane čvrsta čestica. Ovo vodi do dobro poznatih lipidnih čestičnih sistema, ali se time udaljava od cilja (i mnogih prednosti) rada sa nanoemulzijama. Alternativni pristup za postizanje kontrolisanog oslobađanja jeste da se upotrebom odgovarajućih emulgatora obezbedi adekvatna međupovršinska barijera. Da bi se ovo postiglo, potrebno je poznavati efekat emulgatora na brzinu oslobađanja lekovite supstance, za šta su neophodne adekvatne metode karakterizacije (Washington, 1998).

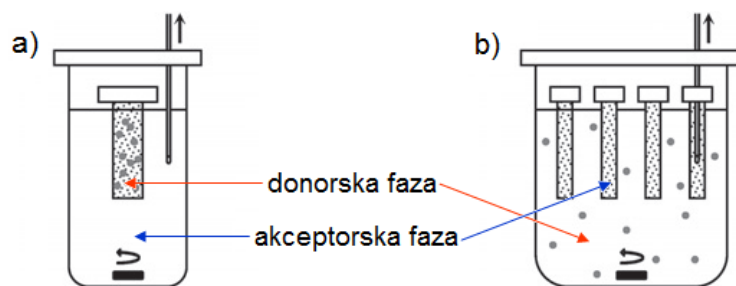
Zaista, prilikom dizajniranja parenteralnih nanoemulzija kao koloidnih nosača lekova, ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance iz nosača od posebnog je značaja; podaci dobijeni ovim ispitivanjem mogu da se koriste za procenu preparata u fazi razvoja, u kontroli kvaliteta, i za predviđanje *in vivo* performansi/ponašanja razvijenog nosača (Brown i sar., 2011; Burgess i sar., 2004; Shah i sar., 2015; Shen i Burgess, 2012). U tehničkom smislu, karakterizacija *in vitro* oslobađanja lekovite supstance iz nanoemulzija predstavlja izazov zbog submikronske veličine kapi i poteškoća u razdvajanju kontinuirane i dispergovane faze (Benita i Levy, 1993; Chidambaram i Burgess, 1999; Hippalgaonkar i sar., 2010). Submikronske kapi imaju veliku slobodnu površinu u poređenju sa volumenom što može da dovede do brzog transporta lekovite supstance iz uljane u vodenu fazu i potencijalnog narušavanja *sink* uslova u blizini kapi (Chidambaram i Burgess, 1999). Za razliku od oralnih i transdermalnih farmaceutskih oblika, za parenteralne preparate ne postoji standardni farmakopejski ili neki drugi regulatorno propisan metod za *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance (Brown i sar., 2011; Burgess i sar., 2004; Shah i sar., 2015; Shen i Burgess, 2012).

Metode koje su do sada korišćene u tu svrhu, sa više ili manje uspeha, uključuju metode uzorkovanja i odvajanja (engl. *sample-and-separate methods*), kontinuirane protočne metode (engl. *continuous flow methods*), *in situ* metode, i membranske metode (engl. *membrane barrier methods*) u koje spada metoda sa difuzionom ćelijom (engl. *side-by-side diffusion cell method*) i metoda sa dijaliznom vrećicom (engl. *dialysis sac/bag method*) (Chidambaram i Burgess, 1999; Shen i Burgess, 2012). Među trenutno dostupnim aparaturama, za karakterizaciju *in vitro* oslobađanja lekovite supstance iz parenteralnih emulzija preporučuje se USP aparatura 4 (protočna ćelija), uz odgovarajuću modifikaciju, kao i tehnika tradicionalne i reverzne dijalize uz primenu vrećica (Shah i sar., 2015).

Sa izuzetkom tehnike reverzne dijalize sa vrećicama, svaka od gore navedenih metoda praćena je određenim nedostacima. Metode uzorkovanja i odvajanja (ultrafiltracione tehnike) uključuju korake filtracije i centrifugiranja kako bi se lekovita supstanca oslobođena u kontinuiranu fazu odvojila od uljanih kapi; međutim, primena spoljašnje energije može da dovede do destabilizacije nanoemulzije, povećanja brzine oslobađanja lekovite supstance i, stoga, pogrešnih rezultata (Benita i Levy, 1993; Chidambaram i Burgess, 1999). Kod *in situ* metode, nanoemulzija se beskonačno razblažuje (nema narušavanja *sink* uslova), a sadržaj oslobođene lekovite supstance određuje bez razdvajanja od samog nosača; međutim, tehnika nije pogodna za sva jedinjenja jer zahteva upotrebu analitičke metode koja može da detektuje lekovitu supstancu bez interferencija sa nanoemulzionim sistemom (Chidambaram i Burgess, 1999; Hippalgaonkar i sar., 2010). Kontinuirane protočne metode podrazumevaju dodatak nosača lekovite supstance u filtracionu/protočnu ćeliju kroz koju medijum za oslobađanje (*sink* rastvor) kontinuirano cirkuliše i istovremeno se analizira. Ograničenje tehnike ogleda se u začepljenju filtera koje uzrokuje promene u protoku medijuma, kao i destabilizaciju nanoemulzije, što može da utiče na brzinu oslobađanja lekovite supstance (Hippalgaonkar i sar., 2010). Kod membranskih metoda sa difuzionom ćelijom i dijaliznom vrećicom, koje su i najviše korišćene, nanoemulzija je od akceptorskog medijuma razdvojena polupropustljivom dijaliznom membranom, a oslobađanje lekovite supstance se prati tokom vremena. Nedostatak ovih metoda je to što se nanoemulzija nikada ne razblažuje medijumom za oslobađanje, te se eksperimenti ne odvijaju pod *sink* uslovima, čak ni kada se ovakvi uslovi konstantno održavaju u

akceptorskom kompartmentu gde se vrši uzorkovanje. Lekovita supstanca u uljanoj fazi će biti u ravnoteži sa lekovitom supstancom u kontinuiranoj fazi, a sveukupni kinetički proces je određen brzinom raspodele lekovite supstance između uljane i vodene faze nanoemulzije pre nego brzinom difuzije lekovite supstance kroz mešani emulgujući međupovršinski film; posledično, prava brzina oslobađanja lekovite supstance ne biva izmerena (Chidambaram i Burgess, 1999; Hippalgaonkar i sar., 2010; Levy i Benita, 1990; Washington, 1989). Dodatno, površina dostupna za difuziju lekovite supstance iz nanoemulzionih kapi u kontinuiranu fazu je značajno veća od površine dijalizne membrane dostupne za difuziju lekovite supstance iz donorske u akceptorsku fazu, što takođe može da dovede do daljeg narušavanja *sink* uslova (Chidambaram i Burgess, 1999).

U cilju prevazilaženja navedenih ograničenja, razvijena je tehnika reverzne dijalize sa vrećicama (slika 1.8b) u kojoj čist medijum napunjen u dijalizne vrećice predstavlja akceptorsku fazu, a ispitivana nanoemulzija dispergovana u odgovarajućoj zapremini medijuma koji okružuje dijalizne vrećice predstavlja donorsku fazu (Benita i Levy, 1993; Levy i Benita, 1990; Chidambaram i Burgess, 1999). Primenom ove metode postiže se maksimalno (teorijski beskonačno) razblaženje nanoemulzije u medijumu, a oslobađanje lekovite supstance odvija pod savršenim *sink* uslovima (Levy i Benita, 1990). Naime, u nerazblaženoj nanoemulziji, u stanju ravnoteže, lekovita supstanca je raspodeljena između unutrašnje uljane faze, spoljašnje vodene faze, i micela prisutnih u vodenoj fazi nanoemulzije (Friedman i Benita, 1987). Nakon razblaživanja nanoemulzije medijumom uspostavlja se nova ravnoteža i lekovita supstanca se raspodeljuje između uljanih kapi nanoemulzije i medijuma (*sink* rastvor), koji sada postaje spoljašnja faza nanoemulzije. Lekovita supstanca koja se oslobodi iz uljanih nanokapi difunduje najpre u *sink* rastvor, a zatim u dijaliznu vrećicu, do uspostavljanja ravnoteže, pri čemu je uočeno da se koncentracija lekovite supstance povećava u dijaliznoj vrećici, a ostaje praktično nepromenjena u *sink* rastvoru. Dodatna prednost metode jeste direktna izloženost velike slobodne površine nanoemulzionih kapi velikoj zapremini *sink* rastvora, čime se oponašaju biološki uslovi nakon parenteralne primene (Levy i Benita, 1990).



Slika 1.8. Shematski prikaz *bulk equilibrium* tradicionalne (a) i reverzne (b) tehnike sa dijaliznim vrećicama (prilagođeno iz [Seidlitz i Weitschies, 2012](#)).

Prilikom razvoja dijalizne metode za *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance, različite faktore kao što su uslovi agitacije, sastav medijuma za oslobađanje (prisustvo organskog rastvarača, albumina, enzima), zapremina donorske i akceptorske faze, molekulska masa dijalizne membrane i potencijalno vezivanje lekovite supstance za membranu, treba uzeti u obzir ([Benita i Levy, 1993](#); [Shen i Burgess, 2012](#)). Poznavanje i razumevanje faktora koji utiču na oslobađanje lekovite supstance iz parenteralnih nanoemulzija, kako iz *in vivo*, tako i iz *in vitro* perspektive, olakšava razvoj značajnih testova za *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja i postavljanje odgovarajućih specifikacija.

1.7. Sudbina nanoemulzija u organizmu nakon parenteralne primene

Sudbina leka u organizmu (engl. *in vivo fate, biofate*) određena je ne samo osobinama lekovite supstance, nego u velikoj meri i osobinama samog nosača, koji treba da omogući kontrolisano i lokalizovano oslobađanja lekovite supstance na mestu dejstva. Da bi se postigla efikasna ciljna isporuka lekovite supstance intravenskim putem, primenom nanočestičnih sistema, uključujući nanoemulzije, neophodno je da se izbegne prepoznavanje injektovanih čestica kao stranih i posledični klirens od strane ćelija mononuklearnog fagocitnog sistema (engl. *mononuclear phagocyte system, MPS*), uglavnom preuzimanjem od strane makrofaga jetre i slezine (90–95% injektovane doze). Drugi preduslov je dovođenje nosača koji su uspešno izbegli MPS na ciljno mesto dejstva. Ključni faktor za oba izazova su proteini plazme koji se adsorbuju na površinu nanočestičnih nosača neposredno nakon intravenske primene, određujući profil njihove distribucije u organizmu. Povezivanje fizičko-hemijskih osobina parenteralnih

nanoemulzija sa njihovom sudbinom u organizmu, a preko analize profila adsorbovanih proteina plazme, može značajno da ubrza razvoj formulacija parenteralnih nanoemulzija, na kontrolisan način, u smislu optimizovane distribucije u organe i, povezano s tim, farmakokinetike inkorporirane lekovite supstance (Keck i sar., 2013; Müller i Göppert, 2007).

1.7.1. Mehanizmi eliminacije parenteralnih nanoemulzija

Nakon intravenske primene, konvencionalne nanoemulzije prve i druge generacije eliminišu se iz organizma na dva načina – metabolišu se kao endogeni hilomikroni, ili bivaju prepoznate kao strana tela i uklanjaju se pomoću ćelija MPS (pr. Kupferove ćelije jetre i makrofagi slezine). Koji će mehanizam eliminacije biti zastupljen, ili dominantan, zavisi od sastava i fizičko-hemijskih svojstava nanoemulzije (Rossi i Leroux, 2007). Kada se pak daju drugim parenteralnim putevima, na primer, intraperitonealno, subkutano ili intramuskularno, većina nanoemulzionih kapi ulazi u limfni sistem i na kraju u krvotok gde se ponašaju kao da su date intravenski. Preuzimanje u jetru, slezinu i koštanu srž je u tom slučaju značajno manje. Limfni transport je pretežno povezan sa transportom zasnovanim na hilomikronima (Tamilvanan, 2009; 2004).

1.7.1.1. Eliminacija nanoemulzija zasnovana na metabolizmu endogenih hilomikrona

Hilomikroni su lipoproteinske čestice (endogene emulzije) koje nastaju u enterocitima tankog creva nakon unosa lipida hranom. Kao i lipidne injekcione emulzije, i hilomikroni su bogati trigliceridima i stabilizovani slojem fosfolipida (Kawakami i sar., 2000; Rossi i Leroux, 2007). Prosečna veličina nanoemulzionih kapi (200–400 nm) ulazi u opseg veličina hilomikrona (75–1000 nm); stoga se predlaže da je metabolička sudbina parenteralnih nanoemulzija analogna metabolizmu hilomikrona (Hippalgaonkar i sar., 2010; Hörmann i Zimmer, 2016). Hilomikroni se sekretuju u limfu i ulaze u sistemsku cirkulaciju kroz *ductus thoracicus*. Nakon ulaska u krv, hilomikroni dobijaju od lipoproteina velike gustine (engl. *high-density lipoproteins*, HDL) apolipoproteine ApoC-II i ApoE, a oslobađaju ApoA-IV. U kapilarima adipoznog tkiva i mišića, lipoproteinska lipaza (LPL), locirana na endotelnim ćelijama, adsorbuje se na zrele

hilomikrone i hidrolizuje trigliceride do masnih kiselina, koje se onda resorbuju uglavnom u adipozno tkivo i mišiće. Tokom lipolize, značajna količina fosfolipida, ApoA i ApoC prenosi se na HDL, pri čemu se veličina hilomikrona značajno smanjuje. Ostaci hilomikrona (30–50 nm), koji se najvećim delom sastoje od ApoB-48, ApoE i holesterola, brzo se uklanjaju iz krvi preuzimanjem u jetru preko dva ApoE-specifična mesta vezivanja na parenhimskim ćelijama, a to su receptor za lipoproteine male gustine (engl. *low-density lipoprotein*, LDL) i receptor za ostatke (Carpentier i Dupont, 2000; Rossi i Leroux, 2007).

Za razliku, međutim, od hilomikrona koji pre ulaska u sistemsku cirkulaciju poseduju apolipoproteine ApoA-I, ApoA-IV i ApoB-48 (Kawakami i sar., 2000), lipidne nanoemulzije inicijalno nemaju apolipoproteine na svojoj površini i imaju veći sadržaj fosfolipida (Hippalgaonkar i sar., 2010; Rossi i Leroux, 2007). Nakon intravenske primene, nanoemulziona kapi, u roku od nekoliko minuta, dobijaju apolipoproteine (ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoE, i moguće ApoA-IV), uglavnom od HDL. ApoC-II je neophodan za aktivaciju LPL, a ApoE pomaže u uklanjanju ostataka nanoemulzije putem jetre. Kada jednom dobiju apolipoproteine, kapi nanoemulzije metabolišu se putem sličnim kao za hilomikrone – vezuju se za LPL, što dovodi do hidrolize triglicerida i oslobađanja slobodnih masnih kiselina, koje zatim okolna tkiva koriste kao izvor energije ili se pak skladište u adipoznom tkivu (Carpentier i Dupont, 2000; Hippalgaonkar i sar., 2010). Eliminacija parenteralnih nanoemulzija na način kojim se odvija metabolizam prirodnih masti može biti poželjna u slučaju kada su parenhimske ćelije jetre ciljno mesto dejstva lekovite supstance. U suprotnom, ako jetra nije ciljni organ, adsorbovanje apolipoproteina na kapi nanoemulzije trebalo bi izbeći. Metabolizam lipidnih emulzija kao prirodnih masti dosta zavisi od tipa emulgatora, prisustva holesterola i vrste ulja, odnosno dužine lanca masnih kiselina u trigliceridima (tabela 1.6) (Rossi i Leroux, 2007).

1.7.1.2. Eliminacija nanoemulzija pomoću mononuklearnog fagocitnog sistema

Ako telo prepozna parenteralne nanoemulzije kao strane, onda će one biti preuzete od strane ćelija MPS i veoma brzo uklonjene iz sistemske cirkulacije. MPS ćelije preuzimaju nanoemulziona kapi endocitozom i lokalizuju ih u lizozomskom kompartmentu, gde dolazi do degradacije pod dejstvom enzima. Stepenn klirensa iz

sistemske cirkulacije povećava se adsorbovanjem proteina plazme poznatih kao opsonini (pr. imunoglobulin IgG, komponente komplemента kao što su C1q i C3 fragmenti, fibrinogen) na površinu kapi nanoemulzije; vezani proteini, zatim, interaguju sa receptorima na monocitima i makrofagima, olakšavajući endocitozu. Proces opsonizacije i posledični klirens nanokapi pomoću makrofaga jetre odvija se veoma brzo, obično se do 90% injektovane nanoemulzije preuzme u jetru u roku od pet minuta. Ako se pak disopsonini (pr. serumski albumin, IgA) adsorbuju na površinu kapi nanoemulzije, preuzimanje u MPS će biti smanjeno, a vreme cirkulacije nanoemulzije posledično produženo (Hörmann i Zimmer, 2016; Tamilvanan, 2009; 2004).

Kritična karakteristika nanoemulzija kao nosača za (ciljnu) isporuku lekovite supstance jeste sposobnost da izbegnu brzo preuzimanje iz cirkulacije od strane ćelija MPS (kada ciljno mesto dejstva nisu MPS tkiva). Mada opterećenje ili zasićenje MPS primenom velikih volumena injektovanja može da produži vreme cirkulacije lipidnih nanoemulzija, privremeno narušavanje funkcije MPS može imati negativne posledice po zdravlje pacijenta (Hörmann i Zimmer, 2016; Rossi i Leroux, 2007). Alternativno, brzina klirensa nanoemulzionog nosača iz krvi može da se izmeni modifikovanjem fizičko-hemijskih svojstava nanoemulzije, kao što su, na primer, veličina kapi (Takino i sar., 1994) i površinske karakteristike (Liu i Liu 1995). U tabeli 1.6 pobrojani su neki od faktora koji utiču na opsonizaciju, te preuzimanje od strane MPS i brzinu eliminacije nanoemulzija iz sistemske cirkulacije.

Tabela 1.6. Faktori koji utiču na sudbinu nanoemulzija u organizmu nakon parenteralne primene (Tamilvanan, 2004)

Faktori	Metabolizam analogan metabolizmu lipoproteina		Preuzimanje od strane MPS		Eliminacija iz sistemske cirkulacije	
	Slab	Intenzivan	Slabo	Intenzivno	Spora	Brza
Veličina kapi	Velika	Mala	Mala	Velika	Mala	Velika
Emulgator	DPPC	EYPC	DPPC	–	DPPC	EYPC
	DSPC	–	–	DSPC	–	DSPC
	SM	–	SM	–	SM	–
	Poloksameri	–	Poloksameri	–	Poloksameri	–
Koemulgator	HCO-60	–	HCO-60	–	HCO-60	–
	PEG-PE	–	PEG-PE	–	PEG-PE	–
	Polisorbati	–	Polisorbati	–	Polisorbati	–
	Solutol	–	Solutol	–	Solutol	–
	–	–	–	–	Holesterol	–
	–	–	–	–	CO	–
	–	–	–	–	SA/OA	–
Katjonski lipid	SA/OA	–	SA/OA	–	SA/OA	–
Uljana faza	LCT	MCT	–	–	LCT	MCT
	–	–	–	–	SLS	SLM
	–	–	–	–	–	–
Opsonizacija	–	–	Slaba	Izražena	Slaba	Izražena
Nestabilnost uljanih kapi u krvotoku	–	–	–	–	Mala	Velika
Preopterećenje MPS	–	–	–	–	Veliko	Malo

MPS: mononuklearni fagocitni sistem; DPPC: dipalmitoilfosfatidilholin; EYPC: fosfatidilholin iz jajeta; DSPC: distearoilfosfatidilholin; SM: sfingomijelin; HCO-60: polioksietilen-(60)-hidrogenizovano ricinusovo ulje; PEG-PE: derivat fosfatidiletanolamina sa polietilenglikolom; CO: holesteriloleat; SA: stearilamin; OA: oleilamin; LCT: dugolančani trigliceridi; MCT: trigliceridi srednje dužine lanca; SLS: strukturiran lipid sa kratkolančanim masnim kiselinama (C4) na pozicijama 1 i 3; SLM: strukturiran lipid sa masnim kiselinama srednje dužine lanca (C8–C10).

1.7.2. Biodistribucija parenteralnih nanoemulzija

Biodistribucija nanoemulzija nakon parenteralne (intravenske) primene primarno zavisi od veličine kapi, sastava (uljana faza, emulgator) i površinskih svojstava nanoemulzije. Otuda se određena specifičnost nanoemulzije prema ciljnom organu može postići kontrolom njenih fizičko-hemijskih osobina (Hippalgaonkar i sar., 2010; Rossi i Leroux, 2007). Dobro je poznato da veličina kapi u velikoj meri utiče na preuzimanje nanoemulzija od strane MPS. Generalno, veće kapi su osjetljivije na preuzimanje od strane MPS i eliminišu se iz sistemske cirkulacije brže od manjih kapi, koje ostaju duže u cirkulaciji i manje se akumuliraju u jetri (Takino i sar., 1994). Veličina kapi nanoemulzije utiče na lipolizu, takođe. *In vitro* eksperimenti su pokazali da je brzina lipolize veća kod nanoemulzija sa manjom veličinom kapi (oko 100 nm) u poređenju sa nanoemulzijama sa većim kapima (225–416 nm); pa ipak, nakon intravenske primene ovih formulacija kod pacova, nanoemulzije sa malim kapima ostaju duže u cirkulaciji od onih sa većim kapima (Kurihara i sar., 1996), u skladu sa pređašnjim nalazima (Takino i sar., 1994). Znači, iako su male kapi nanoemulzije bolji supstrat za LPL, veće kapi se eliminišu iz krvotoka brže, što ukazuje na veće preuzimanje od strane MPS (Rossi i Leroux, 2007).

Sposobnost nanoemulzije da „pobegne“ iz sistemske cirkulacije kroz zidove kapilara i dospe u ekstravaskularni prostor, takođe je određena veličinom kapi, što posebno može biti od koristi u terapiji tumora. Za razliku od zdravog tkiva, vaskulatura u tumorskom tkivu je porozna ili propustljiva („leaky“), što omogućava povećanu permeaciju koloidnih čestica kroz endotel u ekstravaskularni prostor. Dodatno, tumorska tkiva imaju slabu limfnu drenažu, što omogućava da koloidne čestice duže ostanu u tkivu. Za uspešnu akumulaciju lekovite supstance u tumorskom tkivu pomoću povećanog permeacionog i retencionog efekta, poželjno je da veličina koloidnih čestica bude oko 50–200 nm i da njihova koncentracija u plazmi bude dovoljno visoka više od 6 h. Prema tome, pogodnim izborom veličine kapi, nanoemulzije mogu da povećaju isporuku citotoksičnih jedinjenja u tumorska tkiva i da smanje njihovu sistemska toksičnost (Rossi i Leroux, 2007).

Sastav unutrašnje, uljane faze predstavlja još jedan faktor koji može da izmeni biološku sudbinu submikronskih lipidnih emulzija. Utvrđeno je da se nanoemulzije sa MCT u sastavu brže eliminišu iz plazme u odnosu na nanoemulzije izrađene sa LCT, što je

verovatno posledica brže hidrolize MCT pod dejstvom LPL i hepatičnih lipaza (Deckelbaum i sar., 2004), usled veće rastvorljivosti i pokretljivosti triglicerida sa kraćom dužinom lanca na ulje–voda međupovršini nanoemulzije (Rossi i Leroux, 2007). Kod nanoemulzija koje pak sadrže riblje ulje, smatra se da intravaskularna LPL-posredovana lipoliza ima ograničenu ulogu u klirensu, verovatno zbog prisustva omega-3 nezasićenih masnih kiselina na položaju *sn2* triglicerida za koje LPL nije specifična, i koji se stoga sporije hidrolizuju (Hippalgaonkar i sar., 2010). Dodatak ribljeg ulja u malom procentu u nanoemulzije koje sadrže MCT i LCT značajno može da promeni njihov klirens i mehanizme preuzimanja u tkiva (Qi i sar., 2006).

Pokazano je takođe da dodatak slobodnog holesterola može da promeni metabolizam trigliceridnih nanoemulzija izmenom vezivanja apolipoproteina na površini nanoemulzionih kapi (Rossi i Leroux, 2007). Prisustvo slobodnog holesterola može da ili promoviše klirens nanoemulzije ili da produži vreme zadržavanja u plazmi, zavisno od vrste upotrebljenog emulgatora i uljane faze. Prema tome, da bi se utvrdilo da li slobodan holesterol treba uključiti u formulaciju nanoemulzije ili ne, neophodan je „*case-by-case*“ pristup zasnovan na unapred postavljenom ciljnom profilu nanoemulzije. Pored toga, ispitivanja su neophodna kako bi se razumela farmakokinetika i distribucija u tkiva nanoemulzija u prisustvu esterifikovanog holesterola (Hippalgaonkar i sar., 2010).

Biodistribucija nanoemulzija može da se promeni i zavisno od prirode fosfolipidnog emulgatora (Rossi i Leroux, 2007). Utvrđeno je, na primer, da se nanoemulzije stabilizovane fosfatidilholinom ili 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfatidilholinom (POPC) metabolišu na sličan način kao hilomikroni, dok nanoemulzija zasnovana na 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilholinu (DPPC) najduže ostaje u plazmi; trigliceridi povezani sa ovom nanoemulzijom eliminišu se veoma sporo, što ukazuje na njihovu manju osetljivost na hidrolizu pod dejstvom LPL. Osim toga, nema prenosa fosfolipida na HDL. Ovakvi nalazi bi se možda mogli objasniti razlikom u (ne)zasićenosti acil lanaca između različitih fosfolipidnih emulgatora. Pretpostavlja se da je za brzu hidrolizu triglicerida pod dejstvom LPL i efikasan prenos fosfolipida na HDL čestice neophodno prisustvo nezasićenog lanca u strukturi fosfolipida na poziciji *sn2* glicerola (Lenzo i sar., 1988; Rossi i Leroux, 2007).

Generalno je prihvaćeno da površinsko naelektrisanje nanoemulzije ima određeni efekat na brzinu preuzimanja nanoemulzionih kapi od strane MPS, mada je veza daleko od jednostavne. Druge površinske karakteristike, kao što je priroda emulgatora, mogu imati prednost nad efektima samog površinskog naelektrisanja. Istraživanja su pokazala da između ZP i brzine preuzimanja nanoemulzije od strane mišjih peritonealnih makrofaga ne postoji jasna korelacija, iako su se nanoemulzije sa najmanjim naelektrisanjem, izrađene sa nejonskim surfaktantom poloksamerom 338 odlikovale najmanjom brzinom preuzimanja. Utvrđeno je, dalje, da se nanoemulzije sa većim površinskim naelektrisanjem (pozitivnim ili negativnim) fagocituju brže od onih sa neutralnim ili slabo naelektrisanim površinama (Rossi i Leroux, 2007).

Još jedan važan faktor koji treba razmotriti kada se dizajniraju parenteralne nanoemulzije kao nosači lipofilnih lekovitih supstanci jeste sposobnost zadržavanja lekovite supstance unutar uljanih kapi nanoemulzije nakon intravenske primene. Kontrola biodistribucije samih kapi neće povećati terapijski efekat ako se lekovita supstanca oslobodi iz nosača pre nego što on dospe na ciljno mesto (Rossi i Leroux, 2007). Drugim rečima, lipofilnost inkorporirane lekovite supstance ima važnu ulogu u biodistribuciji. Ako je lipofilnost niska, lekovita supstanca se može prilično brzo osloboditi iz uljanih kapi nanoemulzije u sistemsku cirkulaciju, a zatim dalje metabolisati. Ako je pak lipofilnost dovoljno visoka, lekovita supstanca može da se zadrži u uljanim kapima, koje onda funkcionišu kao rezervoar lekovite supstance ili pomažu u ciljnoj isporuci leka (Hörmann i Zimmer, 2016). U literaturi se navode različite vrednosti za $\log P$ koje lekovita supstanca treba da ima da bi se sprečilo njeno brzo oslobađanje iz nanoemulzije u sistemsku cirkulaciju, odnosno da bi ostala dovoljno dugo inkorporirana u kapima nanoemulzije u sistemskej cirkulaciji (Hippalgaonkar i sar., 2010). Dobra strategija za povećanje vremena cirkulacije u krvi i, posledično, promenu biodistribucije lekovite supstance primenjene u vidu nanoemulzije može biti povećanje lipofilnosti lekovite supstance formiranjem kompleksa sa oleinskom kiselinom (pr. doksorubicin- i likobetain-oleinska kiselina jonski kompleks) (Zhang i sar., 2011; Zhao i sar., 2013) ili fosfolipidima (pr. etopozid-, vinorelbin- i klaritromicin-fosfolipid kompleks) (Chen i sar., 2010; Li i sar., 2013; Lu i sar., 2009).

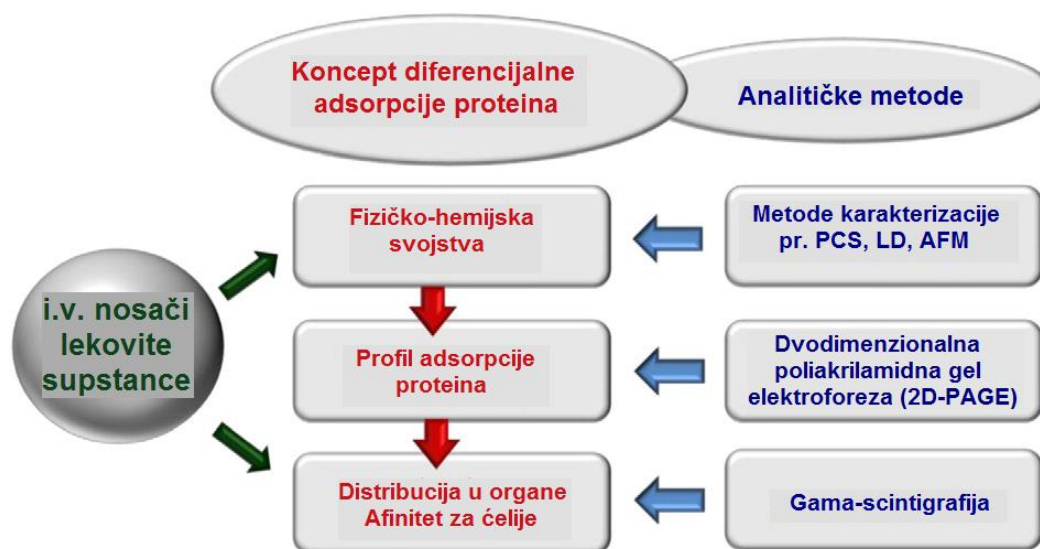
1.7.3. Koncept diferencijalne adsorpcije proteina

Nakon intravenske primene, uljane kapi nanoemulzija sa inkorporiranom lekovitom supstancom dolaze u kontakt sa preko hiljadu različitih proteina plazme, od kojih se nekoliko stotina adsorbuje na površinu nanoemulzionih kapi, obrazujući proteinski omotač poznat kao „*corona*“. Najpre se adsorbuju proteini sa malim afinitetom prisutni u velikoj koncentraciji („*soft corona*“), a onda oni bivaju postepeno istisnuti proteinima kojih ima u manjoj koncentraciji ali imaju veći afinitet za površinu čestica, što konačno dovodi do formiranja sloja čvrsto vezanih proteina oko kapi, koji čine finalni omotač („*hard corona*“) (Keck i sar., 2013; Mahon i sar., 2012). Krajem prošlog veka je postalo jasno i generalno je prihvaćeno da upravo interakcija između nanoemulzionih kapi i proteina plazme igra ključnu ulogu u određivanju sudbine nanoemulzija *in vivo*: adsorbovani proteini mogu da interaguju sa specifičnim receptorima na membrani ćelija promovišući preuzimanje u ćelije, utiču na transport kroz biološke barijere, akumulaciju, degradaciju i klirens, drugim rečima, određuju biodistribuciju i farmakokinetiku primenjenih nanoemulzija (Keck i sar., 2013; Mahon i sar., 2012; Müller i Göppert, 2007; Saptarshi i sar., 2013). Pored toga, sama površina nanoemulzionih kapi može da indukuje konformacione promene u adsorbovanim proteinskim molekulima, što dalje može da utiče na sveukupnu biološku reaktivnost nanoemulzionih sistema (Saptarshi i sar., 2013).

Pokazano je da fizičko-hemijska svojstva nanočestičnih nosača, stoga i nanoemulzija, imaju značajan uticaj na selektivnost i specifičnost njihovih interakcija sa proteinima i ćelijama (Mahon i sar., 2012); u tom smislu, profil adsorpcije proteina plazme (kvalitativan i kvantitativan) zavisiće od fizičko-hemijskih osobina nanoemulzija (Keck i sar., 2013). Jedinstvena površinska svojstva nanoemulzija usloviće, dakle, da se određeni proteini adsorbuju sa većim prioritetom, dovodeći do adherence nanoemulzionih kapi za ćelije koje ekspimiraju odgovarajuće receptore na površini – koncept diferencijalne adsorpcije. Prema tome, između fizičko-hemijskih (površinskih) svojstava nosača lekovite supstance, profila adsorpcije proteina plazme i posledične distribucije u organe postoji međusobna veza (slika 1.9). Fizičko-hemijska svojstva određuju sastav profila adsorbovanih proteina (opsonini, disopsonini, ciljni molekuli); adsorbovani proteini određuju posledičnu distribuciju u organe (Keck i sar., 2013;

Müller i Göppert, 2007). Naravno, u slučaju nanoemulzija kao biodegradabilnih nosača, efekti biodegradacije će se preklapati sa efektima adsorpcije (Keck i sar., 2013).

Analiza profila adsorpcije proteina plazme može, prema tome, da pruži informaciju kako profili treba da izgledaju da bi se izbeglo, ili u najmanju ruku, minimizovalo preuzimanje nosača od strane MPS. Generalno, adsorpcija opsonina povećava, a adsorpcija disopsonina smanjuje preuzimanje u MPS. Pored toga, ako je cilj da se postigne ciljna isporuka lekovite supstance, poželjno je prisustvo proteina koji posreduje u preuzimanju u ciljne ćelije, pr. ApoE za ciljnu isporuku u mozak. Pretpostavlja se da nosači koji adsorbuju ApoE imitiraju lipoproteinske čestice, što dovodi do njihovog preuzimanja u mozak procesom endocitoze preko LDL receptora na KMB (Keck i sar., 2013; Müller i Göppert, 2007).



Slika 1.9. Shematski dijagram koncepta diferencijalne adsorpcije proteina (preuzeto iz Keck i sar., 2013).

Istraživanja su pokazala da sastav nanoemulzija u smislu vrste uljane faze, sloja emulgatora/stabilizatora na međupovršini i inkorporiranja lekovite supstance, utiče na profil (vrstu i količinu) adsorbovanih proteina plazme, pri čemu sastav stabilisućeg sloja/međupovršinskog filma ima najvažniju ulogu (Keck i sar., 2013). Važan aspekt prilikom primene parenteralnih nanoemulzija jeste da preuzimanje od strane MPS ćelija bude što manje, jer slabljenje funkcije MPS usled izražene fagocitoze uljanih kapi može da poveća rizik od infekcije. Pokazano je da nanoemulzije zasnovane na MCT (pr.

Lipofundin MCT) uzrokuju manje oštećenje MPS u poređenju sa drugim komercijalnim nanoemulzijama zasnovanim, na primer, na sojinom ulju (pr. Lipofundin N). Poređenjem profila adsorpcije proteina plazme ovih nanoemulzija sa 10% uljane faze, utvrđeno je da ne postoje značajne razlike u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu adsorbovanih proteina, sa izuzetkom ApoE koji se u većem procentu adsorbuje na Lipofundin MCT, što bi zapravo moglo da objasni manje oštećenje MPS nakon primene ove nanoemulzije, usled bržeg klirensa iz cirkulacije preko LDL receptora na hepatocitima (Keck i sar., 2013; Müller i Göppert, 2007). Kada se pak uporede navedene nanoemulzije sa 20% ulja, nema nikakvih razlika u profilima adsorpcije proteina. Zaključeno je da sastav uljane faze može da utiče na profil adsorbovanja proteina, ali u ograničenom stepenu, pri čemu prilikom interpretacije rezultata, odnos uljane faze i lecitina, koji je različit kod nanoemulzija sa 10% i 20% uljane faze (0,8% i 1,2%, lecitina, respektivno), kao i veličinu kapi, treba uzeti u obzir (Keck i sar., 2013). Dominantan uticaj na profil adsorpcije proteina plazme parenteralnih nanoemulzija ima sastav stabilizujućeg sloja. Modifikacija površine parenteralnih nanoemulzija, promenom vrste emulgatora ili dodatkom koemulgatora, može da dovede do adsorbovanja različitih proteina plazme i, posledično, različitog ponašanja *in vivo*. Promenjena distribucija u organe može dalje da promeni farmakokinetičke parametre (pr. C_{max} , T_{max} , AUC) i, stoga, biološke efekte i/ili toksičnost nanoemulzija (Cupaioli i sar., 2014; Keck i sar., 2013). Uočeno je, na primer, da dodatak soli masnih kiselina, natrijum-stearata i natrijum-miristata, menja profil adsorpcije proteina originalne nanoemulzije stabilizovane samo lecitinom, u smislu smanjenog vezivanja ApoC-II (aktivator LPL) i neznatno povećanog vezivanja albumina. Uvođenje Solutola kao koemulgatora (nejonski stabilizator koji sadrži PEG lanac) u ove nanoemulzije poništilo je efekat masnih kiselina na ApoC-II, a dalje je povećalo količinu adsorbovanog albumina, odgovornog za manje prepoznavanje od strane MPS (Keck i sar., 2013). Takođe je pokazano da prisustvo poloksamera 188 kao sternog stabilizatora u nanoemulzijama na bazi lecitina, sa različitim, pozitivnim i negativnim, površinskim naelektrisanjem, štiti površinu kapi od adsorpcije velikih proteina, kakvi su imunoglobulini i fibrinogen, dok su proteini manje molekulske mase, poput apolipoproteina i albumina, dominantno prisutni u profilima adsorpcije. Poređenjem, međutim, nanoemulzija sa istim (anjonskim) površinskim naelektrisanjem koje je

poticalo od različitih stabilizatora (oleinska i deoksiholna kiselina), uočene su značajne razlike u profilima adsorpcije proteina (Tamilvanan i sar., 2005). To znači da posedovanje sličnog površinskog naelektrisanja ne dovodi automatski do adsorpcije istih proteina. Dobijeni profili adsorpcije posledica su više međusobno isprepletanih površinskih svojstava nanoemulzija, u ovom slučaju, naelektrisanja i prisustva različitih funkcionalnih grupa/molekulskih struktura te posledičnih promena u hidrofobnosti površine (Keck i sar., 2013).

Inkorporiranje lekovite supstance u parenteralne nanoemulzije takođe može da utiče na profil adsorbovanja proteina plazme zavisno od lokalizacije supstance u nanoemulziji (uljano jezgro vs. međupovršinski sloj). U slučaju malih i lipofilnih molekula (pr. propofol, etomidat, diazepam) koji su smešteni u uljanim kapima nanoemulzije, zabeleženo je da nema razlike u profilu adsorbovanih proteina u poređenju sa nanoemulzijama bez lekovite supstance. Kod amfifilnih lekovitih supstanci (pr. amfotericin B) koje se lokalizuju u lecitinskom sloju, na ulje–voda međupovršini, mogu se pak očekivati promene u fizičko-hemijskim svojstvima međupovršine i, posledično, u profilu adsorpcije proteina plazme (Keck i sar., 2013; Müller i Göppert, 2007).

Poznavanje faktora koji utiču na adsorpciju proteina plazme nakon intravenske primene nanoemulzija svakako je od velike pomoći za dalji razvoj i kontrolisanu optimizaciju proizvoda namenjenog ciljnoj isporuci lekovite supstance (Keck i sar., 2013; Müller i Göppert, 2007). Poznavanje i kontrola ključnih faktora za distribuciju u ciljni organ znače kraće vreme potrebno za razvoj i veći uspeh na tržištu, ne samo za nanoemulzije sa novim hemijskim entitetima nego i za generičke lekove. Poboljšanje distribucije u ciljne organe i, stoga, farmakokinetike nanoemulzija, a na osnovu analize profila adsorpcije proteina plazme i uspostavljanja veze sa fizičko-hemijskim osobinama nanoemulzija, može predstavljati dobar put ka razvoju „super“ generičkih lekova („*super generics*“, „*added value generics*“) ili novih, efikasnijih lekova na tržištu (Keck i sar., 2013). Potrebno je, međutim, naglasiti da se većina studija sprovedenih u ovom smeru fokusira na *in vitro* sisteme, te ekstrapolacija dobijenih rezultata u predviđanju ponašanja nanoemulzija *in vivo* ostaje izazov i zahteva dalja istraživanja.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Da bi se obezbedio brz/kontrolisan transport lekovite supstance u mozak i poboljšala njena biološka raspoloživost na ciljnom mestu dejstva te terapijski efekat, nameće se čitav niz potencijalnih prepreka koje je neophodno prevazići, počev od specifičnih karakteristika same lekovite supstance, naime slaba rastvorljivost, značajan metabolizam prvog prolaza, nespecifična biodistribucija, efluks od strane *P*-glikoproteina. Ovi kritični problemi, zajedno sa restriktivnim svojstvima KMB, suočavaju istraživače sa značajnim izazovima u dizajniranju i implementaciji adekvatnih formulacionih strategija i proizvodnih tehnologija za poboljšanje ciljne isporuke lekovite supstance u mozak. Imajući u vidu brojna privlačna svojstva, uključujući biokompatibilnost, biodegradabilnost, fizičku stabilnost, jednostavan *scale up* i, naročito, visok solubilizacioni kapacitet za lipofilne lekovite supstance, moguće povećanje biološke raspoloživosti, kontrolisano oslobađanje i ciljnu isporuku u različite organe, poslednjih godina, u korak sa savremenim nanomedicinskim i nanotehnološkim trendovima, značajna pažnja fokusirana je na nanoemulzije kao obećavajuće nosače za poboljšanu isporuku u mozak slabo rastvorljivih lekovitih supstanci nakon parenteralne primene.

Iako su lipidne nanoemulzije klinički odobrene za parenteralnu ishranu, a neke i za intravensku isporuku lipofilnih lekovitih supstanci (pr. diazepam, propofol, etomidat), visoki zahtevi za kvalitet i bezbednost parenteralnih farmaceutskih oblika, specifične osobine psihofarmakoloških lekovitih supstanci, uticaj različitih formulacionih i procesnih parametara na fizičko-hemijska svojstva i stabilnost nanoemulzija, kao i uticaj samog nanoemulzionog sistema na biološke performanse inkorporirane lekovite supstance, čine razvoj parenteralnih nanoemulzija naročito izazovnim i ukazuju na potrebu za ulaganjem dodatnih napora u cilju optimizacije formulacije, stabilnosti, i sveukupnog *in vivo* ponašanja nanoemulzionih sistema. Iako je, na primer, diazepam već formulisan u vidu komercijalno dostupnih injekcija tipa emulzije (pod zaštićenim nazivom Diazemuls), generalno nema podataka o njegovom farmakokinetičkom profilu. Osim za diazepam, pretpostavlja se da bi parenteralne nanoemulzije bile pogodan nosač i za risperidon, atipični antipsihotik za koji na tržištu nema farmaceutskog oblika pogodnog za tretman akutnih psihotičnih epizoda ili akutne agitacije, a koji bi bio

posebno poželjan u hitnim stanjima (kada je potrebna brza isporuka leka u mozak) i kada pacijenti ne mogu ili odbijaju da uzmu oralne oblike.

U skladu sa prethodnim navodima, ova doktorska disertacija imala je za cilj razvoj parenteralnih nanoemulzija kao perspektivnih nosača za slabo rastvorljive psihofarmakološke lekovite supstance kroz jedinstven, sveobuhvatni pristup – od formulacije, izrade i optimizacije primenom koncepta eksperimentalnog dizajna, preko fizičko-hemijske i biofarmaceutske karakterizacije i ispitivanja stabilnosti, do *in vivo* procene sistemske dispozicije i efikasnosti isporuke inkorporirane lekovite supstance u mozak pacova.

Da bi se realizovao navedeni cilj, eksperimentalni rad u okviru doktorske disertacije podeljen je u tri faze, sa sledećim pojedinačnim ciljevima:

Cilj prve faze eksperimentalnog rada bio je da se formulišu i optimizuju parenteralne nanoemulzije kao potencijalni nosači za slabo rastvorljive psihofarmakološke lekovite supstance, variranjem različitih formulacionih i procesnih parametara, i da se proceni uticaj ovih parametara na karakteristike i fizičku stabilnost razvijenih nanoemulzija primenom metodologije eksperimentalnog dizajna. U tu svrhu, nakon odabira odgovarajućih bezbednih, biokompatibilnih, biodegradabilnih i funkcionalnih komponenata nanoemulzija (uljana faza – na osnovu studija rastvorljivosti; emulgatori/koemulgatori; vodena faza), metodom HPH (topli/hladni postupak) izrađene su placebo i nanoemulzije sa inkorporiranom model lekovitom supstancom, stabilizovane kombinacijom lecitina i odgovarajućeg sternog stabilizatora. Diazepam, referentni benzodiazepin koji se uobičajeno koristi u predkliničkim ispitivanjima novih psihofarmakoloških lekovitih supstanci, i risperidon, atipični antipsihotik sa smanjenom tendencijom izazivanja ekstrapiramidalnih neželjenih efekata, inkorporirani su u nanoemulzije kao modeli lipofilnih, u vodi slabo rastvorljivih lekovitih supstanci. U cilju optimizacije sastava formulacije i uslova izrade nanoemulzija, tokom procesa razvoja, primenom punog faktorskog i generalnog faktorskog dizajna ispitivan je istovremeni uticaj sadržaja uljane faze, vrste lecitina, vrste koemulgatora, vrste vodene faze, prisustva lekovite supstance i temperature homogenizacije na kritične attribute kvaliteta dobijenih nanoemulzija (veličina kapi, PDI, ZP, viskozitet). S obzirom na broj formulacionih i procesnih parametara variranih tokom procesa razvoja nanoemulzija,

cilj je dakle bio da se izborom promenljivih od značaja i njihovih nivoa kombinovanih u okviru prostora eksperimentalnog dizajna, omogući ne samo identifikacija faktora koji imaju značajan uticaj na vrednost ispitivanog odgovora, nego i kvantifikacija kako direktnog efekta svake pojedinačne promenljive, tako i efekata njihovih interakcija, a sa krajnjim ciljem dobijanja nanoemulzija optimalnih fizičko-hemijskih svojstava za parenteralnu primenu i isporuku lekovite supstance u mozak.

U drugoј fazi eksperimentalnog rada odabrane optimalne formulacije nanoemulzija bez i sa inkorporiranom model lekovitom supstancom podvrgnute su sistematičnoј fizičko-hemijskoј i biofarmaceutskoj karakterizaciji u cilju procene njihove pogodnosti za parenteralnu primenu i isporuku lekova. Nanoemulzije su okarakterisane u pogledu veličine i raspodele veličina kapi (PCS, LD, svetlosna mikroskopija), površinskog naelektrisanja (merenje elektroforetske pokretljivosti i prevođenje u ZP), viskoziteta (reološka merenja), pH vrednosti, električne provodljivosti, morfologije (AFM) i interakcija lek–nosač (DSC, FT-IR spektroskopija). U cilju procene dugoročne fizičko-hemijske stabilnosti, relevantna ispitivanja su ponovljena nakon godinu dana čuvanja uzoraka na $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Dodatno, ispitivana je mogućnost primene završne toplotne metode sterilizacije (121°C , 15 min, u autoklavu) i procenjen njen uticaj na stabilnost razvijenih formulacija nanoemulzija. U cilju predviđanja *in vivo* ponašanja i ispitivanja kinetike mehanizma oslobađanja model lekovitih supstanci inkorporiranih u nanoemulzije, sprovedeno je *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance iz razvijenih, optimizovanih nanoemulzija primenom tehnike reverzne dijalize sa vrećicama, uz karakterizaciju dobijenih profila oslobađanja primenom različitih matematičkih modela.

Konačno, sprovođenjem *in vivo* farmakokinetičkih studija i studija biodistribucije na pacovima nakon parenteralne primene odabranih nanoemulzija sa diazepamom i risperidonom kao model lekovitim supstancama, cilj treće faze eksperimentalnog rada bio je da se dobije uvid u farmakokinetičke performanse i *in vivo* dispoziciju razvijenih formulacija nanoemulzija i proceni uticaj samog nanoemulzionog sistema, kao nosača, na farmakokinetiku inkorporirane model lekovite supstance. Cilj je posebno bio da se ispita uticaj same formulacije nanoemulzija u smislu rastuće koncentracije uljane faze (20%, 30% i 40% smeše MCT i sojinog ulja u odnosu 4:1, m/m) i sastava ulje–voda međupovršinskog filma, pre svega vrste kostabilizatora/koemulgatora (P80, PL188,

SHS15), na farmakokinetičko ponašanje inkorporirane model lekovite supstance, uključujući odnose ekspozicije u plazmi i moždanom tkivu, te efikasnost isporuke u mozak nakon parenteralne primene. Dodatno, kao potpora farmakokinetičkim nalazima, a u cilju detaljnog razjašnjavanja da li bihejvioralni efekti lekovite supstance primenjene parenteralno u vidu nanoemulzija mogu biti odraz profila koncentracija u plazmi i moždanom tkivu, sprovedena je farmakodinamska studija na pacovima, sa krajnjim ciljem utvrđivanja potencijalnih veza između fizičko-hemijskih osobina lekovite supstance inkorporirane u nanoemulzioni nosač i njene farmakokinetike, biodistribucije i farmakodinamike.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijali

Za izradu placebo i „aktivnih“ uzoraka nanoemulzija, odnosno nanoemulzija bez i sa model lekovitim supstancom, korišćeni su sledeći ekscipijensi: MCT (Fagron GmbH & KG, Nemačka); sojino ulje (Lipoid Purified Soybean Oil 700), sojin lecitin (Lipoid S 75, fosfolipidi soje koji sadrže 70% fosfatidilholina, LS75), lecitin iz jajeta (Lipoid E 80, fosfolipidi iz jajeta koji sadrže 80% fosfatidilholina, LE80), natrijum-oleat (Lipoid Sodium Oleate B) (Lipoid GmbH, Nemačka); polisorbat 80 (P80, polioksietilensorbitan monooleat), benzilalkohol, butilhidroksitoluen (BHT) (Sigma-Aldrich Co., Misuri); poloksamer 188 (PL188, Kolliphor® P 188), polioksil/makrogol 15 hidroksistearat (Kolliphor® HS 15, Solutol® HS 15, SHS15) (BASF SE, Nemačka); glicerol (Merck KgaA Nemačka); natrijum-hidroksid, kalijum-dihidrogenfosfat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka); sveže dobijena ultračista voda (voda, visokoprečišćena) (TKA GenPure, TKA Wasseranfertigungssysteme GmbH, Nemačka). Kao model lekovite supstance korišćeni su diazepam (Galenika a.d., Srbija) i risperidon (Balkanpharma-Dupnitsa AD, Actavis, Bugarska). Sve ostale upotrebljne hemikalije i reagensi bili su farmakopejskog (Ph. Eur, USP) ili hromatografskog (HPLC) kvaliteta i korišćeni su bez daljeg prečišćavanja.

3.2. Metode

3.2.1. Ispitivanje rastvorljivosti

Rastvorljivost diazepam i risperidona kao model lekovitih supstanci u čistim uljima (MCT, sojino ulje), smešama ulja (MCT–sojino ulje u različitim odnosima 1:1, 2:1, 3:1 i 4:1, m/m), a u slučaju risperidona i u uljanim medijumima koji su sadržali 2% (m/m) sojinog lecitina, određena je *shake flask* metodom. Model lekovita supstanca dodata je u višku u 5 g svakog ispitivanog medijuma, a dobijene smeše mešane su na orbitalnom šejkeru (IKA® KS 260 basic, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Nemačka) pri brzini od 250 obrtaja/min, na temperaturi od $25 \pm 2^\circ\text{C}$, tokom 24 h. Nakon postizanja ravnoteže uzorci su centrifugirani (Centrifuge MPW-56, MPW Med. Instruments, Poljska) 30 min,

pri brzini od 5000 obrtaja/min, kako bi se odvojili nerastvoreni kristali model lekovite supstance. Alikvot dobijenog supernatanta razblažen je metanolom, a koncentracija model lekovite supstance određena spektrofotometrijski primenom Varian Cary-100 UV-VIS spektrofotometra (Varian BV, Holandija) na 254 i 277 nm, za diazepam i risperidon, respektivno. Kalibraciona kriva za diazepam u metanolu bila je linearna u opsegu 1–10 µg/mL ($R^2 = 0.99895$), a za risperidon u opsegu 5–35 µg/mL ($R^2 = 0.9942$).

3.2.2. Izrada nanoemulzija

Shodno izabranoj model lekovitoj supstanci i sastavu, sve formulacije nanoemulzija izrađene su hladnim (25°C) ili toplim (50°C) HPH postupkom, u skladu sa prethodno opisanom (Baspinar i sar., 2010; Jumaa i Müller, 1998a, 2002; Yilmaz i Borchert, 2005), ali malo izmenjenom procedurom. Najpre su uljana i vodena faza pripremljene odvojeno. Uljana faza, koja se sastojala od ulja (smeša MCT i sojinog ulja u masenom odnosu 4:1), lipofilnog emulgatora (lecitin, sojin ili iz jajeta) i antioksidansa (BHT), zagrejana je na 70°C uz slabo mešanje na magnetnoj mešalici (RH basic 2 IKAMAG®, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Nemačka), do potpunog rastvaranja lecitina. Dobijena uljana faza je potom ohlađena na željenu temperaturu (25°C ili 50°C), nakon čega je u nju dodat diazepam kao čista supstanca, odnosno rastvor risperidona u benzilalkoholu kao korastvaraču (50 mg/g), tako da finalna koncentracija u nanoemulziji bude 2 mg/g diazepama, odnosno 1 mg/g risperidona. Vodena faza pripremljena je rastvaranjem hidrofilnog emulgatora (P80, PL188 ili SHS15) i sredstva za izotonizaciju (glicerol) u fosfatnom puferu odgovarajuće pH vrednosti (engl. *phosphate buffer solution*, PBS; 0,01 M) ili vodenom rastvoru natrijum-oleata (engl. *sodium oleate solution*, SOS), na temperaturi od 25°C ili 50°C.

Dve faze jednakih temperatura su zatim pomešane dodatkom vodene u uljanu fazu i izrađena preemulzija mešanjem na rotor-stator homogenizatoru (IKA Ultra-Turrax® T25 digital, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Nemačka) 3 min, pri brzini od 8000 obrtaja/min ili 10000 obrtaja/min, na 25°C ili 50°C. Da bi se dobila finalna emulzija, ovako izrađena gruba emulzija (prosečna veličina kapi oko 2 µm) propuštena je kroz homogenizator pod visokim pritiskom (EmulsiFlex-C3, Avestin Inc., Kanada), diskontinuiranim postupkom, devet odnosno deset puta, pri pritisku od 500 bar i temperaturi od 25°C ili

50°C. Dobijena nanoemulzija podeljena je u dva dela, pri čemu je jedan deo filtriran pod aseptičnim uslovima kroz membranski filter (MCE 0,22 µm, Merck Millipore, Masačusets), a drugi sterilisan parom na 121°C tokom 15 min (Autoklav serije 250, Sutjeska, Srbija). Placebo nanoemulzije takođe su izrađene prema opisanoj proceduri, samo bez inkorporirane model lekovite supstance. Sve formulacije nanoemulzija čuvane su u dobro zatvorenim staklenim bočicama sa aluminijumskom krimp-kapicom na 25 ± 2°C, a 24 h nakon izrade sprovedena je njihova sveobuhvatna karakterizacija. Sva merenja izvedena su u triplicatu za svaki uzorak. Kodirana imena i sastav razvijenih placebo nanoemulzija i nanoemulzija sa model lekovitom supstancom prikazani su u [tabelama 3.1 i 3.2](#).

Tabela 3.1. Sastav nanoemulzija diazepama i odgovarajućih placebo nanoemulzija izrađenih hladnim postupkom homogenizacije pod visokim pritiskom (25°C, 500 bar, 9 ciklusa; preemulgovanje: 25°C, 3 min, 8000 obrtaja/min)

Sastav (% m/m)	Formulacije nanoemulzija							
	DZM20s	P20s	DZM30s	P30s	DZM20e	P20e	DZM30e	P30e
Uljana faza								
Diazepam	0,2	–	0,2	–	0,2	–	0,2	–
MCT	16,0	16,0	24,0	24,0	16,0	16,0	24,0	24,0
Sojino ulje	4,0	4,0	6,0	6,0	4,0	4,0	6,0	6,0
LS75	2,0	2,0	3,0	3,0	–	–	–	–
LE80	–	–	–	–	2,0	2,0	3,0	3,0
BHT	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Vodena faza								
P80	2,0	2,0	3,0	3,0	2,0	2,0	3,0	3,0
Glicerol	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
PBS do	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

MCT: trigliceridi srednje dužine lanca; LS75: sojin lecitin; LE80: lecitin jajeta; BHT: butilhidroksitoluen; P80: polisorbat 80; PBS: fosfatni pufer (0,1 M, pH 8,0).

Tabela 3.2. Sastav nanoemulzija risperidona i odgovarajućih placebo nanoemulzija izrađenih toplim postupkom homogenizacije pod visokim pritiskom (50°C, 500 bar, 10 ciklusa; preemulgovanje: 50°C, 1 min, 10000 obrtaja/min)

Sastav (% m/m)	Formulacije nanoemulzija							
	RSP- P80	P- P80	RSP- PL188	P- PL188	RSP- SHS15	P- SHS15	RSP- LS75	P- LS75
Uljana faza								
Risperidon	0,1	–	0,1	–	0,1	–	0,1	–
MCT	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0
Sojino ulje	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
LS75	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
BHT	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
BA	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Vodena faza								
P80	2,0	2,0	–	–	–	–	–	–
PL188	–	–	2,0	2,0	–	–	–	–
SHS15	–	–	–	–	2,0	2,0	–	–
Glicerol	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25
Natrijum- oleat	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Ultračista voda do	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

MCT: trigliceridi srednje dužine lanca; LS75: sojin lecitin; BHT: butilhidroksitoluen; BA: benzilalkohol; P80: polisorbitat 80; PL188: poloksamer 188; SHS15: Solutol® HS 15.

3.2.3. Metodologija eksperimentalnog dizajna

Tokom razvoja i optimizacije nanoemulzija, metodologija eksperimentalnog dizajna korišćena je u cilju identifikacije i sistematične procene istovremenog uticaja više formulacionih i procesnih parametara na osobine kritične za kvalitet i stabilnost razvijenih nanoemulzija. U tom smislu, sprovedena su preliminarna ispitivanja pri čemu je utvrđeno da su vrsta i udeo uljane faze, vrsta emulgatora i koemulgatora, kao i vrsta vodene faze važni faktori formulacije koji značajno mogu uticati na fizičko-hemijska svojstva i stabilnost nanoemulzija. S druge strane, ustanovljeno je da je temperatura procesa homogenizacije kritičan procesni parametar koji utiče na smanjenje veličine kapi tokom HPH. Na osnovu navedenih nalaza, primenom kompjuterski generisanog eksperimentalnog dizajna sprovedena je faktorska analiza kako bi se procenio kako direktan efekat svake pojedinačne promenljive, tako i efekat njihovih interakcija na karakteristike nanoemulzionog sistema.

U prvom setu eksperimenata, primenom punog faktorskog dizajna (2^3) ispitivan je uticaj tri faktora formulacije, i to koncentracije uljane faze (A), vrste lecitina (B) i prisustva diazepama kao model lekovite supstance (C), i njihovih interakcija, na fizičko-hemijska svojstva dobijenih nanoemulzija. Ispitivani faktori varirani su na dva nivoa (-1, +1), pri čemu je kodirani -1 nivo odgovarao donjoj, a kodirani +1 nivo gornjoj graničnoj vrednosti svake nezavisno promenljive (tablela 3.3). U skladu sa primenjenim dizajnom, generisano je osam eksperimentalnih proba čiji je redosled izvođenja randomizovan kako bi se zadovoljio statistički zahtev za nezavisnost opservacija. Različite formulacije izrađene su u duplikatu. Kao odgovori sistema, tj. zavisno promenljive, praćeni su prosečna veličina kapi (Z-Ave), PDI, ZP i viskozitet izrađenih nanoemulzija. Shema eksperimenata prema 2^3 punom faktorskom dizajnu i dobijeni odgovori prikazani su u tablelama 3.4 i 4.1.1, respektivno.

Tabela 3.3. Ispitivani faktori i njihovi nivoi (kodirani, stvarni) korišćeni u 2^3 punom faktorskom dizajnu

Ispitivani faktor	Nivoi	
	Donji (-1)	Gornji (+1)
A: Sadržaj uljane faze (% m/m)	20	30
B: Vrsta lecitina	Sojin lecitin	Lecitin iz jajeta
C: Model lekovita supstanca (DZM)	Odsustvo (0 mg/g)	Prisustvo (2 mg/g)

Tabela 3.4. Eksperimentalni plan prema 2^3 punom faktorskom dizajnu

Ispitivani faktor	Formulacije nanoemulzija							
	P20s	P30s	P20e	P30e	DZM20s	DZM30s	DZM20e	DZM30e
A	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1
B	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1
C	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1

A: sadržaj uljane faze; B: vrsta lecitina; C: model lekovita supstanca (DZM).

U drugom setu eksperimenata, u cilju procene istovremenog uticaja dva formulaciona i jednog procesnog parametra na kritične attribute kvaliteta nanoemulzija, primenjen je generalni faktorski dizajn. Ulazni parametri (nezavisno promenljive) odabrani za analizu faktorskih efekata i nivoi na kojima su varirani bili su: vrsta koemulgatora (A) – P80/PL188/SHS15; vrsta vodene faze (B) – 0,01 M fosfatni pufer (pH 9,0) (PBS)/ultračista voda koja je sadržala 0,03 % natrijum-oleata (pH 9,0) (SOS); i tip HPH metoda (C) – hladni postupak/topli postupak (tablela 3.5), dok su kao odgovori sistema

(zavisno promenljive) praćeni Z-Ave, PDI i ZP izrađenih nanoemulzija. U skladu sa primenjenim generalnim faktorskim dizajnom, generisano je i randomizovano izvedeno 24 eksperimentalnih proba, uključujući dva ponavljanja po seriji; plan eksperimenata i odgovori dobijeni za svaki eksperiment prikazani su u [tabelama 3.5 i 4.1.2](#), respektivno.

Tabela 3.5. Matriks generalnog faktorskog dizajna

Broj eksperimenta	Formulacija	Ispitivani faktori					
		Vrsta koemulgatora (A)		Vrsta vodene faze (B)		HPH metod (C)	
		Stvarni nivo	Kodirani nivo	Stvarni nivo	Kodirani nivo	Stvarni nivo	Kodirani nivo
1	P80Pc	P80	{1 0}	PBS	-1	Cold	-1
2	P80Ph					Hot	1
3	P80Sc			SOS	1	Cold	-1
4	P80Sh					Hot	1
5	PL188Pc	PL188	{0 1}	PBS	-1	Cold	-1
6	PL188Ph					Hot	1
7	PL188Sc			SOS	1	Cold	-1
8	PL188Sh					Hot	1
9	SHS15Pc	SHS15	{-1 -1}	PBS	-1	Cold	-1
10	SHS15Ph					Hot	1
11	SHS15Sc			SOS	1	Cold	-1
12	SHS15Sh					Hot	1

P80: polisorbata 80; PL188: poloksamer 188; SHS15: Solutol® HS 15; HPH: homogenizacija pod visokim pritiskom; PBS: 0,01 M fosfatni pufer (pH 9,0); SOS: ultračista voda koja je sadržala 0,03% natrijum-oleata (pH 9,0); cold: hladni postupak (25°C); hot: topli postupak (50°C).

Sve formulacije nanoemulzija izrađene su bez inkorporirane lekovite supstance, sa 20% uljane faze (smeša MCT i sojinog ulja u odnosu 4:1), 2% sojinog lecitina, 0,05% butilhidroksitoluena, 2% benzilalkohola, 2% koemulgatora, i 2,25% glicerola.

Eksperimentalni podaci dobijeni primenom punog faktorskog i generalnog faktorskog dizajna, prema prikazanim planovima eksperimenata ([tabele 3.4 i 3.5](#)), uklapani su u odgovarajući polinomski (faktorski) model prvog reda čiji je opšti oblik opisan sledećom jednačinom (3.1):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_{12} AB + \beta_{13} AC + \beta_{23} BC + \beta_{123} ABC \quad (3.1)$$

gde je Y posmatrani odgovor sistema ili zavisno promenljiva; β_0 je odsećak, odnosno srednji efekat; β_1 , β_2 i β_3 su linearni koeficijenti uz odgovarajuće nezavisno promenljive

(A, B, C); a β_{12} , β_{13} , β_{23} i β_{123} koeficijenti interakcija pridruženi odgovarajućim interakcijama ispitivanih faktora (AB, AC, BC, ABC); koeficijenti β_1 – β_{123} pokazuju efekat pojedinačnih faktora i njihovih interakcija na vrednost posmatranog odgovora.

Za planiranje eksperimenata, obradu podataka i statističku analizu (analiza varijanse, ANOVA) dobijenih rezultata korišćen je Design–Expert[®] softverski paket (verzija 9.0.1 trial; Stat-Ease Inc., Minesota, SAD). Matematički model koji najbolje opisuje vezu između ispitivanih faktora i izmerenih odgovora nanoemulzija predložen je na osnovu statistički značajnih članova modela (faktori i interakcije faktora, $p < 0,05$), neznačajnog *lack of fit* (neadekvatnost modela, $p > 0,05$), kao i najviših vrednosti koeficijenta višestruke korelacije (R^2) i prilagođenog koeficijenta višestruke korelacije (*adjusted* R^2) (0,9–1). Radi lakšeg tumačenja dvofaktorskih interakcija i boljeg razumevanja efekta jednog faktora pri promeni nivoa drugog faktora, dobijeni rezultati prikazani su i grafički u vidu dijagrama interakcija, trodimenzionalnih dijagrama površine odgovora i dvodimenzionalnih konturnih dijagrama koji prikazuju ispitivane odgovore (Z-Ave, PDI, ZP, viskozitet) na različitim kombinacijama nivoa faktora.

3.2.4. Karakterizacija nanoemulzija

3.2.4.1. Analiza veličine kapi

Prosečna veličina kapi (hidrodinamički prosečan prečnik, engl. *intensity-weighted mean diameter*, *Z-average diameter*, Z-Ave) i raspodela veličina kapi nanoemulzija (indeks polidisperznosti, PDI) određene su tehnikom dinamičkog rasipanja svetlosti, poznatom i kao foton korelaciona spektroskopija (PCS), primenom uređaja Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Velika Britanija). Ovom tehnikom meri se stepen fluktuacija intenziteta rasute svetlosti usled Braunovog kretanja čestica/kapi u uzorku i vrši prevođenje u veličinu kapi pomoću Stokes–Einstein jednačine ugrađene u softver uređaja (Malvern Dispersion Technology Software – DTS (Nano), verzija 5.00). Da bi se umanjio uticaj gustine i viskoziteta nanoemulzija na rezultate merenja, uzorci nanoemulzija su pre merenja razblaženi ultračistom vodom ili sveže pripremljenim 0,01 M fosfatnim puferom (1:500, v/v). Merenja su sprovedena u polistirenskim kivetama za jednokratnu upotrebu, na temperaturi od 25°C, pod uglom rasipanja svetlosti od 90°, primenom He–Ne lasera na 633 nm.

Da bi se detektovalo eventualno prisustvo male frakcije većih kapi, kao dodatna metoda za procenu veličine kapi nanoemulzija primenjena je tehnika statičkog rasipanja svetlosti, poznata i kao laserska difrakcija (LD). Merenja su izvedena na uređaju Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd.) integrisanim sa softverom (Malvern 2000, verzija 5.22) koji analizira zavisnost između ugla rasipanja svetlosti i veličine kapi (što je kap veća, manji je ugao pod kojim se svetlost rasipa), i, primenom Mie teorije, daje zapreminsku raspodelu veličina kapi u nanoemulziji. Merenja su sprovedena na 25°C, uz upotrebu ultračiste vode kao medijuma za dispergovanje kapi nanoemulzija. Kao kritični parametri ovog dela karakterizacije izračunati su LD prečnici, tj. volumenski dijometri kapi (engl. *volume-weighted diameters*) $d(0.1)$, $d(0.5)$, $d(0.9)$, $d(0.99)$, i $D[4,3]$, koji opisuju procenat kapi u datoj zapremini uzorka koji ima manju veličinu od date vrednosti. Tako na primer prečnik $d(0.5)$ (engl. *median volume particle size*) znači da 50% zapremine uzorka sadrži kapi manje od „ $d(0.5)$ “ vrednosti, a 50% uzorka čine kapi veće od ove vrednosti. Prečnik $d(0.9)$ znači da 90% zapremine uzorka ima veličinu kapi manju od „ $d(0.9)$ “ vrednosti, i predstavlja osetljiv parametar za utvrđivanje prisustva većih kapi, kao i agregata kapi.

3.2.4.2. Mikroskopska analiza

U cilju detekcije eventualnog prisustva većih mikrometarskih kapi, agregata kapi ili nerastvorenih kristala model lekovite supstance, nerazblaženi uzorci nanoemulzija posmatrani su pod svetlosnim/polarizacionim mikroskopom Carl Zeiss ApoTome Imager Z1 (Zeiss, Nemačka), integrisanim sa AxioCam ICc1 digitalnom kamerom i AxioVision 4.6 softverskim paketom. Pregled ispitivanih uzoraka izveden je pri uveličanjima 100×, 200× i 400×.

Dublji i pouzdaniji uvid u strukturu i morfologiju nanoemulzija (oblik, veličina, površinske karakteristike kapi) postignut je primenom mikroskopije atomskih sila (AFM), upotrebom NTEGRA prima mikroskopa sa skenirajućom sondom, odnosno mikroskopa atomskih sila (NT-MDT, Rusija). Pre analize, uzorci nanoemulzija razblaženi su ultračistom vodom (1:100, v/v), nakon čega je kap (10 μ L) razblaženog uzorka direktno naneta na okruglu mika pločicu dijametra 15 mm i debljine 0,21 mm (Highest Grade V1 Mica Discs, Ted Pella Inc., Kalifornija), i osušena u vakuumu kako bi se uklonio višak vode. Zbog same prirode uzoraka, AFM merenja su sprovedena na

vazduhu, u tapkajućem modu (engl. *intermittent-contact mode*), pri čemu su korišćene AFM sonde NT-MDT NSGO1 izrađene od silicijuma N-tipa dopiranog antimonom koje sa gornje strane imaju reflektujuću prevlaku od zlata. Ove merne gređice imaju sledeće parametre: nominalna konstanta sile (opruge) 5,1 N/m, rezonantna frekvencija 87–230 kHz, radna frekvencija 150 kHz, i frekvencija skeniranja 0,5 Hz. Obrada i analiza dobijenih slika topografije i „signala greške“ izvršene su primenom Image Analysis 2.2.0 softverskog paketa (NT-MDT, Rusija).

3.2.4.3. Analiza zeta potencijala

Površinsko naelektrisanje kapi nanoemulzija određeno je primenom uređaja Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd.), merenjem elektroforetske pokretljivosti kapi u električnom polju koja se softverski, pomoću Helmholtz–Smoluchowski jednačine, prevodi u zeta potencijal (ZP). Merenje je sprovedeno na 25°C u savijenoj kapilarnoj ćeliji za jednokratnu upotrebu (engl. *folded capillary cell* DTS 1060), odmah nakon razblaživanja uzorka ultračistom vodom (1:500, v/v) čija je provodljivost podešena na 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ dodatkom rastvora elektrolita (0,1 M fosfatni pufer), kako bi se izbegle fluktuacije u ZP, usled varijacija u električnoj provodljivosti same ultračiste vode.

3.2.4.4. Reološka analiza

Reološko ponašanje razvijeh nanoemulzija diazepama i odgovarajućih placebo nanoemulzija procenjeno je primenom rotacionog reometra Rheolab MC 120 (Paar Physica, Nemačka) upotrebom Z3 DIN mernog sistema tipa rotirajućeg cilindra („*cup and bob*“). Merenja su izvedena na $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$, pri brzini smicanja od 0 do 100 s^{-1} i obrnuto. S druge strane, reološka ispitivanja odabranih nanoemulzija risperidona i odgovarajućih placebo nanoemulzija izvedena su primenom rotacionog viskozimetra Visco Elite-R (Fungilab S.A., Španija), opremljenog adapterom za tečnosti niskog viskoziteta (LCP) i podržanog Supervisc softverskim paketom (Fungilab S.A.). Merenja su sprovedena na temperaturi od $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$, pri brzini rotiranja u opsegu 100–200 obrtaja/min. Vrednosti prividnog viskoziteta, očitane sa krivih viskoziteta pri maksimalnoj brzini smicanja/rotiranja, korišćene su za karakterizaciju uzoraka nanoemulzija.

3.2.4.5. Merenje pH vrednosti

pH vrednost izrađenih nanoemulzija merena je direktnim uranjanjem elektrode pH metra HI 9321 (Hanna Instruments Inc., Mičigen) u ispitivani uzorak, na $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.2.4.6. Merenje električne provodljivosti

Električna provodljivost nanoemulzija merena je direktnim uranjanjem elektrode konduktometra sensION™ + EC71 (ShangHai Shilu Instruments Co., Ltd., Kina) u uzorak nanoemulzije, na $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.2.4.7. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

Procena fizičkog stanja model lekovite supstance u formulisanim nanoemulzijama i mogućih interakcija između inkorporirane lekovite supstance i ostalih komponenata nanoemulzije izvršena je primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC). DSC termogrami pojedinačnih sastojaka nanoemulzija, kao i samih nanoemulzija bez i sa inkorporiranom model lekovitom supstancom snimljeni su na uređaju Mettler DSC 820 (Mettler Toledo GmbH Analytical, Nemačka). Male količine uzoraka (1–7 mg) čistih supstanci i nanoemulzija precizno su odmerene na analitičkoj vagi XP205 DeltaRange® (Mettler Toledo, Nemačka) u standardnim aluminijumskim posudama, koje su zatim hermetički zatvorene. Uzorci su zagrevani na temperaturi između 25°C i 250°C , brzinom zagrevanja od $10^\circ\text{C}/\text{min}$, pri konstantnom protoku azota od $50 \text{ mL}/\text{min}$, pri čemu je prazna aluminijumska posudica korišćena kao referentna. Da bi se izbegao proces isparavanja vode i njegov uticaj na tumačenje dobijenih rezultata, dodatno su pripremljeni i osušeni uzorci odabranih nanoemulzija tako što je $10 \mu\text{L}$ nanoemulzije stavljeno u aluminijumsku posudu i osušeno na vazduhu. Osušeni uzorci su potom precizno odmereni, hermetički zatvoreni i analizirani pod gore navedenim uslovima. Termoanalitički parametri kao što su entalpija, početna (*onset*) temperatura (T_{onset}), i temperatura topljenja koja odgovara maksimumu na krivi topljenja (T_{peak}) izračunati su primenom Mettler Toledo STAR® softverskog paketa.

3.2.4.8. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom/FT-IR spektroskopija

Kao suplementarna tehnika za ispitivanje intermolekulskih hemijskih interakcija u nanoemulzionom sistemu i potencijalne rekristalizacije inkorporirane model lekovite supstance primenjena je FT-IR spektroskopija. FT-IR spektri placebo i „aktivnih“ uzoraka nanoemulzija, kao i čistih supstanci koje ulaze u njihov sastav, snimljeni su pomoću BOMEM Hartmann & Braun MB-Series FT-IR spektrofotometra (ABB Bomem Inc., Kanada). Pre ispitivanja, uzorci čiste lekovite supstance pripremljeni su metodom sa kalijum-bromidom (tehnika KBr pastile), dok su uzorci nanoemulzija pripremljeni tako što je 10 µL nanoemulzije stavljeno na KRS-5 pločicu i osušeno u vakuumu. FT-IR spektri svih uzoraka snimljeni su u opsegu talasnih dužina od 4000 cm^{-1} do 400 cm^{-1} , primenom 10 pregleda po spektru, sa rezolucijom od 4 cm^{-1} .

3.2.5. Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija

U cilju procene dugoročne stabilnosti razvijenih formulacija nanoemulzija, kao i stabilnosti nakon procesa sterilizacije parom (zagrevanje u autoklavu), sprovedena su merenja prosečne veličine kapi, PDI, ZP, viskoziteta, pH vrednosti i električne provodljivosti izrađenih nanoemulzija, primenom prethodno opisanih metoda, inicijalno (jedan dan nakon izrade), i ponovljena nakon dva meseca, četiri meseca ili godinu dana čuvanja uzoraka, filtriranih i autoklaviranih, na $25 \pm 2^\circ\text{C}$ / $55 \pm 5\%$ RH.

3.2.6. *In vitro* ispitivanje brzine oslobađanja model lekovite supstance iz nanoemulzija

In vitro ispitivanje brzine oslobađanja model lekovite supstance iz optimizovanih nanoemulzija sprovedeno je primenom *bulk equilibrium* tehnike reverzne dijalize sa vrećicama. Dijalizne vrećice (celulozna membrana, Mr *cut-off* 12000) napunjene sa 5 mL medijuma – akceptorska faza – uronjene su u 300 mL istog medijuma u kome je, nakon uspostavljanja ravnoteže, dispergovano 3 mL ispitivane nanoemulzije – donorska faza. Kao medijum je korišćena smeša fosfatnog pufera pH 7,4 (USP) i metanola u odnosu 80:20 (v/v), a studije oslobađanja izvedene su na temperaturi od $37 \pm 1^\circ\text{C}$, uz konstantno mešanje (ES-20 orbitalni šejker–inkubator, Biosan SIA., Latvija), kako bi se

simulirali *in vivo* uslovi. U definisanim vremenskim intervalima (5, 10, 20, 40, i 60 min u slučaju nanoemulzija diazepama, odnosno 5, 15, 30, 60, 90, i 180 min u slučaju nanoemulzija risperidona) izvršeno je uzorkovanje sadržaja dijalizne vrećice i iste zapremine okolnog medijuma, a koncentracija oslobođene lekovite supstance u uzorcima određena UV spektrofotometrijski primenom Evolution 300 spektrofotometra (Thermo Fisher Scientific, SAD) na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije ($\lambda = 230$ nm za diazepam; $\lambda = 277$ nm za risperidon). Kinetika oslobađanja model lekovitih supstanci iz ispitivanih nanoemulzija procenjena je primenom različitih matematičkih modela (nultog reda, prvog reda, Higuchi, Baker–Lonsdale, Korsmeyer–Peppas) pomoću DDSolver paketa za Microsoft Excel aplikacije.

3.2.7. Farmakokinetički i bihejvioralni eksperimenti

3.2.7.1. Životinje

Farmakokinetička i bihejvioralna svojstva odabranih nanoemulzija sa inkorporiranom model lekovitom supstancom (diazepam i risperidon) procenjena su na zdravim albino pacovima muškog pola, soja *Wistar* (Vojna farma, Srbija). Eksperimenti su sprovedeni u skladu sa EU Direktivom 2010/63/EU, uz pridržavanje protokola odobrenog od strane Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama, Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta. Pacovi (telesne mase 250–300 g) držani su u vivarijumu Farmaceutskog fakulteta, u standardnim kavezima od pleksiglasa, u grupama od 4–6 životinja po kavezu, u dnevno/noćnom ciklusu od 12 h (uključivanje svetla u 6:00 h), pod kontrolisanim uslovima temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), relativne vlažnosti (40–70%) i svetlosti (120 lx). Hrana (Veterinarski institut, Zemun) i česmenska voda bile su životinjama dostupne *ad libitum*.

3.2.7.2. *In vivo* farmakokinetičke i studije biodistribucije

3.2.7.2.1. Eksperimentalni protokol i sakupljanje bioloških uzoraka

U prvom setu eksperimenata, u cilju utvrđivanja farmakokinetičkog profila diazepama inkorporiranog u razvijene formulacije nanoemulzija sa rastućim udelom uljane faze (20, 30 i 40%), pacovi su nasumično podeljeni u 4 grupe od po 15 životinja (po 3 životinje za svaku od predviđenih 5 vremenskih tačaka). Pacovi grupe I, II i III primili

su nanoemulzije diazepama – DZM20s, DZM30s i DZM40s, respektivno, intraperitonealnim putem u dozi od 4 mg/kg (volumen injektovanja 2 mL/kg), dok je pacovima grupe IV data ista doza rastvora diazepama (2 mg/mL diazepama u smeši apsolutnog etanola, propilenglikola i vode, 25:25:50, v/v), injektovanjem u repnu venu.

U drugom setu eksperimenata, u cilju procene sistemske dispozicije i efikasnosti isporuke u mozak risperidona formulisanog u vidu nanoemulzija, kao i procene uticaja samog nanoemulzionog sistema kao nosača na farmakokinetiku inkorporirane model lekovite supstance, pacovi su nasumično podeljeni u 6 grupa od po 18 životinja (po 3 životinje u svakoj od 6 vremenskih tačaka). Tretmani (rastvor risperidona – RSP-Sol, i četiri različite nanoemulzije risperidona – RSP-P80, RSP-PL188, RSP-SHS15 i RSP-LS75) primenjeni su intraperitonealno u dozi od 1 mg/kg, što je odgovaralo volumenu injektovanja od 1 mL/kg. Dodatno, u cilju procene apsolutne biološke raspoloživosti, jedna grupa pacova dobila je istu dozu (1 mg/kg) rastvora risperidona, RSP-Sol (1 mg/mL risperidona u ultračistoj vodi koja je sadržala 0,25% (m/v) natrijum-hlorida, 0,4% (m/v) vinske kiseline i onoliko natrijum-hidroksida koliko je potrebno da se pH podesi na 5,0) intravenskim putem u repnu venu.

U trećem setu eksperimenata koji su imali za cilj sticanje dubljeg uvida u farmakokinetičke profile odabranih nanoemulzija risperidona i povezanost sa njihovim bihejvioralnim efektima, pacovi su nasumično podeljeni u 3 grupe sa po 21 životinjom (3 životinje × 7 vremenskih tačaka), koje su primile redom dve nanoemulzije risperidona (RSP-P80 i RSP-LS75) i rastvor risperidona (RSP-Sol), intraperitonealno u dozi od 1 mg/kg, tj. 1 mL/kg.

U prethodno definisanim vremenskim intervalima, tj. 5, 10, 20, 40 i 60 min (prvi set eksperimenata) nakon aplikacije nanoemulzija i rastvora diazepama, odnosno 5, 10, 20, 40, 60 i 180 min (drugi set eksperimenata) ili 5, 15, 30 min, 1, 3, 6 i 24 h (treći set eksperimenata) nakon primene nanoemulzija i rastvora risperidona, životinjama, koje su prethodno anestezirane ketaminom (100 mg/kg, intraperitonealno), izvađena je krv punkcijom iz srca, a sakupljeni uzorci krvi centrifugirani su (2500 obrtaja/min, 10 min; Centrifuge MPW-56, MPW Med. Instruments, Poljska) kako bi se dobila plazma. Pacovi su potom žrtvovani dekapitacijom, nakon čega su pažljivo izvađeni intaktni, celi mozgovi i delovi jetre, odmereni, homogenizovani u 5 mL metanola (IKA Ultra-

Turrax® T25 digital), a dobijeni homogenati moždanog tkiva i jetre centrifugirani na 6000 obrtaja/min tokom 20 min (Centrifuge MPW-56).

3.2.7.2.2. Određivanje koncentracije model lekovite supstance u plazmi i moždanom tkivu pacova

Koncentracije model lekovitih supstanci, diazepama i risperidona, kao i aktivnog metabolita risperidona (9-hidroksirisperidon, 9-OH-risperidon) nastalog nakon primene risperidona, u dobijenim uzorcima plazme i supernatantima homogenata moždanog tkiva i jetre određivane su metodom ultra-visokoeфикаsne tečne hromatografije spregnute sa masenom spektrometrijom (UHPLC-MS/MS), kojoj je prethodila priprema uzoraka čvrsto-tečnom ekstrakcijom (engl. *solid phase extraction*, SPE). Sama procedura sastojala se iz prekondicioniranja Oasis HLB kertridža za SPE (Waters Corporation, Milford, Masačusets) metanolom i prečišćenom vodom, nakon čega su kertridži opterećeni biološkim materijalom (plazma, supernatant homogenata moždanog tkiva ili jetre) i rastvorom internog standarda, a potom ispirani prečišćenom vodom i metanolom kako bi se uklonile endogene nečistoće. Na kraju je izvršeno eluiranje analita sa kertridža metanolom (1 mL, tokom 1 min), a dobijeni eluati (5–20 µL) injektovani su u Thermo Scientific Accela 600 UPLC sistem povezan sa Thermo Scientific TSQ Quantum Access MAX trostrukim kvadropolnim masenim analizatorom (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) opremljenim sa elektrosprej jonskim (engl. *electrospray ionization*, ESI) izvorom.

Razdvajanje je izvedeno na XTerra® MS C18 koloni (2,1×150 mm, 3,5 µm, Waters Corporation, Milford, Masačusets) na 25°C. Prilikom određivanja koncentracije diazepama kao mobilna faza korišćena je smeša metanola i 0,1% mravlje kiseline u ultračistoj vodi (80:20, v/v), sa brzinom protoka od 0,5 mL/min, a vreme trajanja analize bilo je 2,1 min. Prilikom određivanja koncentracije risperidona i njegovog aktivnog metabolita 9-OH-risperidona, mobilna faza se sastojala iz smeše acetonitrila i 0,1% mravlje kiseline u ultračistoj vodi (65:35, v/v), sa brzinom protoka od 0,5 mL/min, a vreme trajanja analize bilo je 3 min. Parametri ESI izvora i MS parametri bili su sledeći: napon izvora 5 kV, azot kao nebulizacioni gas (pritisak glavnog gasa 45 jedinica, pritisak pomoćnog gasa 30 jedinica), argon kao kolizioni gas (2,5 mTorr), temperatura isparavanja 350°C, temperatura kapilare 300°C, i vreme skeniranja 0,3 s za diazepam i

0,2 s za risperidon. Kvantifikacija je sprovedena primenom selektivnog moda (engl. *selected reaction monitoring mode*), praćenjem izabranih jonskih prelaza: m/z 285→193, 154 (diazepam), m/z 304→258 (interni standard za diazepam), m/z 411→191 (risperidon), m/z 348→303 (interni standard za risperidon), i m/z 427→207 (9-OH-risperidon). Za prikupljanje i analizu dobijenih podataka korišćen je Thermo Xcalibur 2.1 softverski paket (Thermo Fisher Scientific, San Jose, Kalifornija).

3.2.7.2.3. Farmakokinetička analiza

Neprostopna farmakokinetička analiza u plazmi, mozgu i jetri nakon intraperitonealne primene nanoemulzija sa inkorporiranom model lekovitom supstancom, i intraperitonealne i intravenske primene rastvora model lekovite supstance, izvedena je pomoću PK Functions dodatka za Microsoft Excel softverski paket (Usansky, Desai and Tang-Liu, Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA; <http://www.boomer.org/pkin/soft.html>). Iz dobijenih profila koncentracija model lekovite supstance u plazmi, moždanom tkivu i jetri pacova izračunati su sledeći farmakokinetički parametri: maksimalna koncentracija (C_{max}), vreme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije (T_{max}), površina ispod krive koncentracija–vreme od nultog vremena do poslednje vremenske tačke (AUC_{0-t}), površina ispod krive prvog momenta koncentracija–vreme od nultog vremena do poslednje vremenske tačke ($AUMC_{0-t}$), srednje vreme zadržavanja (MRT), poluvreme eliminacije ($t_{1/2}$), i klirens ($CL = Doza/AUC_{0-t}$).

Relativna biološka raspoloživost (F_{rel}) i apsolutna biološka raspoloživost (F_{abs}) model lekovite supstance nakon intraperitonealne primene nanoemulzija određene su u odnosu na intraperitonealno i intravenski primenjen rastvor, respektivno, primenom formule: $F = AUC_{0-t,nanoemulzija}/AUC_{0-t,rastvor}$. Potencijal razvijenih nanoemulzija da ciljno isporuče inkorporiranu model lekovitu supstancu takođe je procenjen, izračunavanjem parametara kao što su odnos koncentracija u tkivu (mozak ili jetra) i plazmi (C_{tkivo}/C_{plazma}), tkivo–plazma particioni koeficijent ($K_p = AUC_{0-t,tkivo}/AUC_{0-t,plazma}$), i terapijska raspoloživost, poznata i kao relativni stepen preuzimanja ($R = AUC_{0-t,tkivo,nanoemulzija}/AUC_{0-t,tkivo,rastvor}$). Vrednosti ovih parametara > 1 ukazivale su na dobar potencijal ispitivanih formulacija za ciljnu isporuku inkorporirane model lekovite supstance.

3.2.7.3. Studije vezivanja za proteine plazme i moždanog tkiva – Određivanje slobodne frakcije lekovite supstance

Slobodna frakcija risperidona kao model lekovite supstance u plazmi i homogenatu moždanog tkiva pacova određena je pomoću aparature za brzu ekvilibrijumsku dijalizu (engl. *rapid equilibrium dialysis*, RED) sa 48 bunarića i insertima od celulozne membrane, Mr *cut-off* 8000 Da (Thermo Scientific, Rockford, Illinois), primenom procedure prilagođene iz [Obradović i sar. \(2014\)](#). Plazma i moždano tkivo pacova dobijeni su na dan izvođenja eksperimenta; uzorci plazme korišćeni su kao nerazblaženi, dok su uzorci mozga homogenizovani u četiri zapreminska dela (m/v) PBS (pH 7,4). Prilikom *in vitro* određivanja slobodne frakcije (3 ponavljanja), u donorski deo RED inserta (komora za uzorak) dodato je 190 μ L *blank* uzorka plazme ili supernatanta homogenata mozga i 10 μ L radnog rastvora risperidona u dimetilsulfoksidu (DMSO), kako bi se dobila finalna koncentracije risperidona od 5 μ M. U slučaju *ex vivo* određivanja slobodne frakcije, u komoru za uzorak RED inserta dodato je 200 μ L plazme ili supernatanta homogenata moždanog tkiva uzetih od pacova prethodno tretiranih sa RSP-P80, RSP-LS75, ili RSP-Sol (1 mg/kg, intraperitonealno), 5 min nakon doziranja (n = 3 po tretmanu).

Uzorci plazme i mozga dijalizovani su naspram 350 μ L PBS, pH 7,4 (akceptorski deo RED inserta), tokom 4 h, na 37°C, pri brzini od 50 obrtaja/min, u ES-20 orbitalnom šejker-inkubatoru. Nakon završene inkubacije, 50 μ L alikvota dijalizata plazme, mozga i pufera preneto je u mikrokivete u koje je prethodno dodat DMSO (50 μ L), nakon čega je u odgovarajuće uzorke dodato 50 μ L kontrolnog pufera, kontrolne plazme ili kontrolnog homogenata mozga, koji nisu bili podvrgnuti dijalizi, kako bi se dobio identičan matriks između puferskih i nepuferskih uzoraka. Ovako pripremljeni uzorci su zatim pomešani sa 300 μ L acetonitrila u kome je rastvoren interni standard (5 μ M), vorteksovani (1000 obrtaja/min, 10 min, 4°C), centrifugirani (13000 \times g, 10 min, 4°C), a dobijeni supernatanti analizirani UHPLC-MS/MS metodom kako bi se odredile slobodne koncentracije risperidona. Isti protokol korišćen je i za pripremu standardnih kriva, izuzev toga što je 50 μ L praznog (*blank*) dijalizata plazme, homogenata mozga i pufera dodato u mikrokivete koje su sadržale 50 μ L standardnog rastvora risperidona u DMSO u koncentracionom opsegu od 0,001 μ M do 50 μ M.

Slobodna, nevezana frakcija risperidona u plazmi ($f_{u,plazma}$) određena je kao odnos koncentracija risperidona u puferu (akceptorski deo) i plazmi (donorski deo), dok je nevezana frakcija risperidona u nerazblaženom mozgu ($f_{u,mozak}$) izračunata prema jednačini: $f_{u,mozak} = 1/D / [(1/f_{u,homogenat\ mozga} - 1) + 1/D]$, gde $f_{u,homogenat\ mozga}$ predstavlja slobodnu frakciju određenu kao odnos koncentracija risperidona u puferu (akceptorski deo) i razblaženom homogenatu mozga (donorski deo), a D je faktor razblaženja za homogenat mozga (Kalvass i Maurer, 2002). Izračunate slobodne frakcije risperidona korišćene su za određivanje nevezanog mozak–plazma partitionog koeficijenta ($K_{p,uu,mozak} = K_p \times f_{u,mozak}/f_{u,plazma}$), kao mere za stepen penetracije risperidona u mozak (Kulkarni i sar., 2016).

3.2.7.4. *In vivo* farmakodinamska studija

Bazalna lokomotorna aktivnost (BLA) i amfetaminom-indukovana lokomotorna aktivnost (AILA) pojedinačnih pacova praćene su u poluprovidnom kavezu od pleksiglasa ($40 \times 25 \times 35$ cm), pod prigušenim crvenim svetlom (20 lx), tokom 90 min, pomoću digitalne kamere povezane sa ANY-maze Video Tracking System softverskim paketom (Stoelting Co., Wood Dale, Illinois). Odmah nakon intraperitonealne primene odgovarajućeg tretmana – fiziološki rastvor (engl. *saline*, SAL), nanoemulzije risperidona (RSP-P80, RSP-LS75) ili rastvor risperidona (RSP-Sol) – u dozi od 1 mg/kg risperidona (volumen injektovanja 1 mL/kg), test životinje (8 po tretmanu) stavljene su u komoru za ispitivanje. Ponašanje životinja praćeno je tokom 30 min (BLA faza), a zatim je pacovima intraperitonealno injektovan SAL (SAL/SAL grupa) ili rastvor amfetamina u fiziološkom rastvoru (AMPH, 0,5 mg/kg) (SAL/AMPH, RSP-P80/AMPH, RSP-LS75/AMPH, RSP-Sol/AMPH), i njihova aktivnost praćena još 60 min (AILA faza). Bihevioralni parametri korišćeni za procenu efekata ispitivanih tretmana na BLA i hiperlokomociju izazvanu amfetaminom bili su pređeni put i vreme provedeno u aktivnosti. Pored ukupnih vrednosti navedenih parametara, dobijenih tokom čitavog trajanja testa lokomotorne aktivnosti, ponašanje pacova analizirano je i tokom petominutnih intervala.

3.2.8. Statistička analiza

Statistička analiza rezultata fizičko-hemijske karakterizacije i studija stabilnosti nanoemulzija, prikazanih kao srednja vrednost parametra \pm standardna devijacija (SD) iz tri ponavljanja, izvršena je primenom jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) (za tri grupe podataka) ili Student *t*-testa (za dve grupe podataka), dok je poređenje profila oslobađanja model lekovite supstance iz ispitivanih nanoemulzija izvedeno primenom testa univarijantna ANOVA. Rezultati *in vivo* farmakokinetičkih studija, prikazani kao srednja vrednost parametra \pm standardna greška (engl. *standard error of the mean*, SEM) tri nezavisna eksperimenta, analizirani su, kada je to bilo moguće, primenom testa jednofaktorska ANOVA uz *post hoc* analizu primenom Tukey's HSD testa. Kada preduslovi za ANOVA test nisu bili ispunjeni, tj. kada varijanse nisu bile homogene i podaci nisu mogli da se transformišu, korišćen je neparametarski Kruskal–Wallis test praćen Mann–Whitney *U* testom za međusobna poređenja između grupa. U bihejvioralnim ispitivanjima, statistička procena razlika između grupa izvršena je primenom testa jednofaktorska ANOVA (faktor: tretman) za ukupne efekte, ili testa dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem (faktori: tretman i vreme) za efekte tokom petominutnih intervala, sa *post hoc* poređenjima primenom Bonferroni testa. Statistička analiza podataka sprovedena je primenom PASW Statistics 18.0 (SPSS Inc., Illinois) ili SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., Virdžinija) softverskog paketa. U svim testovima, razlike na nivou $p < 0,05$ smatrane su statistički značajnim.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Rezultati i diskusija prve faze eksperimentalnog rada

4.1.1. Izrada i karakterizacija nanoemulzija

Uzimajući u obzir brojna preformulaciona, formulaciona, fiziološka i farmakološka pitanja povezana sa razvojem parenteralnih farmaceutskih oblika lekova slabo rastvorljivih u vodi, u ovoj disertaciji predložen je noviji pristup zasnovan na biokompatibilnim nanoemulzijama kao alternativnim nosačima za parenteralnu primenu slabo rastvorljivih psihofarmakoloških lekovitih supstanci, kakve su diazepam i risperidon, a čija bi primena bila posebno poželjna u hitnim stanjima, kada je potrebna brza isporuka leka u mozak. Da bi se uspešno iskoristile prednosti nanoemulzija kao potencijalnih nosača slabo rastvorljivih lekovitih supstanci, neophodno je da lekovita supstanca, u željenoj koncentraciji, bude inkorporirana u uljanom jezgru nanoemulzije; otuda je rastvorljivost lekovite supstance u unutrašnjoj, uljanoj fazi jedan od ključnih aspekata koji treba razmotriti kada se dizajniraju nanoemulzije kao nosači za lipofilne lekovite supstance (Benita i Levy, 1993; Floyd, 1999; Wu, 2007).

U cilju odabira optimalne uljane faze za formulaciju nanoemulzija sa diazepamom i risperidonom kao model lekovitim supstancama, sprovedene su studije rastvorljivosti u uljima (i smešama ulja) koja se uobičajeno koriste u komercijalnim, parenteralnim lipidnim emulzijama – MCT i sojino ulje. Rezultati su pokazali da je rastvorljivost diazepama u MCT (17,22 mg/mL) više od dva puta veća nego u sojinom ulju (8,27 mg/mL), dok je najveća rastvorljivost zabeležena u smeši MCT i sojinog ulja u odnosu 4:1, m/m (20,99 mg/mL), te je ova smeša odabrana kao uljana faza za formulaciju nanoemulzija sa diazepamom. Za razliku od diazepama, rastvorljivost risperidona u ispitivanim uljima i njihovim smešama (MCT – sojino ulje u odnosu 2:1 i 4:1, m/m) bila je veoma niska ($\leq 2,2$ mg/mL na $25 \pm 2^\circ\text{C}$), što je ukazivalo na nemogućnost inkorporiranja dovoljne količine lekovite supstance u nanoemulzije sa fiksnom količinom uljane faze (20%, m/m).

Kako je željena koncentracija risperidona od 1 mg/g nanoemulzije bila nedostižna, uloženi su dodatni napori da se problem slabe rastvorljivosti risperidona reši. Najpre je u svako od ulja, odnosno njihove smeše, dodat lecitin kao solubilizator, a zatim je

primenjen metod povećanja temperature. Dodatak lecitina, međutim, nije rezultovao rastvaranjem značajnije količine risperidona – rastvorljivost je i dalje bila oko 2 mg/mL na $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Mada je rastvaranje lekovite supstance u uljanoj fazi koja je sadržala lecitin postignuto zagrevanjem, nakon hlađenja na sobnu temperaturu došlo je do precipitacije risperidona. Na kraju je u formulu nanoemulzije uveden benzilalkohol, korastvarač koji se meša sa uljem; rastvaranjem risperidona u ovom korastvaraču bilo je moguće dobiti koncentraciju aktivne supstance od 1 mg/g, a da pritom ne dođe do njene kristalizacije u nanoemulziji. Što se pak izbora uljane faze tiče, pokazano je da smeša MCT i LCT, kao što je sojino ulje, može da smanji viskozitet LCT, raspodelu nanoemulzionih kapi po veličini, kao i međupovršinski napon, te može promovisati fizičku stabilnost nanoemulzija (Driscoll i sar., 2000). Imajući ovo na umu, kao i prethodno iskustvo sa nanoemulzijama diazepama, smeša MCT i sojinog ulja u odnosu 4:1 (m/m) izabrana je kao uljana faza za formulu nanoemulzija sa risperidonom.

Kao glavni emulgator za izradu nanoemulzija bez i sa model lekovitim supstancom korišćen je lecitin. Zapravo, sve trenutno dostupne parenteralne lipidne emulzije na tržištu sadrže lecitin iz jajeta kao emulgator (Wu, 2007); kompleksnost procesa ekstrakcije i visoka cena, međutim, mogu predstavljati ograničenje za njegovu primenu. Nasuprot tome, bogat izvor soje čini da sojin lecitin bude široko dostupan i troškovno-efektivan. Osim toga, istraživanja su pokazala da nanoemulzije stabilizovane sojinim lecitinom mogu imati bolju fizičku stabilnost od nanoemulzija stabilizovanih lecitinom iz jajeta (Araújo i sar., 2011; Ma i sar., 2013), te da je sojin lecitin superiorniji od lecitina iz jajeta u pogledu kapaciteta emulgovanja, pretpostavlja se zbog veće količine negativno naelektrisanih fosfolipida prisutnih u sojinom lecitinu (Ma i sar., 2013). Imajući ovo u vidu, za izradu nanoemulzija sa diazepamom odabrane su dve vrste lecitina koje su se razlikovale po poreklu (sojin i iz jajeta) i sadržaju slobodnih masnih kiselina, dok su nanoemulzije sa risperidonom izrađene sa sojinim lecitinom. Da bi se poboljšala stabilnost nanoemulzija tokom čuvanja i termalne sterilizacije, u formulacije nanoemulzija uključeni su i različiti koemulgatori koji sa lecitinom obrazuju gusto pakovan, kompleksan film na ulje–voda međupovršini. Izbor koemulgatora načinjen je u skladu sa njihovom prihvatljivošću za parenteralnu primenu i, što je još važnije, sa krajnjim ciljem – isporukom lekovite supstance u mozak. Tako su kao koemulgatori upotrebljeni P80, PL188 i SHS15, obećavajući funkcionalni ekscipijensi koji pokazuju

tendenciju da povećaju isporuku lekovite supstance u mozak delujući kao inhibitori *P*-glikoproteina, inhenseri permeacije, „*stealth*“ agensi, ili pospešivači receptorom-posredovane endocitoze (Batrakova i Kabanov, 2008; Kasongo i sar., 2011; Kreuter, 2001; Shinde i sar., 2011).

Da bi se izbegle promene pH vrednosti nanoemulzija tokom čuvanja, a diazepam i risperidon kao slabe baze zadržali u uljanoj fazi, kao vodena faza za izradu nanoemulzija diazepamom korišćen je 0,1 M ili 0,01 M PBS (pH 8,0), dok su 0,01 M PBS (pH 9,0) i ultračista voda koja je sadržala natrijum-oleat (SOS) (pH 9,0) korišćeni kao vodena faza nanoemulzija sa risperidonom. Pored uloge dodatnog stabilizatora fosfolipidnog površinskog sloja (Shi i sar., 2009; Werling i sar., 2008), natrijum-oleat je takođe služio kao puferski agens kako bi se pH vrednost izrađenih formulacija nanoemulzija održala na željenoj vrednosti.

Nakon odabira odgovarajućih komponenata nanoemulzija, u skladu sa primenjenim eksperimentalnim dizajnom (tablela 3.4), metodom HPH na hladno (kako bi se izbegla kristalizacija i precipitacija lekovite supstance) izrađeno je osam različitih formulacija nanoemulzija bez i sa diazepamom kao model lekovitom supstancom (tabela 3.1). U drugom setu eksperimenata, a prema shemi prikazanoj u tableli 3.5, izrađeno je ukupno 12 različitih formulacija nanoemulzija (bez inkorporirane lekovite supstance) kao potencijalnih nosača za risperidon, primenom hladnog ili toplog postupka HPH. Nakon izrade, sve nanoemulzije bile su tečne, homogene, mlečnobeke sa plavičastim odsjajem. Rezultati procene reprezentativnih fizičko-hemijskih parametara nanoemulzija (*Z*-Ave, PDI, ZP, viskozitet, pH vrednost, električna provodljivost) jedan dan nakon izrade, nakon autoklaviranja i nakon dva, odnosno četiri meseca čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}/55 \pm 5\%$ RH, prikazani su u tablelama 4.1.1 i 4.1.2.

Tabela 4.1.1. Dobijeni odgovori nanoemulzija prema 2³ punom faktorskom dizajnu izmereni jedan dan nakon izrade i nakon dva meseca čuvanja na 25 ± 2°C (srednja vrednost ± standardna devijacija, n = 3)

Formulacija	Vreme	Fizičko-hemijski parametri nanoemulzija					
		Z-Ave (nm)	PDI	ZP (mV)	Viskozitet (mPa s)	pH vrednost	Električna provodljivost (mS/cm)
	1 dan						
P20s		205,2 ± 2,2	0,093 ± 0,039	-61,2 ± 1,6	8,4 ± 6,3	7,16 ± 0,01	2,91 ± 0,01
P30s		214,2 ± 1,3	0,148 ± 0,020	-57,3 ± 2,5	10,4 ± 0,6	7,04 ± 0,01	1,98 ± 0,04
P20e		219,2 ± 3,2	0,128 ± 0,018	-50,9 ± 2,1	5,8 ± 3,9	6,90 ± 0,01	3,25 ± 0,01
P30e		215,4 ± 4,8	0,144 ± 0,059	-39,3 ± 0,8	3,1 ± 1,4	6,86 ± 0,04	2,60 ± 0,01
DZM20s		206,9 ± 1,8	0,146 ± 0,016	59,5 ± 0,2	15,0 ± 0,8	7,17 ± 0,02	3,09 ± 0,01
DZM30s		213,0 ± 1,9	0,135 ± 0,015	-56,3 ± 0,5	11,2 ± 11,0	7,03 ± 0,02	2,12 ± 0,01
DZM20e		204,0 ± 4,4	0,136 ± 0,023	-39,8 ± 0,9	14,3 ± 7,2	6,94 ± 0	3,22 ± 0,01
DZM30e		195,4 ± 3,3	0,102 ± 0,024	-32,4 ± 2,2	3,7 ± 0,4	6,87 ± 0,02	2,54 ± 0,01
	60 dana						
P20s		210,0 ± 5,0	0,098 ± 0,013	-62,6 ± 0,4	20,1 ± 1,6	6,78 ± 0,01*	2,85 ± 0,02
P30s		218,5 ± 2,3*	0,122 ± 0,012	-57,2 ± 1,6	11,1 ± 1,6	6,85 ± 0***	1,97 ± 0,04
P20e		264,1 ± 5,4***	0,139 ± 0,022	-58,9 ± 1,4**	19,5 ± 2,3	6,34 ± 0,01*	3,12 ± 0,01***
P30e		236,0 ± 4,2**	0,127 ± 0,024	-60,6 ± 3,3***	20,4 ± 0,6*	6,27 ± 0,01*	2,58 ± 0**
DZM20s		210,9 ± 1,1*	0,126 ± 0,018	-63,5 ± 4,6	20,3 ± 0	6,93 ± 0,02*	2,89 ± 0,01***
DZM30s		214,2 ± 1,6	0,127 ± 0,036	-56,6 ± 2,4	11,4 ± 4,9	6,95 ± 0,01**	2,10 ± 0,01
DZM20e		203,2 ± 1,3	0,138 ± 0,020	-52,6 ± 0,3***	19,4 ± 0,3	6,58 ± 0,03*	2,99 ± 0,04***
DZM30e		191,6 ± 3,0	0,112 ± 0,009	-53,9 ± 1,9***	16,1 ± 0,4*	6,50 ± 0,02*	2,49 ± 0,01***

Z-Ave: prosečna veličina kapi; PDI: indeks polidisperznosti; ZP: zeta potencijal.

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, u poređenju sa istim uzorkom jedan dan nakon izrade.

Tabela 4.1.2. Fizičko-hemijske karakteristike dizajniranih placebo nanoemulzija prema generalnom faktorskom dizajnu jedan dan nakon izrade i nakon četiri meseca čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (srednja vrednost \pm standardna devijacija, $n = 3$)

Formulacija	Vreme	Fizičko-hemijski parametri nanoemulzija									
		Z-Ave (nm)		PDI		ZP (mV)		pH vrednost		Električna provodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	
		f	a	f	a	f	a	f	a	f	a
	1 dan										
P80Pc		187,3 \pm 2,2	n.s.	0,103 \pm 0,008	n.s.	-54,4 \pm 1,8	n.s.	7,69 \pm 0,02	n.s.	362,8 \pm 1,3	n.s.
P80Ph		129,8 \pm 1,4	n.s.	0,107 \pm 0,026	n.s.	-46,7 \pm 1,8	n.s.	7,49 \pm 0,02	n.s.	380,0 \pm 2,6	n.s.
P80Sc		192,9 \pm 1,3	191,5 \pm 0,8	0,145 \pm 0,002	0,135 \pm 0,027	-51,4 \pm 1,4	-53,7 \pm 0,9	7,62 \pm 0,04	7,19 \pm 0,03 ^a	115,6 \pm 0,4	121,8 \pm 0,3 ^a
P80Sh		158,6 \pm 1,6	159,8 \pm 1,0	0,125 \pm 0,011	0,131 \pm 0,012	-46,3 \pm 3,0	-43,2 \pm 0,7	7,70 \pm 0,11	7,25 \pm 0,07 ^a	121,2 \pm 0,4	118,3 \pm 0,6 ^a
PL188Pc		187,7 \pm 2,7	235,2 \pm 2,5 ^a	0,115 \pm 0,035	0,068 \pm 0,005	-58,5 \pm 1,1	-60,4 \pm 1,0 ^a	7,66 \pm 0,01	7,34 \pm 0,00 ^a	366,3 \pm 0,6	597,3 \pm 5,5 ^a
PL188Ph		148,7 \pm 1,4	241,2 \pm 4,0 ^a	0,102 \pm 0,025	0,086 \pm 0,042	-49,3 \pm 1,1	-61,8 \pm 2,0 ^a	7,66 \pm 0,01	7,40 \pm 0,02 ^a	381,3 \pm 2,1	527,7 \pm 0,6 ^a
PL188Sc		191,4 \pm 1,4	186,2 \pm 5,6	0,115 \pm 0,025	0,114 \pm 0,016	-46,8 \pm 1,6	-48,8 \pm 0,7	7,63 \pm 0,20	7,24 \pm 0,07 ^a	111,1 \pm 0,4	116,5 \pm 0,2 ^a
PL188Sh		155,3 \pm 1,1	154,2 \pm 0,7	0,099 \pm 0,012	0,086 \pm 0,021	-44,6 \pm 2,0	-43,0 \pm \pm 1,2	7,64 \pm 0,20	7,30 \pm 0,06 ^a	122,6 \pm 0,2	119,2 \pm 0,3 ^a
SHS15Pc		187,8 \pm 2,5	102,5 \pm 1,1 ^a	0,142 \pm 0,027	0,052 \pm 0,015 ^a	-56,7 \pm 1,0	-52,2 \pm 1,4 ^a	7,69 \pm 0,03	7,41 \pm 0,01 ^a	382,3 \pm 6,7	356,0 \pm 2,0 ^a
SHS15Ph		107,1 \pm 0,8	102,6 \pm 1,3 ^a	0,066 \pm 0,019	0,024 \pm 0,014 ^a	-48,8 \pm 1,3	-48,9 \pm 2,5	7,73 \pm 0,02	7,39 \pm 0,02 ^a	397,3 \pm 3,1	365,0 \pm 1,0 ^a
SHS15Sc		180,3 \pm 0,6	181,2 \pm 2,1	0,124 \pm 0,031	0,161 \pm 0,016	-53,0 \pm 1,1	-51,9 \pm 0,6	7,85 \pm 0,14	7,27 \pm 0,09 ^a	116,5 \pm 0,6	121,5 \pm 1,0 ^a
SHS15Sh		146,8 \pm 2,5	145,9 \pm 0,3	0,104 \pm 0,020	0,092 \pm 0,031	-50,0 \pm 1,2	-48,1 \pm 1,7	7,77 \pm 0,01	7,31 \pm 0,08 ^a	124,3 \pm 0,7	123,7 \pm 0,6

Tabela 4.1.2. (nastavak)

Formulacija	Vreme	Fizičko-hemijski parametri nanoemulzija									
		Z-Ave (nm)		PDI		ZP (mV)		pH vrednost		Električna provodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	
		f	a	f	a	f	a	f	a	f	a
	120 dana										
P80Pc		188,9 ± 2,3	n.s.	0,117 ± 0,025	n.s.	-56,7 ± 3,2	n.s.	7,52 ± 0,02 ^b	n.s.	350,0 ± 1,0 ^b	n.s.
P80Ph		131,6 ± 1,1	n.s.	0,095 ± 0,036	n.s.	-49,6 ± 1,7	n.s.	7,50 ± 0,00	n.s.	339,0 ± 0,0 ^b	n.s.
P80Sc		190,1 ± 3,1	189,9 ± 3,2	0,148 ± 0,027	0,121 ± 0,014	-50,8 ± 1,0	-54,8 ± 1,2	7,42 ± 0,05 ^b	7,03 ± 0,02 ^c	111,3 ± 0,2 ^b	113,7 ± 0,3 ^c
P80Sh		160,8 ± 2,7	161,2 ± 2,9	0,130 ± 0,032	0,121 ± 0,006	-48,9 ± 1,9	-45,2 ± 1,7	7,56 ± 0,02	7,28 ± 0,03	118,8 ± 0,3 ^b	118,8 ± 0,3
PL188Pc		191,4 ± 1,0	235,8 ± 2,4	0,103 ± 0,031	0,078 ± 0,035	-59,8 ± 1,8	-60,9 ± 2,2	7,54 ± 0,01 ^b	7,33 ± 0,02	338,7 ± 1,5 ^b	304,0 ± 0,0 ^c
PL188Ph		151,5 ± 4,5	249,5 ± 2,9	0,108 ± 0,014	0,009 ± 0,008 ^c	-49,2 ± 2,6	-60,3 ± 3,3	7,47 ± 0,03 ^b	7,28 ± 0,02 ^c	350,3 ± 1,2 ^b	306,0 ± 1,0 ^c
PL188Sc		193,1 ± 1,7	185,2 ± 0,8	0,121 ± 0,016	0,126 ± 0,019	-49,4 ± 1,7	-50,7 ± 1,1	7,46 ± 0,04	7,21 ± 0,01	116,8 ± 0,9 ^b	121,8 ± 0,1 ^c
PL188Sh		158,4 ± 3,3	155,8 ± 3,1	0,100 ± 0,038	0,099 ± 0,022	-44,3 ± 2,1	-46,2 ± 2,8	7,46 ± 0,03	7,25 ± 0,01	120,3 ± 0,5 ^b	124,1 ± 0,4 ^c
SHS15Pc		235,9 ± 2,3 ^b	118,6 ± 1,6 ^c	0,103 ± 0,027	0,047 ± 0,020	-57,5 ± 2,3	-51,1 ± 1,9	7,50 ± 0,01 ^b	7,33 ± 0,01 ^c	373,3 ± 2,1	321,3 ± 0,6 ^c
SHS15Ph		148,3 ± 2,9 ^b	120,7 ± 1,5 ^c	0,064 ± 0,021	0,046 ± 0,015	-50,3 ± 0,6	-50,2 ± 2,3	7,53 ± 0,01 ^b	7,33 ± 0,01 ^c	373,3 ± 0,6 ^b	364,7 ± 2,3
SHS15Sc		180,1 ± 0,4	182,2 ± 4,1	0,129 ± 0,012	0,155 ± 0,018	-52,4 ± 2,5	-51,0 ± 0,4	7,52 ± 0,06 ^b	7,24 ± 0,10	124,0 ± 0,1 ^b	127,0 ± 1,7 ^c
SHS15Sh		148,8 ± 1,7	144,0 ± 2,0	0,106 ± 0,025	0,124 ± 0,013	-50,0 ± 2,8	-49,4 ± 0,2	7,64 ± 0,11	7,26 ± 0,02	125,0 ± 0,5	126,9 ± 0,3 ^c

Z-Ave: prosečna veličina kapi; PDI: indeks polidisperznosti; ZP: zeta potencijal; f: uzorak nanoemulzije filtriran kroz 0,22 μm filter;

a: uzorak nanoemulzije sterilisan parom, u autoklavu (121°C, 15 min); n.s.: nije stabilno.

^a $p < 0,05$ u poređenju sa neautoklaviranim uzorkom jedan dan nakon izrade; ^b $p < 0,05$ u poređenju sa filtriranim uzorkom jedan dan nakon izrade; ^c $p < 0,05$, u poređenju sa autoklaviranim uzorkom jedan dan nakon izrade.

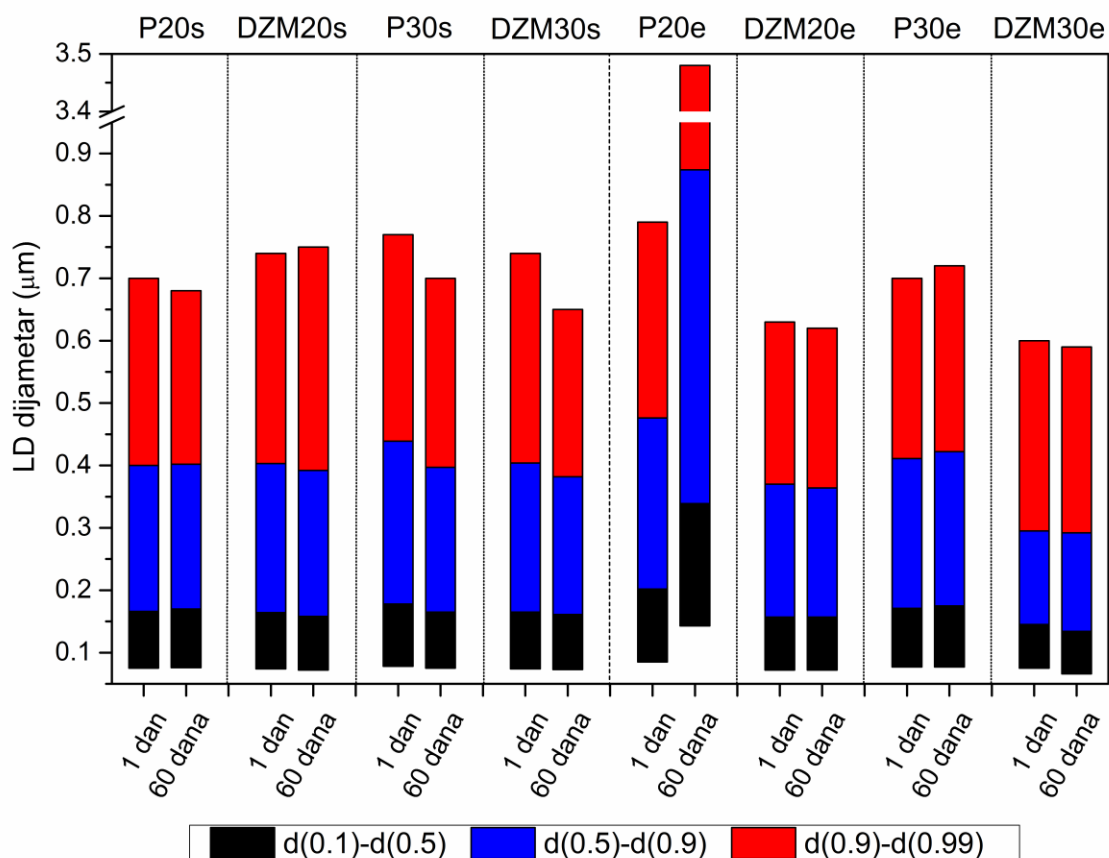
Veličina kapi i raspodela veličina kapi jedne su od najvažnijih karakteristika parenteralnih nanoemulzija; predstavljaju kritične parametre ne samo sa aspekta kvaliteta i stabilnosti emulzionog sistema, već i sa aspekta bezbednosti pacijenta (kapi veće od 5 μm mogu da izazovu plućnu emboliju). Osim toga, sudbina emulzionih kapi u organizmu (engl. *in vivo fate*), određena je, između ostalog, njihovom veličinom i raspodelom veličina (Benita i Levy, 1993; Floyd, 1999; Hippalgaonkar i sar., 2010; Jumaa i Müller, 1998b). Prosečna veličina kapi komercijalno dostupnih lipidnih emulzija za parenteralnu ishranu kreće se oko 200 do 300 nm (Müller i sar., 2012), a generalno je poželjno da bude manja od 1 μm (Gao i sar., 2008), odnosno 500 nm (The United States Pharmacopeia, 2016), dok se za PDI, koji predstavlja meru za širinu distribucije kapi po veličini i ukazuje na homogenost disperzije, vrednost manja od 0,25 smatra prihvatljivom (Müller i sar., 2004).

Analiza veličine kapi (tabele 4.1.1 i 4.1.2) pokazuje da su jedan dan nakon izrade sve razvijene formulacije nanoemulzija imale prosečnu veličinu kapi, merenu PCS metodom, u nanometarskom opsegu (Z-Ave 107–220 nm), sa relativno uskom raspodelom veličina (PDI < 0,15), u skladu sa kriterijumima parenteralnog puta primene. Kada je LD tehnika korišćena za procenu veličine kapi, utvrđeno je da je $d(0.5)$ dijametar ispitivanih nanoemulzija diazepama, i odgovarajućih placebo nanoemulzija, bio između 145 i 200 nm (slika 4.1.1), pokazujući dobro slaganje sa PCS rezultatima (tablela 4.1.1). Povrh toga, $d(0.9)$ vrednosti bile su oko 300–400 nm i nije bilo čestica iznad 1 μm (slika 4.1.1), što dodatno ukazuje na zadovoljavajući kvalitet razvijenih nanoemulzija za parenteralnu primenu.

Pored veličine kapi, ZP je druga važna karakteristika nanoemulzija i veoma dobar pokazatelj stabilnosti nanoemulzionog sistema. Visoke apsolutne vrednosti ZP dovode do elektrostatičkog odbijanja kapi emulzije čime se povećava njihova stabilnost na koalescenciju (Benita i Levy, 1993; Jumaa i Müller, 1998b). Generalno je prihvaćeno da apsolutne vrednosti ZP veće od 30 mV ukazuju na dobru fizičku stabilnost, dok vrednosti iznad 60 mV ukazuju na veoma dobru stabilnost koloidnog sistema (Müller i sar., 2012). Kao što se može videti u tabelama 4.1.1 i 4.1.2, sve formulacije nanoemulzija imale su, jedan dan nakon izrade, vrednost ZP u opsegu od –30 do –60 mV, slično parenteralnim emulzijama prisutnim na tržištu (Müller i sar., 2012). To znači da lecitin sa svojim negativno naelektrisanim fosfolipidima na pH formulacije, u

prisustvu P80, PL188 ili SHS15 kao kostabilizatora, može da proizvede dovoljno veliko negativno površinsko naelektrisanje kapi, koje potencijalno može da obezbedi dobru dugoročnu stabilnost razvijenih parenteralnih nanoemulzija, bez i sa inkorporiranom model lekovitom supstancom.

Dodatno, iako se određivanje viskoziteta ne sprovodi rutinski prilikom karakterizacije parenteralnih nanoemulzija sa inkorporiranom lekovitom supstancom, ovaj parametar je relevantno procenjivati, imajući u vidu da intravenska primena viskoznih sistema može biti udružena sa određenim problemima, kao što je bol (Jumaa i Müller, 1998b; Kelmann i sar., 2007). Nizak prividni viskozitet ispitivanih nanoemulzija diazepama i njihovih placebo formulacija (12 ± 9 mPa s), kao i pH vrednost od $7,0 \pm 0,2$ (tablela 4.1.1), dodatno potvrđuju da su razvijene nanoemulzije pogodne za parenteralnu primenu i isporuku lekovitih supstanci.



Slika 4.1.1. LD dijometri nanoemulzija diazepama i odgovarajućih placebo nanoemulzija jedan dan nakon izrade i nakon dva meseca čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.1.2. Metodologija eksperimentalnog dizajna

Veličina kapi, površinsko naelektrisanje i karakteristike površine nanoemulzija smatraju se ključnim parametrima koji utiču na prolazak inkorporirane supstance kroz KMB, u čemu sastav filma surfaktanata/emulgatora na međupovršini igra najvažniju ulogu (Keck i sar., 2013; Müller i Göppert, 2007; Voigt i sar., 2012). Na osnovu prethodnih saopštenja (Blasi i sar., 2013; Dhawan i sar., 2011; Wohlfart i sar., 2012), u ovoj disertaciji je konkretno pretpostavljeno da su mala (ispod 200 nm) i homogena veličina kapi, negativni ZP i hidrofilna površina nanoemulzionih kapi preduslov za efikasnu isporuku aktivne supstance u mozak, te su poznavanje i kontrola faktora koji utiču na ove parametre bili od posebnog značaja. U tom smislu, u cilju dobijanja dubljeg uvida u to kako na kritična svojstva nanoemulzija utiču varijacije u sastvavu formulacije i uslovima izrade, uz istovremeno izbegavanje nedostataka tradicionalnog pristupa u izvođenju eksperimenata, te procene uticaja većeg broja faktora, istovremeno, na odabrane karakteristike nanoemulzionog sistema, primenjena je strategija eksperimentalnog dizajna. Time je, uz izvođenje relativno malog broja eksperimenata, omogućena ne samo identifikacija faktora koji imaju značajan uticaj na vrednost ispitivanog odgovora, nego i kvantifikacija kako direktnog efekta svake pojedinačne promenljive, tako i efekta njihovih interakcija, a u cilju optimizacije formulacije i procesa izrade nanoemulzija.

4.1.2.1. Pun faktorski dizajn

Tokom razvoja formulacije parenteralnih nanoemulzija sa diazepamom kao model lekovitom supstancom, istovremeni uticaj koncentracije uljane faze, vrste lecitina i prisustva aktivne supstance na veličinu kapi, PDI, ZP i viskozitet razvijenih nanoemulzija procenjen je primenom punog faktorskog dizajna sa tri faktora na dva nivoa. Za svaki od posmatranih odgovara izračunati su efekti ispitivanih faktora i interakcija faktora, a njihova statistička značajnost proverena primenom ANOVA testa. Da bi se odabrali značajni parametri koji će biti uključeni u model, korišćen je grafički alat – *half-normal plot* efekata. Faktori i interakcije čiji uticaj na praćene odgovore nije bio statistički značajan isključeni su iz modela, izuzev onih koji su bili neophodni da se održi hijerarhija, te su tako generisani redukovani faktorski modeli za ispitivane

parametre nanoemulzija. Dobijene finalne jednačine odgovora u pogledu kodiranih vrednosti faktora date su u nastavku (4.1.1–4.1.4):

$$ZAve(nm) = 209.16 + 0.34A - 0.66B - 4.34C - 3.44AB - 4.46BC \quad (4.1.1)$$

$$PDI = 0.1290 + 0.0033A - 0.0015B + 0.0008C - 0.0078AB - 0.0145AC - 0.0093BC \quad (4.1.2)$$

$$ZP(mV) = -49.59 + 8.99B \quad (4.1.3)$$

$$Viscosity(mPa \cdot s) = 8.99 - 1.89A - 2.26B + 2.06C - 1.44AB - 1.71AC \quad (4.1.4)$$

ANOVA izveštaj za predložene faktorske modele koji opisuju zavisnost izlaznih od ulaznih parametara nanoemulzija prikazan je u tabeli 4.1.3. Kao što se može videti iz F vrednosti modela ($p < 0,05$), generisani modeli za Z-Ave, ZP i viskozitet nanoemulzija bili su značajni, što ukazuje da su tri navedena odgovora dobro opisana predloženim modelima. Nasuprot tome, generisani model za PDI nije bio statistički značajan ($p > 0,01$ za F vrednost modela), što ukazuje na to da ispitivani faktori formulacije nisu značajno uticali na PDI nanoemulzija. Rezultati eksperimentalnog dizajna dalje su analizirani, sa fokusom na procenu relativne značajnosti faktora i interakcija faktora uključenih u predložene modele, a kroz poređenje vrednosti koeficijenata uz date parametre. Član modela koji je imao $p < 0,05$ generalno je smatran statistički značajnim. Što je p vrednost manja, odnosno vrednost koeficijenta veća, veći je odgovarajući efekat na odgovor.

Iz [tabele 4.1.3](#) se može videti da su na prosečnu veličinu kapi (Z-Ave) ispitivanih nanoemulzija značajno uticali prisustvo diazepama kao model lekovite supstance (C), interakcija između koncentracije uljane faze i vrste lecitina (AB) i interakcija između vrste lecitina i diazepama (BC). Negativni predznak ispred koeficijenta lekovite supstance u [jednačini \(4.1.1\)](#) ukazuje na antagonistički efekat prisustva diazepama na Z-Ave nanoemulzija, što znači da se veličina kapi smanjila sa inkorporiranjem lekovite supstance. Slično tome, pomenute značajne interakcije takođe su dovele do smanjenja Z-Ave. Na osnovu veličine koeficijenata, može se zaključiti da je najveći efekat na Z-Ave imala BC interakcija, praćena prisustvom lekovite supstance i, na kraju, AB interakcijom.

Tabela 4.1.3. Rezultati analize varijanse faktorskih modela za ispitivane fizičko-hemijske parametre nanoemulzija prema 2³ punom faktorskom dizajnu

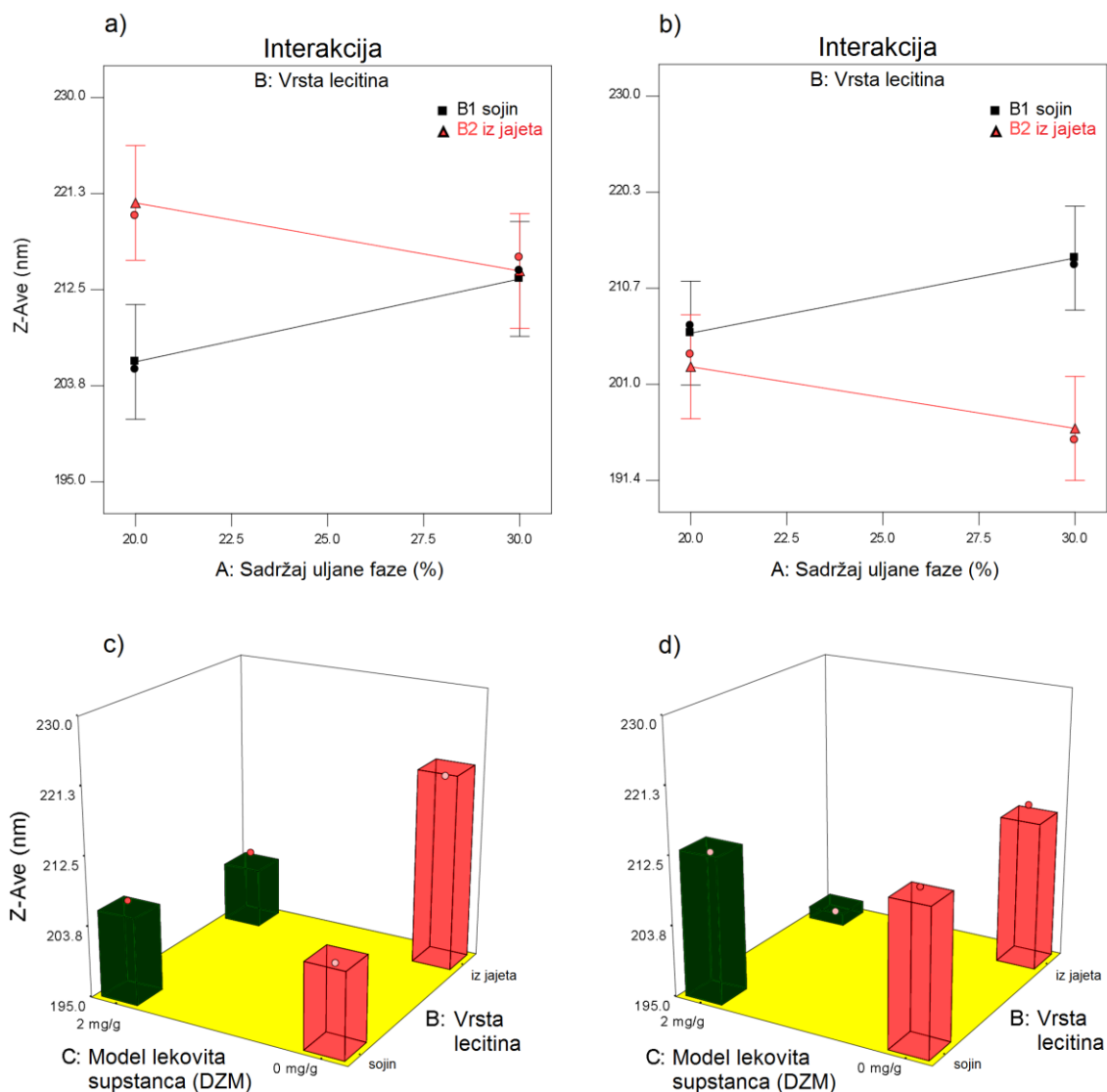
Odgovor	Izvor varijacije	SS	DF	MS	F vrednost	p vrednost
Z-Ave (nm)	Model	408,78	5	81,76	20,80	0,0456*
	A–Sadržaj uljane faze	0,91	1	0,91	0,23	0,6777
	B–Vrsta lecitina	3,51	1	3,51	0,89	0,4444
	C–Model lekovita supstanca (DZM)	150,51	1	150,51	38,29	0,0251*
	AB	94,53	1	94,53	24,05	0,0392*
	BC	159,31	1	159,31	40,52	0,0238*
	Ostatak	7,86	2	3,93		
	Korigovana suma	416,64	7			
PDI	Model	0,002954	6	0,000492	15,39	0,1927
	Ostatak	0,000032	1	0,000685		
	Korigovana suma	0,002986	7			
ZP (mV)	Model	646,20	1	646,20	20,38	0,0040**
	B–Vrsta lecitina	646,20	1	646,20	20,38	0,0040**
	Ostatak	190,21	6	31,70		
	Korigovana suma	836,41	7			
Viskozitet (mPa·s)	Model	143,48	5	28,70	62,89	0,0157*
	A–Sadržaj uljane faze	28,50	1	28,50	62,47	0,0156*
	B–Vrsta lecitina	40,95	1	40,95	89,76	0,0110*
	C–Model lekovita supstanca (DZM)	34,03	1	34,03	74,59	0,0131*
	AB	16,53	1	16,53	36,23	0,0265*
	AC	23,46	1	23,46	51,42	0,0189*
	Ostatak	0,91	2	0,46		
	Korigovana suma	144,39	7			

Z-Ave: prosečna veličina kapi; PDI: indeks polidisperznosti; ZP: zeta potencijal; SS: suma kvadrata (engl. *sum of squares*); DF: broj stepeni slobode (engl. *degrees of freedom*); MS: srednja vrednost sume kvadrata (engl. *mean sum of squares*).

*p < 0,05; **p < 0,01.

Efekti sadržaja uljane faze (A) i vrste lecitina (B), i njihove interakcije (AB), na Z-Ave nanoemulzija, u odsustvu i prisustvu diazepama kao model lekovite supstance, prikazani su na slikama 4.1.2a i 4.1.2b, respektivno. U oba slučaja, povećanje sadržaja uljane faze sa 20% na 30% dovelo je do porasta Z-Ave nanoemulzija izrađenih sa sojinim lecitinom. Suprotno, kada je lecitin iz jajeta korišćen za stabilizaciju nanoemulzija, povećanje sadržaja uljane faze sa 20% na 30% dovelo je do smanjenja Z-Ave nanoemulzija i bez i sa lekovitom supstancom. Slika 4.1.2 takođe prikazuje efekte vrste lecitina (B) i inkorporirane lekovite supstance (C), i njihove interakcije (BC), na Z-Ave nanoemulzija sa 20% (slika 4.1.2c) i 30% uljane faze (slika 4.1.2d). Kada je lecitin iz jajeta korišćen umesto sojinog lecitina, Z-Ave placebo nanoemulzija imao je tendenciju da raste. Nasuprot tome, kod nanoemulzija sa inkorporiranim diazepamom, upotreba lecitina iz jajeta umesto sojinog lecitina dovela je do redukcije veličine kapi.

Sa slika 4.1.2a–4.1.2d se takođe može videti da na Z-Ave nanoemulzija stabilizovanih sojinim lecitinom inkorporiranje diazepama nije uticalo, bez obzira na sadržaj ulja. S druge strane, kada je u formulaciji nanoemulzija korišćen lecitin jajeta, inkorporiranje diazepama dovelo je do značajnog smanjenja Z-Ave. Iz svega navedenog se može zaključiti da su nanoemulzije formulisane sa sojinim lecitinom bile mnogo robusnije u pogledu efekta diazepama na Z-Ave, u poređenju sa nanoemulzijama sa lecitinom iz jajeta koje su se činile osetljivijim na prisustvo lekovite supstance. Generalno se očekivalo da će inkorporiranje diazepama u nanoemulzije dovesti do povećanja veličine kapi, s obzirom da dodatni lipofilni molekuli treba da budu solubilizovani u uljanoj fazi (Klang i Valenta, 2011; Wang i sar., 2006). Prikazani rezultati nagoveštavaju interakciju diazepama sa slojem emulgatora, naročito sa lecitinom iz jajeta. Naime, moguće je da parcijalna lokalizacija lekovite supstance na ulje–voda međupovršini može da smanji površinski napon, i time veličinu kapi tokom procesa homogenizacije (Jumaa i Müller, 2002; Wang i sar., 2006).

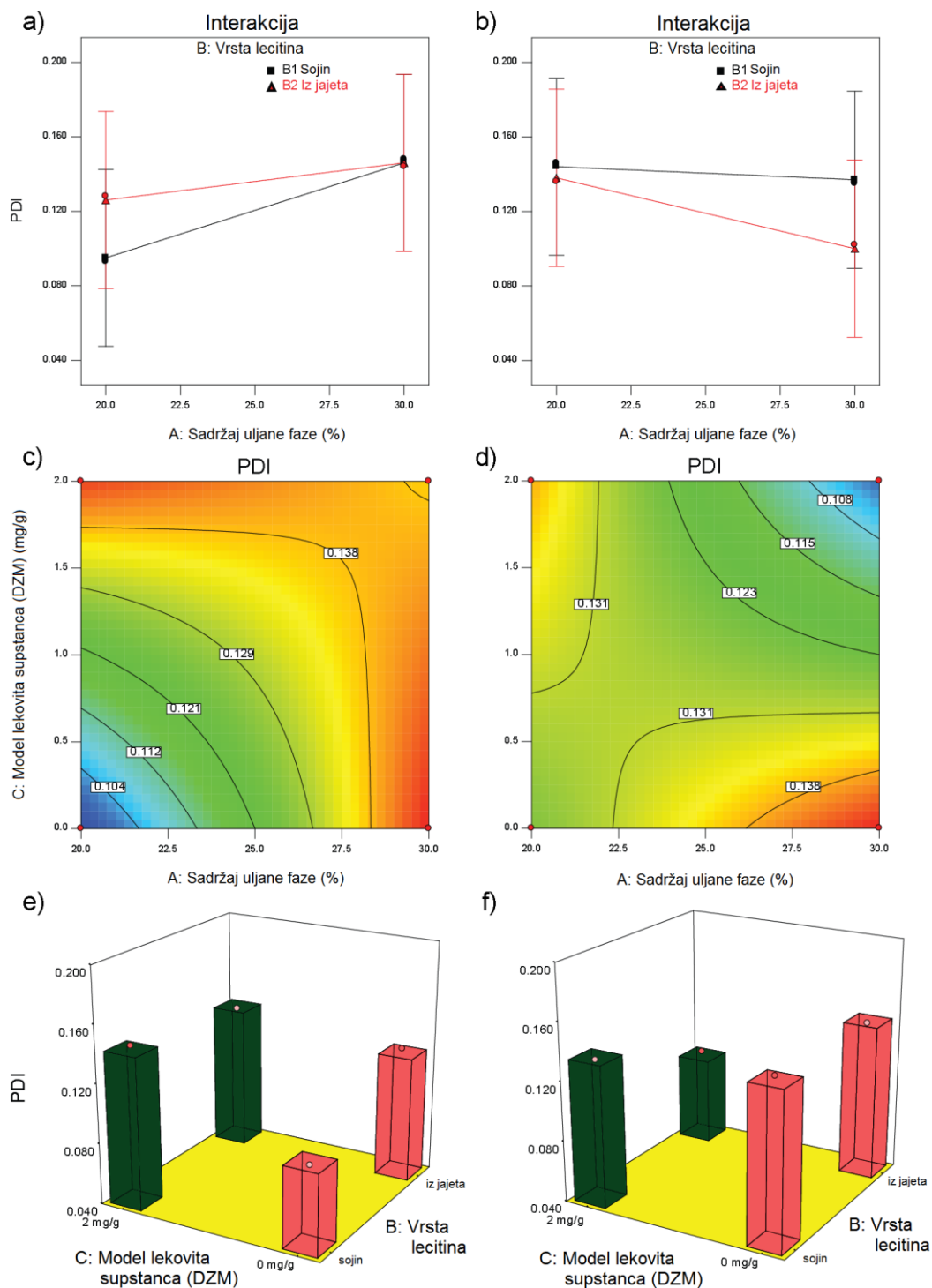


Slika 4.1.2. Dijagrami interakcija i površine odgovora koji prikazuju prosečnu veličinu kapi (Z-Ave) nanoemulzija u funkciji faktora A i B na donjem nivou faktora C (a), faktora A i B na gornjem nivou faktora C (b), faktora B i C na donjem nivou faktora A (c), i faktora B i C na gornjem nivou faktora A (d); A: sadržaj uljane faze; B: vrsta lecitina; C: prisustvo lekovite supstance.

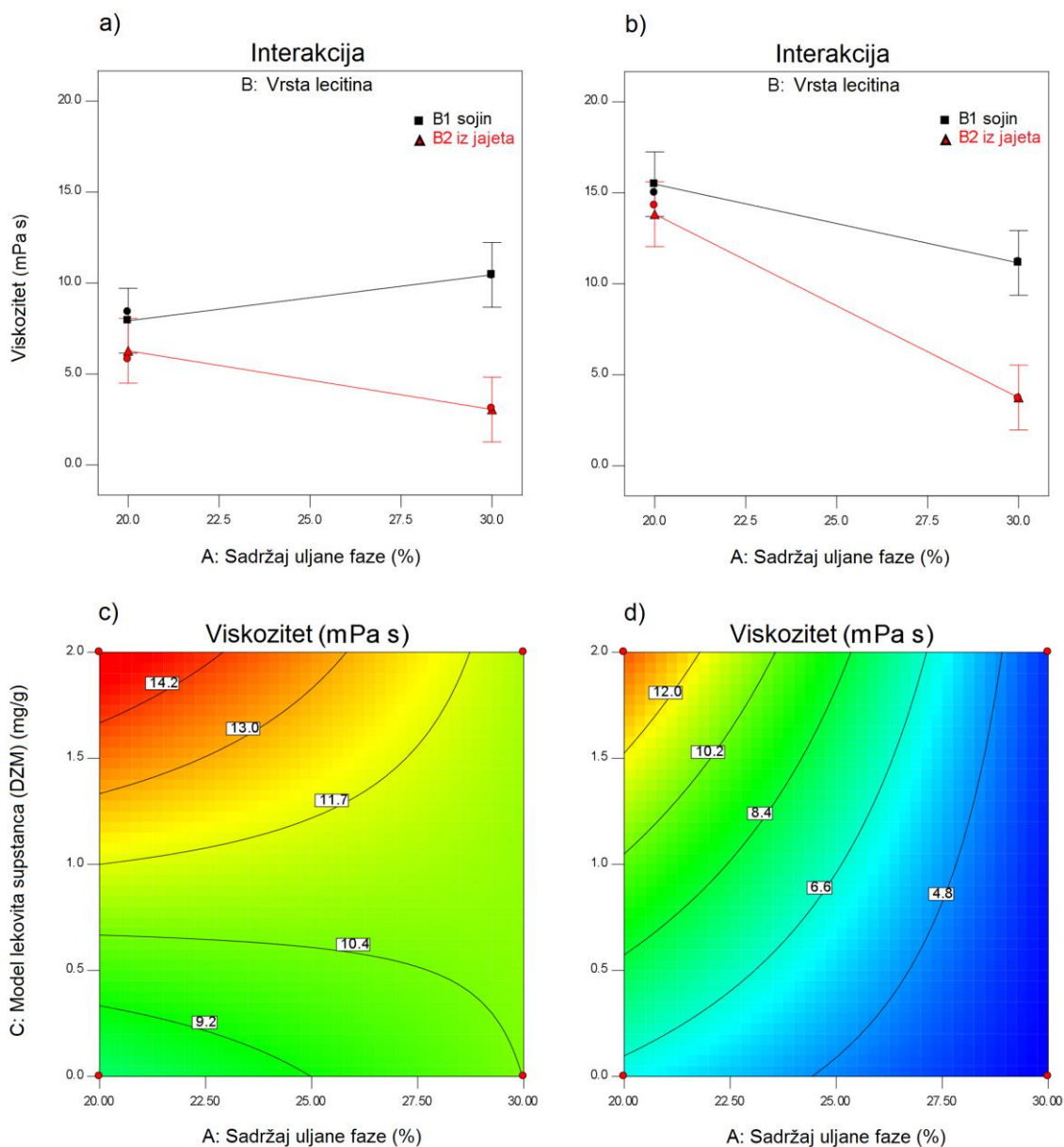
Tokom procedure fitovanja modela, utvrđeno je da na PDI dizajniranih nanoemulzija individualno testirane promenljive nisu značajno uticale, ali jesu njihovi zajednički efekti. S obzirom da su sve interakcije (AB, AC, BC) bile statistički značajne, nijedan od individualnih faktora (A, B, C) nije isključen iz modela, što je rezultovalo fitovanim modelom i članovima modela koji nisu bili statistički značajni (tabela 4.1.3). Efekti dvofaktorskih interakcija na PDI nanoemulzija prikazani su na slici 4.1.3. Kao što se

može videti, povećanje sadržaja uljane faze sa 20% na 30% dovelo je do povećanja PDI placebo nanoemulzija izrađenih bilo sa sojinim lecitinom ili sa lecitinom iz jajeta; suprotno, kod nanoemulzija sa inkorporiranim diazepamom, došlo je do smanjenja PDI. Konačno, kada je lecitin iz jajeta korišćen umesto sojinog lecitina, PDI placebo nanoemulzija se povećao (izraženije kod nanoemulzija sa 20% uljane faze), dok se PDI nanoemulzija sa diazepamom smanjio (izraženije kod nanoemulzija sa 30% uljane faze). Što se tiče ZP, utvrđeno je da je među ispitivanim faktorima formulacije jedino vrsta lecitina imala značajan i pozitivan efekat [jednačina (4.1.3)], što znači da je apsolutna vrednost ZP bila veća kada je za izradu i stabilizaciju nanoemulzija korišćen sojin lecitin (oko -60 mV) umesto lecitina jajeta (oko -40 mV). Rezultati su takođe pokazali da nije bilo razlike u ZP nanoemulzija bez i sa diazepamom, što ukazuje da model lekovita supstanca nije uticala na ZP izrađenih nanoemulzija.

U pogledu viskoziteta nanoemulzija, tabela 4.1.3 otkriva da su svi ispitivani faktori, naime, sadržaj uljane faze, vrsta lecitina i inkorporirana lekovita supstanca, imali značajan efekat na ovaj parametar. Zatim, obe značajne interakcije (AB i AC) uključivale su sadržaj uljane faze kao nezavisno promenljivu. Svi značajni faktori i interakcije imali su antagonistički efekat na viskozitet, sa izuzetkom inkorporirane lekovite supstance koja je imala sinergistički efekat [jednačina (4.1.3)]. Takođe, izolovani efekti svake promenljive bili su jači od odgovarajućih interakcija, kao što je prikazano na slikama 4.1.4a–4.1.4d. Očigledno je da se viskozitet placebo nanoemulzija izrađenih sa sojinim lecitinom povećao, dok se viskozitet formulacija sa diazepamom smanjio, kada je sadržaj uljane faze promenjen sa 20% na 30%. Kada je pak korišćen lecitin iz jajeta, i placebo i nanoemulzije sa diazepamom pokazale su pad viskoziteta sa povećanjem sadržaja ulja. Takođe, niži viskozitet nanoemulzija dobijen je kada je lecitin iz jajeta korišćen umesto sojinog lecitina, nezavisno od sadržaja uljane faze.



Slika 4.1.3. Dijagrami interakcija, konturni dijagrami i dijagrami površine odgovora koji prikazuju indeks polidisperznosti (PDI) nanoemulzija u funkciji faktora A i B na donjem nivou faktora C (a), faktora A i B na gornjem nivou faktora C (b), faktora A i C na donjem nivou faktora B (c), faktora A i C na gornjem nivou faktora B (d), faktora B i C na donjem nivou faktora A (e), i faktora B i C na gornjem nivou faktora A (f); A: sadržaj uljane faze; B: vrsta lecitina; C: prisustvo lekovite supstance.



Slika 4.1.4. Dijagrami interakcija i konturni dijagrami koji prikazuju viskozitet nanoemulzija u funkciji faktora A i B na donjem nivou faktora C (a), faktora A i B na gornjem nivou faktora C (b), faktora A i C na donjem nivou faktora B (c), i faktora A i C na gornjem nivou faktora B (d); A: sadržaj uljane faze; B: vrsta lecitina; C: prisustvo lekovite supstance.

4.1.2.2. Generalni faktorski dizajn

Tabela 4.1.2 prikazuje rezultate izmerenih odgovora – fizičko-hemijskih karakteristika, za sve prazne nanoemulzije (nanoemulzije bez lekovite supstance) koje su bile deo generalnog faktorskog dizajna, primenjenog u cilju utvrđivanja kombinacije faktora i njihovih interakcija, koja će dati nanoemulzije odgovarajućih svojstava za ciljnu isporuku lekovite supstance u mozak. Za svaku zavisno promenljivu (Z-Ave, PDI i ZP), izračunati su efekti koji odgovaraju ispitivanim faktorima (vrsta koemulgatora, vrsta vodene faze, temperatura homogenizacije tj. tip HPH metoda) i interakcijama. Faktori i interakcije sa $p < 0,05$ smatrani su statistički značajnim. Članovi sa neznačajnim uticajem na procenjeni odgovor su isključeni, sem onih neophodnih da se održi hijerarhija, i time su generisani redukovani faktorski modeli za veličinu kapi, raspodelu kapi po veličini i površinsko naelektrisanje nanoemulzija. Dobijene finalne jednačine (4.1.5–4.1.7) koje opisuju zavisnost praćenih odgovora od ispitivanih faktora date su u nastavku, u kodiranom obliku:

$$ZAve(nm) = 164.45 + 2.67A[1] + 6.31A[2] + 6.41B - 23.42C + 2.21A[1]B - 3.85A[2]B + 0.47A[1]C + 4.66A[2]C + 6.10BC - 0.30A[1]BC - 5.37A[2]BC \quad (4.1.5)$$

$$PDI = 0.1100 + 0.0077A[1] - 0.0045A[2] + 0.0065B - 0.0120C + 0.0086A[1]B - 0.0070A[2]B + 0.0078A[1]C + 0.0045A[2]C + 0.0024BC - 0.0083A[1]BC - 0.0031A[2]BC \quad (4.1.6)$$

$$ZP(mV) = -50.52 + 0.81A[1] + 0.76A[2] + 1.86B + 2.94C - 1.02A[1]B + 2.25A[2]B - 1.20BC \quad (4.1.7)$$

ANOVA je pokazala da su generisani fitovani modeli za Z-Ave, PDI i ZP visoko značajni ($p < 0,0001$ za F vrednosti modela), sa neznačajnim *lack of fit* ($p > 0,01$; moglo da se računa jedino za ZP) i visokim vrednostima za R^2 , prilagođeni R^2 i prihvatljivu preciznost (engl. *adequate precision*) (Z-Ave: 0,9982; 0,9966; 76,229; PDI: 0,9280; 0,8620; 14,028; ZP: 0,9388; 0,9120; 18,78; respektivno), što potvrđuje da su tri navedena odgovora dobro opisana predloženim modelima.

Uticaj ispitivanih faktora i njihovih interakcija na prosečnu veličinu kapi (Z-Ave) nanoemulzija prikazan je u vidu Pareto dijagrama na slici 4.1.5a. Što je p vrednost manja, ili, drugim rečima, vrednost koeficijenta veća, veći je odgovarajući efekat na

odgovor. Sa slike se može videti da su na veličinu kapi nanoemulzija značajno uticali svi ispitivani faktori ($p < 0,0001$), i to sledećim redosledom: HPH metod (C) > vrsta vodene faze (B) > vrsta koemulgatora (A). Pored toga, utvrđeno je da su interakcije između ovih faktora (vrsta koemulgatora/vrsta vodene faze – AB; vrsta koemulgatora/HPH metod – AC; vrsta vodene faze/HPH metod – BC) takođe imale značajan ($p < 0,0001$) uticaj na Z-Ave nanoemulzija, pri čemu je interakcija BC imala najizraženiji efekat.

Negativan predznak ispred koeficijenta koji odgovara HPH postupku u [jednačini \(4.1.5\)](#) označava antagonistički efekat na Z-Ave, što znači da je veličina kapi nanoemulzija izrađenih na 50°C (topli postupak HPH) bila manja u poređenju sa nanoemulzijama izrađenim na 25°C (hladni postupak HPH). Ovo se može objasniti time da je veći unos energije tokom procesa homogenizacije pri povećanju temperature proizvodnje sa 25°C na 50°C prouzrokovao smanjenje viskoziteta, kao i međupovršinskog napona, što, kako se očekuje, olakšava nastajanje manjih kapi ([Floury i sar., 2000](#)). [Jednačina \(4.1.5\)](#) dalje otkriva pozitivan uticaj vrste vodene faze na Z-Ave nanoemulzija: utvrđeno je da manja veličina kapi korelira sa PBS, dok vodena faza koja sadrži natrijum-oleat (SOS) daje nanoemulzije sa većim veličinama kapi. Veoma različit trend uticaja na Z-Ave pokazao je izbor koemulgatora ([tabela 4.1.2](#)): mada je izgledalo da SHS15 daje nanoemulzije sa manjim kapima, uticaj vrste koemulgatora na veličinu kapi nanoemulzija mogao se bolje razumeti kroz interpretaciju značajnih dvofaktorskih interakcija.

Analiziranjem AB interakcije ([slika 4.1.6](#)) jasno se može videti da prilikom izrade na nižoj temperaturi (hladni HPH postupak), nije bilo razlike u veličini kapi nanoemulzija kostabilizovanih različitim koemulgatorima (P80, PL188, SHS15), kada je PBS upotrebljen kao vodena faza. U slučaju nanoemulzija izrađenih sa SOS kao vodenom fazom, Z-Ave nanoemulzija koje su sadržale SHS15 kao koemulgator bio je niži od Z-Ave nanoemulzija kostabilizovanih sa P80 i PL188, koje su pak imale sličnu veličinu kapi. Pored toga, kada je SOS korišćen umesto PBS, Z-Ave P80- i PL188-kostabilizovanih nanoemulzija imao je tendenciju blagog porasta, dok je u slučaju SHS15-nanoemulzija dobijen niži Z-Ave ([slika 4.1.6](#)). Na višoj temperaturi homogenizacije (topli HPH postupak), upotreba SOS umesto PBS kao vodene faze dovela je do povećanja Z-Ave svih nanoemulzija, nezavisno od tipa upotrebljenog koemulgatora ([slika 4.1.6](#)). Kada se uporedi uticaj vrste koemulgatora na Z-Ave

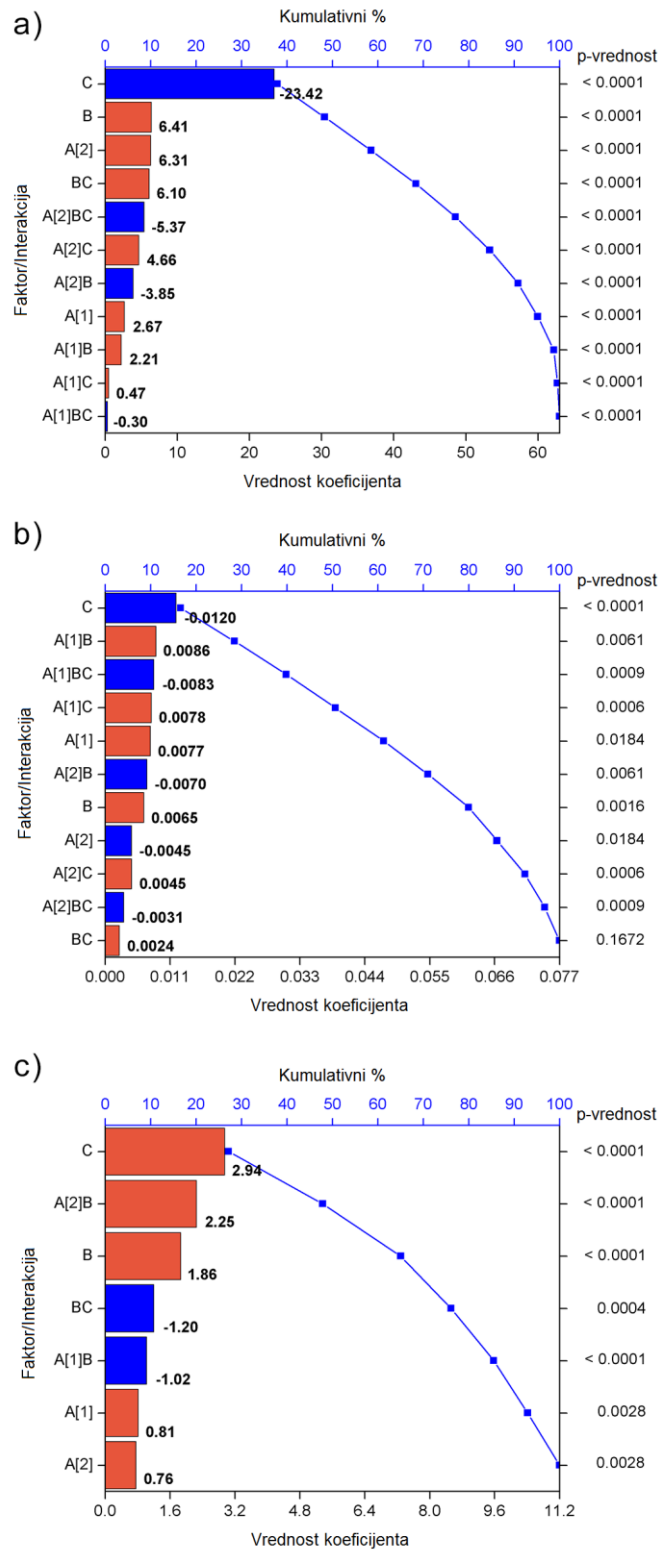
nanoemulzija izrađenih na 50°C sa PBS kao vodenom fazom, može se primetiti da PL188 daje nanoemulzije sa većim kapima, dok je manja veličina kapi dobijena sa P80 i SHS15 kao koemulgatorima. Suprotno, kada je SOS korišćen kao vodena faza, Z-Ave P80- i PL188-nanoemulzija bio je sličan i veći od veličine kapi SHS15-nanoemulzija. Isti trendovi u pogledu Z-Ave nanoemulzija mogli su se takođe zapaziti analiziranjem efekata AC i BC interakcija ([slika 4.1.6](#)).

Da bi se dobila informacija o homogenosti veličina nanoemulzionih kapi i, otuda, o kvalitetu izrađenih uzoraka nanoemulzija, procenjena je raspodela veličina kapi (PDI) i njena zavisnost od različitih faktora, a rezultati dobijeni iz procedure fitovanja modela prikazani su u [jednačini \(4.1.6\)](#) i na [slici 4.1.5b](#). Kao što se može videti, PDI nanoemulzija bio je pod značajnim uticajem individualno testiranih promenljivih, kao i njihovih kombinovanih efekata. HPH metod imao je suprotan, ali najveći uticaj na PDI, odnosno na većoj temperaturi homogenizacije dobijene su nanoemulzije sa homogenijim veličinama kapi (niži PDI). Utvrđeno je takođe da je vrsta koemulgatora bila od kritične važnosti za promenu PDI nanoemulzija i, što je još važnije, da jako interaguje sa druga dva faktora, vrstom vodene faze i HPH metodom – AB i AC interakcija, respektivno ([slika 4.1.7](#)).

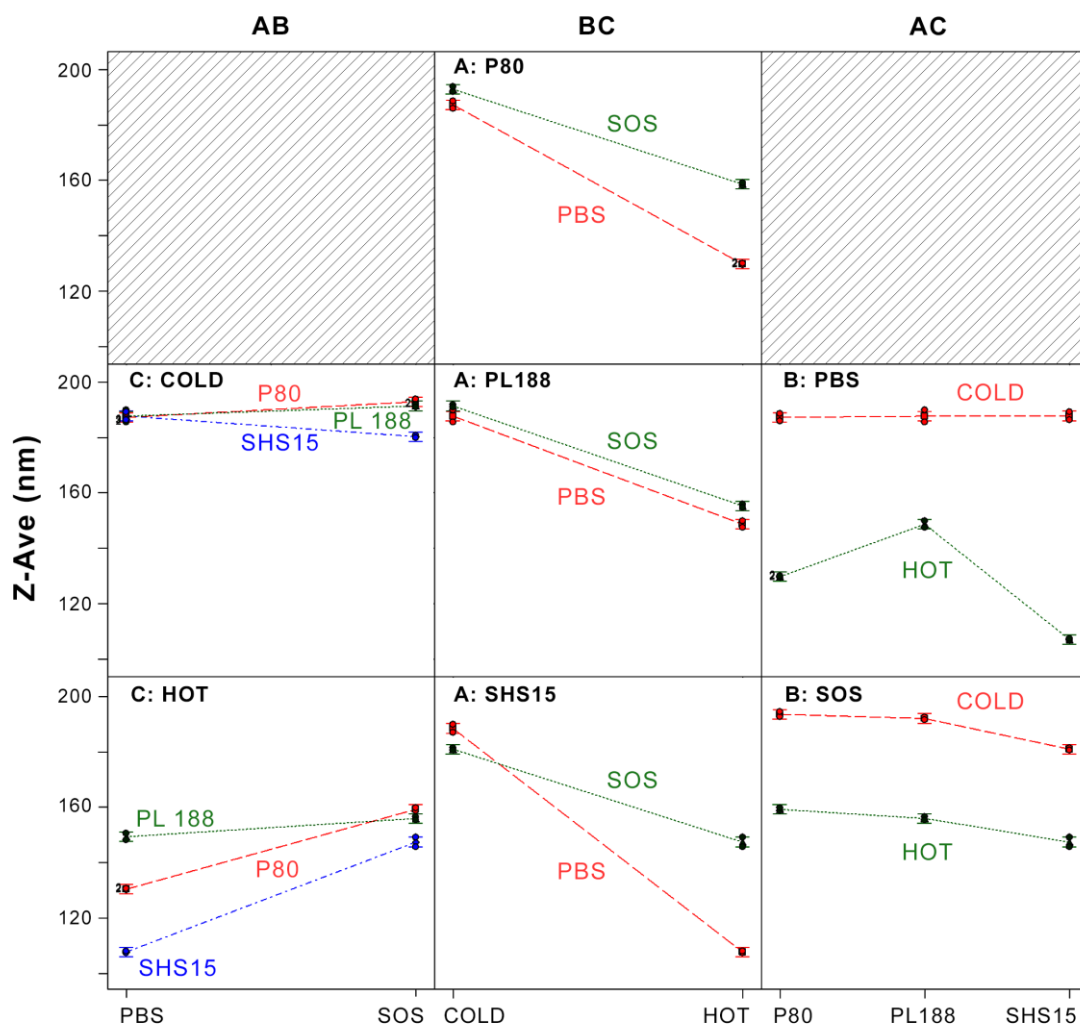
Moglo se primetiti da je u slučaju nanoemulzija koje su sadržale PBS kao vodenu fazu, vrsta koemulgatora uticala na PDI nanoemulzija prateći trend $PDI_{P80} < PDI_{PL188} < PDI_{SHS15}$ i $PDI_{P80} > PDI_{PL188} > PDI_{SHS15}$, za nanoemulzije izrađene hladnim i toplim HPH postupkom, respektivno. Nasuprot tome, kada je SOS upotrebljen kao vodena faza, izgledalo je da P80 daje nanoemulzije sa najvećim PDI, dok su nanoemulzije izrađene sa PL188 imale najniže vrednosti PDI ($PDI_{P80} > PDI_{SHS15} > PDI_{PL188}$), nezavisno od temperature izrade ([slika 4.1.7](#)). Štaviše, kada je kao vodena faza korišćen SOS umesto PBS na nižoj temperaturi izrade (hladni HPH), uočena je tendencija porasta PDI kod nanoemulzija na bazi P80, suprotno od nanoemulzija sa SHS15 kod kojih je PDI imao težnju da opada, dok nije bilo razlike u PDI nanoemulzija kostabilizovanih sa PL188. S druge strane, upotreba SOS umesto PBS na višoj temperaturi homogenizacije (topli HPH) rezultovala je heterogenijim veličinama kapi kod P80- i SHS15-nanoemulzija, dok se PDI PL188-nanoemulzija samo neznatno smanjio ([slika 4.1.7](#)). Kada je PBS korišćen kao vodena faza, povećanje temperature homogenizacije sa 25°C na 50°C indukovalo je povećanje PDI nanoemulzija

zasnovanih na P80, dok se PDI PL188- i SHS15-nanoemulzija smanjio; variranje postupka izrade bilo je najefektivnije u promeni PDI nanoemulzija sa SHS15 kao koemulgatorom. Međutim, u slučaju SOS-nanoemulzija, promena temperature sa 25°C na 50°C dovela je do smanjenja PDI svih nanoemulzija, nezavisno od upotrebljenog koemulgatora (slika 4.1.7).

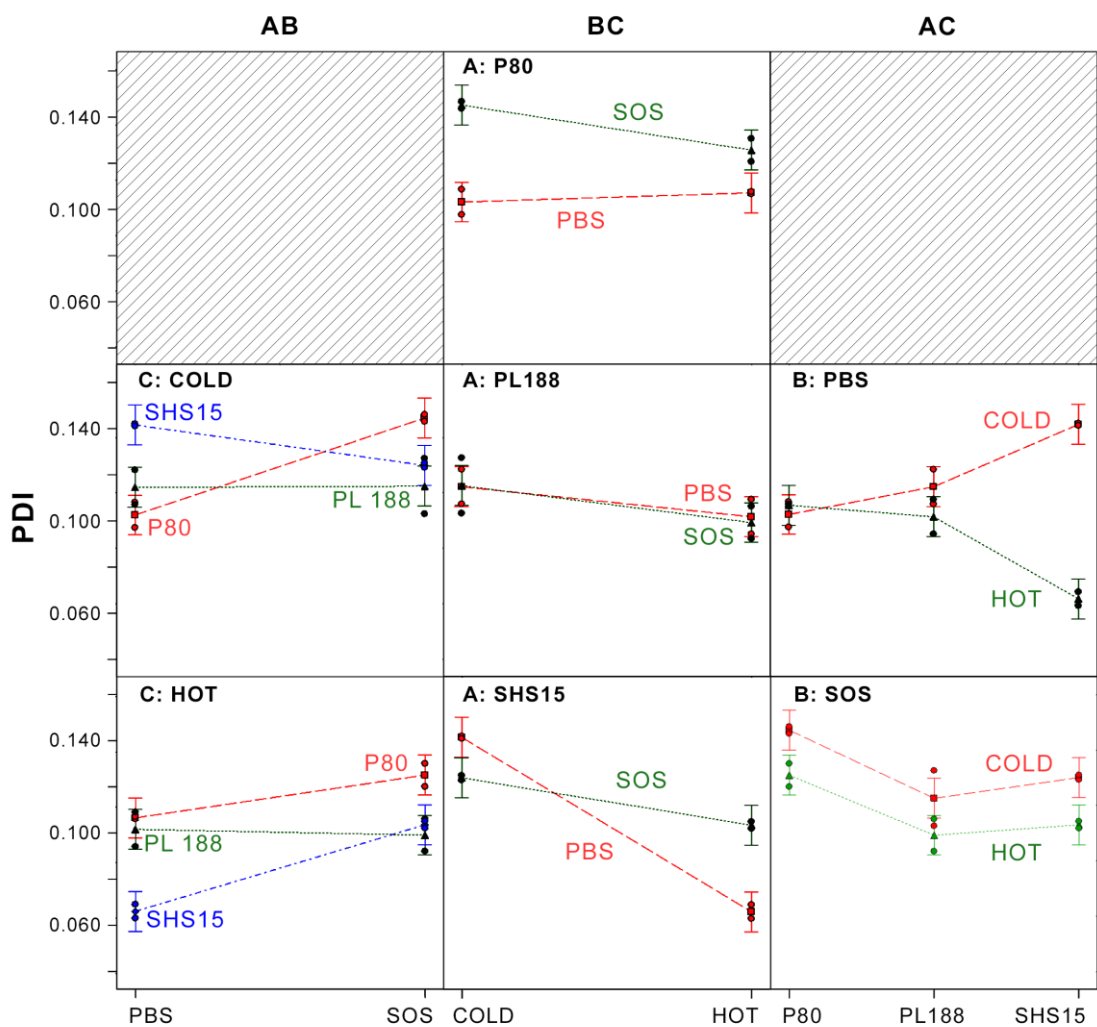
Kada se posmatra ZP, slika 4.1.5c otkriva da su svi ispitivani faktori bili značajni i takođe pozitivni [jednačina (4.1.7)], ispoljavajući linearni opadajući efekat na ZP nanoemulzija. Pored toga, identifikovane su značajne interakcije između vrste koemulgatora i vrste vodene faze (AB) i između vrste vodene faze i HPH metoda (BC), koje su prikazane na slici 4.1.8. Sudeći po vrednostima koeficijenata u jednačini (4.1.7), HPH metod je imao najveći uticaj na ZP nanoemulzija – negativnije ZP vrednosti su dobijene kada je primenjen hladni proces homogenizacije u poređenju sa toplim HPH metodom. Ovo može biti posledica veće veličine kapi nanoemulzija izrađenih na 25°C i, posledično, manje ukupne slobodne površine dostupne za adsorpciju molekula surfaktanata, u poređenju sa formulacijama izrađenim na 50°C. Kao rezultat toga, pri datoj koncentraciji surfaktanata u formulaciji, očekuje se da više molekula surfaktanata bude adsorbovano po jedinici površine u slučaju većih kapi, što dovodi do većeg negativnog naelektrisanja i, otuda, negativnijih vrednosti ZP (cf. Verma i sar., 2009). Interakcije faktora prikazane na slici 4.1.8 idu u prilog pređašnjim nalazima. Očigledno je da se ZP svih nanoemulzija izrađenih bilo sa PBS ili SOS kao vodenom fazom, u kombinaciji sa bilo kojim od tri koemulgatora (P80, PL188 ili SHS15), smanjio kada je HPH metod promenjen sa hladnog na topli, pri čemu je redukcija ZP bila najizraženija kod nanoemulzija sa PBS. Takođe, niže vrednosti ZP dobijene su kod svih nanoemulzija izrađenih hladnim HPH metodom kada je umesto PBS, SOS upotrebljen kao vodena faza. U slučaju toplog HPH postupka, ZP nanoemulzija kostabilizovanih sa P80 i SHS15 se povećao (postao je negativniji), dok se kod formulacija na bazi PL188 smanjio, kada je SOS upotrebljen umesto PBS (slika 4.1.8).



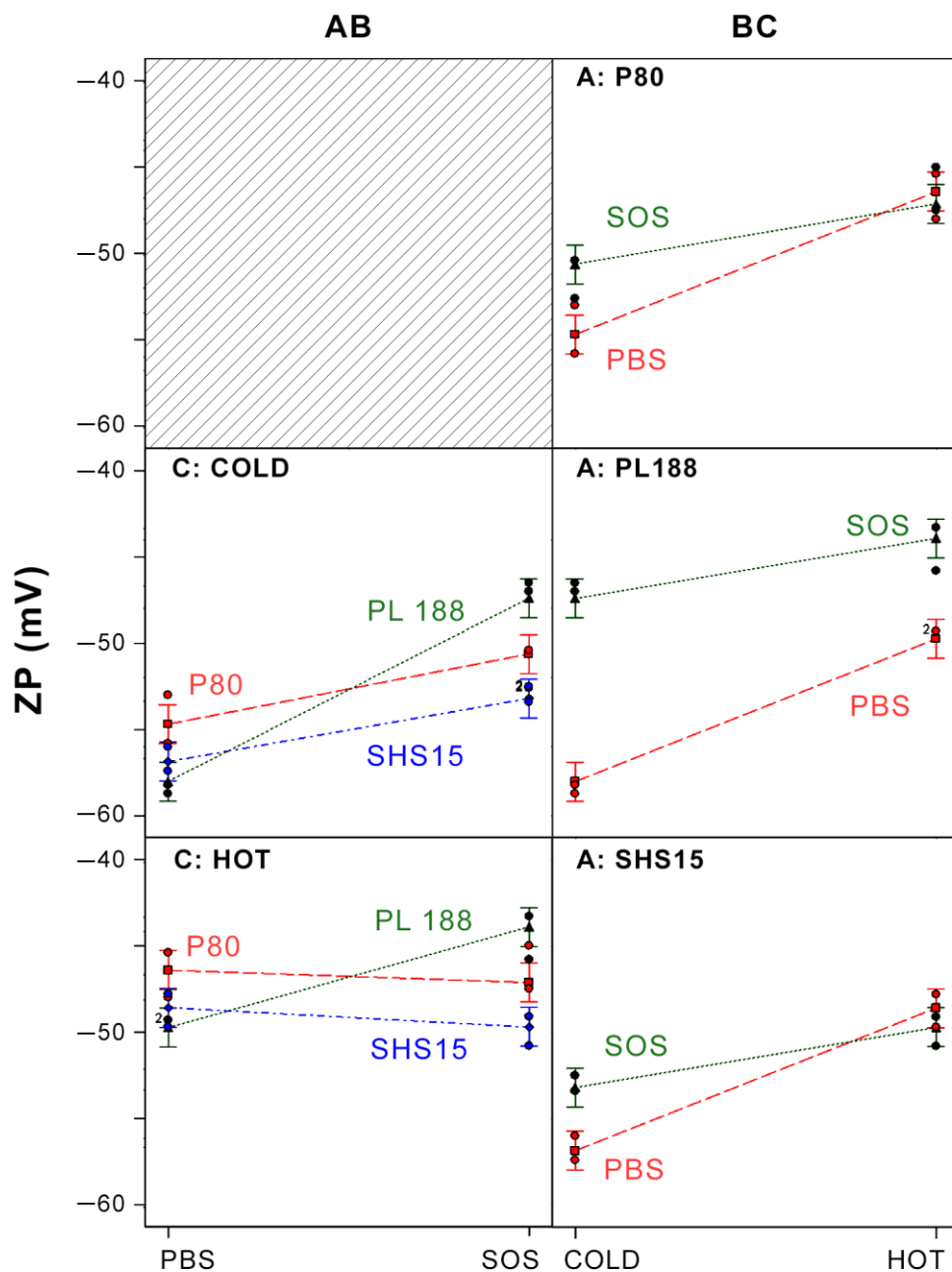
Slika 4.1.5. Pareto dijagrami za prosečnu veličinu kapi – Z-Ave (a), indeks polidisperznosti (b), i zeta potencijal (c) dizajniranih nanoemulzija, sa vrednostima koeficijenta i p vrednostima za ispitivane promenljive – A: vrsta koemulgatora; B: vrsta vodene faze; C: metod homogenizacije pod visokim pritiskom.



Slika 4.1.6. Dijagrami interakcija koji prikazuju prosečnu veličinu kapi (Z-Ave) dizajniranih nanoemulzija na različitim kombinacijama nivoa faktora – A: vrsta koemulgatora; B: vrsta vodene faze; C: metod homogenizacije pod visokim pritiskom.



Slika 4.1.7. Dijagrami interakcija koji prikazuju indeks polidisperznosti (PDI) dizajniranih nanoemulzija na različitim kombinacijama nivoa faktora – A: vrsta koemulgatora; B: vrsta vodene faze; C: metod homogenizacije pod visokim pritiskom.



Slika 4.1.8. Dijagrami interakcija koji prikazuju zeta potencijal (ZP) dizajniranih nanoemulzija na različitim kombinacijama nivoa faktora – A: vrsta koemulgatora; B: vrsta vodene faze; C: metod homogenizacije pod visokim pritiskom.

4.1.3. Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija dizajniranih prema punom faktorskom i generalnom faktorskom dizajnu

Stabilnost nanoemulzija je složeno pitanje i zavisi od brojnih faktora kao što su sastav formulacije, metod izrade, uslovi čuvanja (pr. temperatura, svetlost) (Klang i Valenta, 2011). Ako se obezbedi odgovarajuća pH vrednost sistema, emulzije stabilizovane fosfolipidima mogu biti relativno stabilne pod ambijentalnim uslovima; rok upotrebe komercijalno dostupnih parenteralnih emulzija obično iznosi dve godine (Wu, 2007). U cilju odabira optimalnih formulacija nanoemulzija kao obećavajućih nosača slabo rastvorljivih psihofarmakoloških lekovitih supstanci, uzorci nanoemulzija izrađeni prema shemi punog faktorskog (tabela 3.4) i generalnog faktorskog dizajna (tabela 3.5) podvrgnuti su proceni preliminarnе stabilnosti, praćenjem promena u fizičko-hemijskim parametrima tokom dva, odnosno četiri meseca čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$, kao i nakon sterilizacije parom (121°C , 15 min) (tabele 4.1.1 i 4.1.2).

Veličina kapi i površinsko naelektrisanje smatraju se najreprezentativnijim parametrima u kontroli stabilnosti nanoemulzija. Povećanje veličine kapi je zapravo prvi indikator nestabilnosti emulzionog sistema (Hippalgaonkar i sar., 2010; Müller i sar., 2012; Tadros i sar., 2004). Na osnovu analize veličine (Z-Ave) i raspodele veličina kapi (PDI) može se zaključiti da su sve ispitivane nanoemulzije formulisane sa sojinim lecitinom, bez i sa diazepamom kao model lekovitim supstancom, bile fizički stabilne nakon dva meseca čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$, bez značajnih promena u navedenim parametrima (tabela 4.1.1). Nasuprot tome, prazne nanoemulzije izrađene sa lecitinom iz jajeta pokazale su značajno povećanje veličine kapi od oko 20–50 nm (*t*-test, $p < 0,05$), dok se veličina kapi nanoemulzija sa inkorporiranom model lekovitim supstancom nije značajno promenila tokom vremena (tabela 4.1.1), što ukazuje da je stabilnost nanoemulzija potencijalno poboljšana inkorporiranjem diazepamama. LD rezultati potvrdili su nalaze dobijene PCS metodom; prisustvo većih kapi (iznad 1 μm) uočeno je jedino kod nanoemulzije sa lecitinom iz jajeta, bez lekovite supstance, koja je sadržala 20% uljane faze (slika 4.1.1). Treba, međutim, napomenuti da su tokom ispitivanog perioda sve formulacije nanoemulzija (sa sojinim lecitinom i lecitinom iz jajeta, sa i bez lekovite supstance, sa 20 i 30% uljane faze) zadržale PDI vrednosti manje od 0,15, što ukazuje na relativno homogenu raspodelu kapi i potvrđuje da nije došlo do značajnog procesa agregacije u ispitivanim sistemima (tabela 4.1.1).

U prilog navedenim nalazima idu i rezultati merenja ZP (tabela 4.1.1). Kao što je već objašnjeno, veliko površinsko naelektrisanje kapi smatra se jednim od ključnih parametara u održavanju stabilnosti nanoemulzija. Brojni faktori kao što su pH, jonska jačina, vrsta i koncentracija emulgatora, i prisustvo elektrolita mogu da utiču na ZP emulzionog sistema (Hippalgaonkar i sar., 2010). Nakon dva meseca čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$, vrednosti ZP svih nanoemulzija stabilizovanih sojinim lecitinom bile su gotovo nepromenjene (tabela 4.1.1). Nasuprot tome, kod svih formulacija sa lecitinom iz jajeta došlo je do značajnog povećanja ZP (negativnije vrednosti) (t -test, $p < 0,05$; tabela 4.1.1), verovatno kao posledica oslobađanja slobodnih masnih kiselina usled hidrolize lecitina i triglicerida iz uljane faze. Formiranje lizolecitina i slobodnih masnih kiselina se isto tako smatra odgovornim i za uočeno značajno smanjenje pH vrednosti istih nanoemulzija tokom čuvanja (t -test, $p < 0,05$; tabela 4.1.1) (Baspinar i sar., 2010; Wu, 2007). Takođe, kod svih nanoemulzija zapaženo je smanjenje električne provodljivosti (tabela 4.1.1), pri čemu nije bilo znakova inverzije faza. Dodatno, rezultati dobijeni reološkom analizom pokazuju da je nakon dva meseca čuvanja kod svih ispitivanih nanoemulzija došlo do povećanja viskoziteta (tabela 4.1.1); povećanje je bilo veće kod nanoemulzija stabilizovanih lecitinom iz jajeta i značajno (t -test, $p < 0,05$) za formulacije sa 30% uljane faze.

Ukratko, konstantne ZP vrednosti i gotovo nepromenjena veličina kapi tokom praćenog perioda ukazuju da su nanoemulzije izrađene sa sojinim lecitinom bile robusnije i stabilnije od nanoemulzija sa lecitinom iz jajeta, što je kasnije uticalo na izbor sojinog lecitina kao glavnog emulgatora za izradu nanoemulzija kako sa diazepamom, tako i sa risperidonom, kao model lekovitim supstancama.

Kada su pak u pitanju placebo nanoemulzije izrađene prema generalnom faktorskom dizajnu, variranjem vrste vodene faze, vrste koemulgatora i postupka izrade, podaci dobijeni iz studija stabilnosti (tabela 4.1.2) pokazuju da su kod gotovo svih ispitivanih neautoklaviranih uzoraka Z-Ave, PDI i ZP – ključni parametri u kontroli stabilnosti emulzija – ostali praktično nepromenjeni tokom četiri meseca čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Značajno povećanje veličine kapi od oko 40–50 nm (t -test, $p < 0,05$) utvrđeno je jedino kod nanoemulzija formulisanih sa PBS kao vodenom fazom i SHS15 kao koemulgatorom, nezavisno od postupka izrade, pri čemu prilikom vizuelne provere nisu uočene kapi slobodnog ulja niti odvajanje faza. Iz tabele 4.1.2 se takođe može videti da

je fizička stabilnost svih nanoemulzija izrađenih sa PBS kao vodenom fazom bila značajno kompromitovana autoklaviranjem. Tako je kod nanoemulzija kostabilizovanih sa P80, a koje su sadržale PBS, došlo do potpunog razdvajanja faza usled energijom-indukovane koalescencije kapi. Kod nanoemulzija kostabilizovanih sa PL188 zapažene su značajne promene (*t*-test, $p < 0,05$) u parametrima stabilnosti: povećanje Z-Ave, smanjenje PDI i povećanje apsolutnih ZP vrednosti. Kod nanoemulzija sa SHS15 detektovano je pak značajno smanjenje Z-Ave i PDI nakon autoklaviranja, ali se veličina kapi značajno povećala tokom vremena (*t*-test, $p < 0,05$). Suprotno od formulacija sa PBS, sve ispitivane nanoemulzije koje su sadržale SOS kao vodenu fazu, nezavisno od vrste koemulgatora ili postupka izrade, bile su praktično nepromenjene nakon autoklaviranja u pogledu Z-Ave, PDI i ZP, a vrednosti ovih parametara ostale su stabilne tokom četiri meseca čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Otuda se može pretpostaviti da je stabilnost ispitivanih nanoemulzija na toplotni stres tokom sterilizacije parom, verovatno potmognuta prisustvom natrijum-oleata koji, pored održavanja pH vrednosti, može i da poveća negativno naelektrisanje na površini kapi, doprinoseći tako elektrostatičkoj stabilizaciji nanoemulzije (Werling i sar., 2008).

Dodatne informacije o stabilnosti nanoemulzija tokom čuvanja i toplotne sterilizacije dobijene su iz procene promena u pH vrednosti i električnoj provodljivosti ispitivanih uzoraka nanoemulzija tokom posmatranog perioda (tabela 4.1.2). Kod većine nanoemulzija došlo je do značajnog smanjenja pH (*t*-test, $p < 0,05$) tokom čuvanja i autoklaviranja, ali su vrednosti i dalje bile između 7 i 8, reflektujući fiziološku kompatibilnost i pogodnost za parenteralnu primenu. Što se električne provodljivosti tiče, zapažene su male ali značajne promene u vidu povećanja ili smanjenja (*t*-test, $p < 0,05$) u funkciji vremena i autoklaviranja, međutim, nije uočena korelacija između promene ovog parametra i nestabilnosti nanoemulzija. Dakle, rezultati ispitivanja stabilnosti su potvrdili da su vrsta vodene faze i vrsta koemulgatora faktori koji utiču na stabilnost nanoemulzija. Posmatranjem svih parametara stabilnosti zajedno može se zaključiti da su nanoemulzije izrađene sa natrijum-oleatom u vodenoj fazi (SOS) bile robusnije i stabilnije od onih sa PBS, te se mogu smatrati obećavajućim nosačima za parenteralnu isporuku slabo rastvorljivih lekova.

4.2. Rezultati i diskusija druge faze eksperimentalnog rada

4.2.1. Nanoemulzije sa inkorporiranom model lekovitom supstancom dobijene variranjem udela uljane faze i tipa koemulgatora – fizičko-hemijska karakterizacija i procena dugoročne stabilnosti

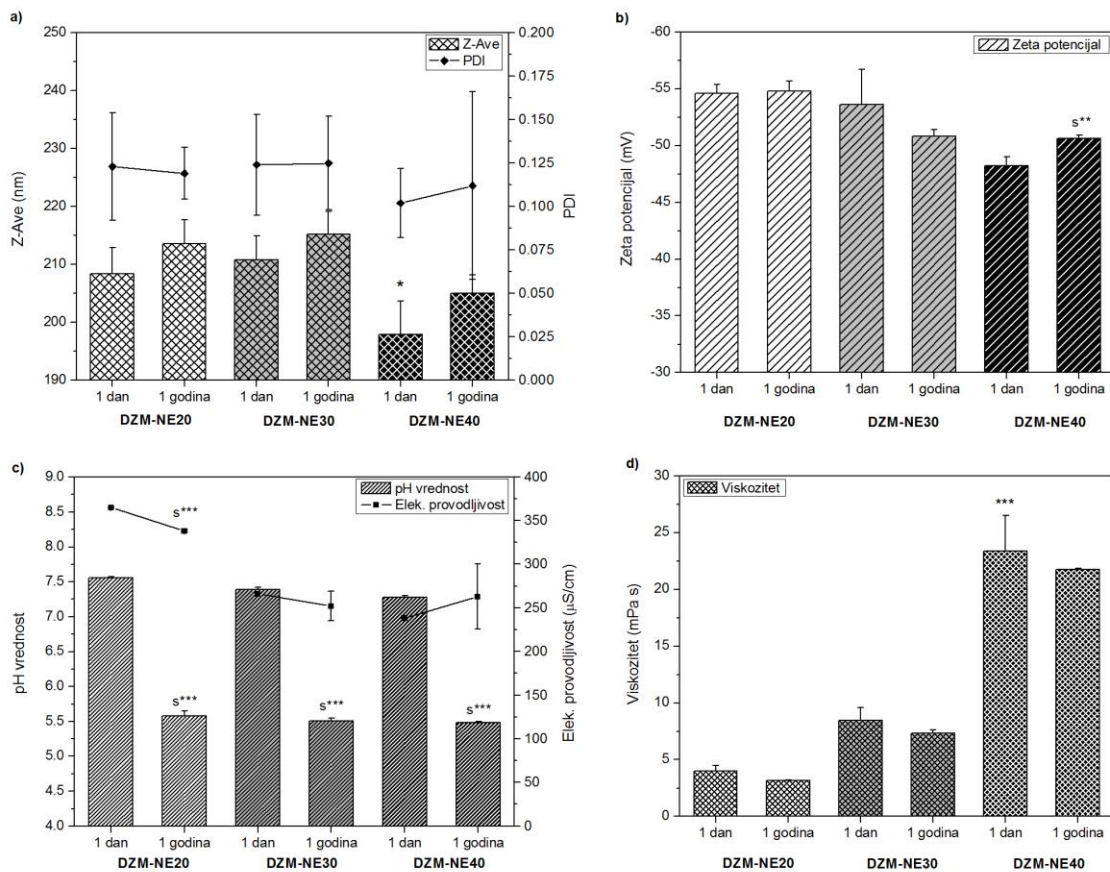
4.2.1.1. Nanoemulzije diazepama dobijene variranjem udela uljane faze

U cilju procene mogućnosti razvoja parenteralnih nanoemulzija sa većim kapacitetom za inkorporiranje lekovite supstance, oslanjajući se na rezultate punog faktorskog dizajna i sprovedenih studija kratkoročne stabilnosti (tabela 4.1.1), metodom HPH na hladno (500 bar, 25°C, 9 ciklusa) izrađene su odabrane formulacije nanoemulzija sa lekovitom supstancom, stabilizovane kombinacijom lecitina i P80, variranjem sadržaja uljane faze na 20%, 30% i 40%. Diazepam, referentni benzodiazepin koji se uobičajeno koristi u prekliničkim ispitivanjima novih psihofarmakoloških lekova, inkorporiran je u nanoemulzije kao model lipofilne, u vodi slabo rastvorljive lekovite supstance. Sve nanoemulzije izrađene su sa smešom MCT i sojinog ulja u odnosu 4:1 kao uljanom fazom, fosfatnim puferom (PBS 0,01 M, pH 8) kao vodenom fazom, dok su sojin lecitin i P80 u odnosu 1:1 upotrebljeni kao emulgatori, pri čemu je maseni odnos uljane faze i emulgatora u svim formulacijama bio konstantan (5:1) (tabela 4.2.1). U istraživanju je praćen uticaj rastuće koncentracije uljane faze na veličinu i raspodelu veličina kapi, površinsko naelektrisanje, viskozitet i stabilnost razvijenih nanoemulzija tokom godinu dana čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}/55 \pm 5\% \text{ RH}$, a dobijeni rezultati prikazani su na slici 4.2.1.

Tabela 4.2.1. Sastav razvijenih nanoemulzija diazepama sa rastućom koncentracijom uljane faze (20%, 30% i 40%)

Formulacije nanoemulzija	Sastav (% m/m)							
	Uljana faza					Vodena faza		
	DZM	MCT	Sojino ulje	LS75	BHT	P80	Glicerol	PBS do
DZM-NE20	0,2	16,0	4,0	2,0	0,05	2,0	2,5	100,0
DZM-NE30	0,2	24,0	6,0	3,0	0,05	3,0	2,5	100,0
DZM-NE40	0,2	32,0	8,0	4,0	0,05	4,0	2,5	100,0

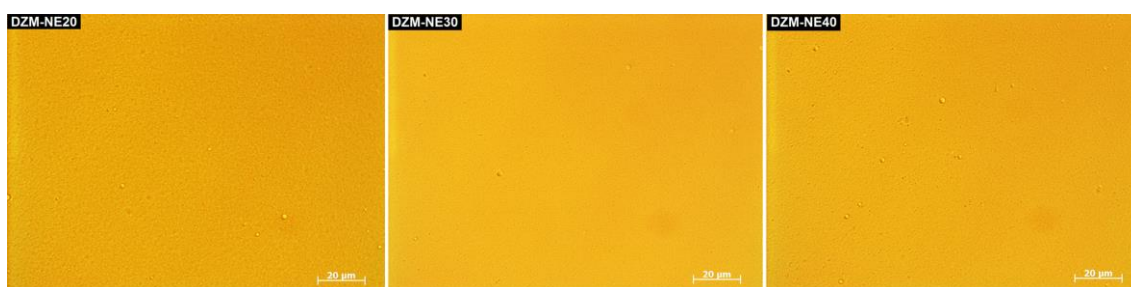
DZM: diazepam; MCT: trigliceridi srednje dužine lanca; LS75: sojin lecitin; BHT: butilhidroksitoluen; P80: polisorbata 80; PBS: fosfatni pufer (0,01 M, pH 8,0).



Slika 4.2.1. Reprezentativni fizičko-hemijski parametri parenteralnih nanoemulzija diazepama sa 20% (DZM-NE20), 30% (DZM-NE30) i 40% (DZM-NE40) uljane faze jedan dan nakon izrade i nakon godinu dana čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (srednja vrednost \pm standardna devijacija, $n = 3$); * $p < 0,05$ za DZM-NE40 vs. DZM-NE30 jedan dan nakon izrade (ANOVA, $F_{(2,6)} = 6,324$, $p = 0,027$); *** $p < 0,001$ za DZM-NE40 vs. DZM-NE20 i DZM-NE30 jedan dan nakon izrade (ANOVA, $F_{(2,6)} = 80,69$, $p < 0,001$); ^{S**} $p < 0,01$; ^{S***} $p < 0,001$ (t -test), u poređenju sa istim uzorkom jedan dan nakon izrade.

Kao što se može videti na slikama 4.2.1a i 4.2.1b, sve tri formulacije nanoemulzija diazepama sa 20–40% uljane faze imale su, jedan dan nakon izrade, malu prosečnu veličinu kapi (Z-Ave 206 ± 7 nm), sa relativno uskom raspodelom veličina (PDI $0,116 \pm 0,012$) i vrenostima ZP oko -50 mV, u skladu sa zahtevima za parenteralni put primene. Da bi se detektovalo eventualno prisustvo male frakcije kapi većih od $1 \mu\text{m}$, kao dodatna metoda za procenu veličine kapi primenjena je svetlosna mikroskopija. Slika 4.2.2 prikazuje primere mikrografija nanoemulzija diazepama sa 20%, 30% i 40% uljane faze, na kojima se može videti svega nekoliko većih kapi u opsegu od $2 \mu\text{m}$ do 4

μm , pri čemu je njihov broj sličan za sve tri ispitivane nanoemulzije, što ukazuje na zadovoljavajući kvalitet za parenteralnu primenu (Müller i sar., 2012) kako nanoemulzije sa 20% ulja, tako i nanoemulzija sa većim sadržajem uljane faze (30% i 40%). Imajući dalje u vidu da intravenska primena viskoznih sistema može biti udružena sa bolom (Jumaa i Müller, 1998b), mali prividni viskozitet ispitivanih nanoemulzija diazepama od $12 \pm 9 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, (slika 4.2.1d), kao i pH vrednost od $7,4 \pm 0,1$ (slika 4.2.1c), dodatno potvrđuju pogodnost razvijenih nanoemulzija sa 20%, 30% i 40% uljane faze za parenteralnu primenu i isporuku slabo rastvorljivih lekovitih supstanci.



Slika 4.2.2. Svetlosne mikrografije nanoemulzija diazepama sa sadržajem uljane faze od 20% (DZM-NE20), 30% (DZM-NE30) i 40% (DZM-NE40), pod uveličanjem $400\times$.

Dobro je poznato da parametri formulacije (vrsta i koncentracija ulja i emulgatora), parametri procesa izrade (temperatura, pritisak, i broj ciklusa homogenizacije), kao i inkorporiranje lekovite supstance u unutrašnju, uljanu fazu nanoemulzije, mogu značajno da utiču na fizičko-hemijska svojstva i stabilnost nanoemulzionog sistema (Benita i Levy, 1993; Hippalgaonkar i sar., 2008; Klang i Valenta, 2011). Tako se sa povećanjem udela uljane faze može povećati solubilizacioni kapacitet nanoemulzije za lipofilne lekovite supstance. Međutim, što je veća koncentracija ulja, očekuje se veća veličina kapi nanoemulzije (Hippalgaonkar i sar., 2008; Jumaa i Müller, 1998b). S tim u vezi, kod parenteralnog puta primene treba biti posebno obazriv, odnosno osigurati da prosečna veličina kapi, kao i udeo većih kapi u nanoemulzijama sa većim sadržajem uljane faze ($> 20\%$) budu u skladu sa farmakopejskim zahtevima (USP 39).

Rezultati pokazuju da je prosečna veličina kapi razvijenih nanoemulzija diazepama sa različitim sadržajem uljane faze ostala manje ili više ista, nezavisno od koncentracije uljane faze, odnosno zapaženo je neznatno, mada statistički značajno (ANOVA, $F_{(2,6)} =$

6,324; $p = 0,031$) smanjenje prosečne veličine kapi pri povećanju koncentracije ulja sa 30% na 40% (slika 4.2.1a). Pošto su sve nanoemulzije izrađene pod istim uslovima (500 bar, 25°C, 9 ciklusa), ista količina energije primenjena je na veću količinu uljane faze koja treba da bude dispergovana, te bi se teorijski moglo očekivati da se veličina kapi poveća sa povećanjem sadržaja uljane faze (Müller i sar., 2012). Međutim, pokazano je da ako se maseni odnos emulgatora/stabilizatora i dispergovane, uljane faze drži konstantnim, tj. ako se sa povećanjem koncentracije uljane faze povećava i koncentracija emulgatora, onda u sistemu dolazi do smanjenja međupovršinskog napona i nastanka manjih kapi (Tadros i sar., 2004). Ovo zapažanje delimično je potvrđeno u sprovedenom istraživanju (slika 4.2.1a). Dodatno, nije bilo statistički značajne razlike u pogledu PDI i ZP između nanoemulzija sa različitom koncentracijom uljane faze (slike 4.2.1a i 4.2.1b).

Na slici 4.2.1d mogu se videti promene prividnog viskoziteta kao ograničavajućeg faktora injektabilnosti razvijenih nanoemulzija za parenteralnu primenu diazepama, u funkciji koncentracije uljane faze. Naime, povećanje koncentracije uljane faze sa 20% na 30% dovelo je do značajnog povećanja viskoziteta nanoemulzije, koji je postao još veći sa povećanjem koncentracije ulja na 40% (ANOVA, $F_{(2,6)} = 6,324$; $p < 0,001$). Međutim, ove vrednosti viskoziteta su i dalje dovoljno niske, što se verovatno može objasniti malom veličinom kapi u nanometarskom opsegu (Müller i sar., 2012), da se dobijene nanoemulzije mogu primeniti parenteralnim putem.

Nakon godinu dana čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$, tri ispitivane nanoemulzija diazepama sa rastućom koncentracijom uljane faze, bile su fizički stabilne u pogledu Z-Ave, PDI, ZP i viskoziteta, bez značajnih promena u navedenim parametrima (slike 4.2.1a, 4.2.1b i 4.2.1d). Jedino su kod nanoemulzije sa 40% uljane faze (DZM-NE40) zabeležene nešto negativnije vrednosti ZP u odnosu na vrednosti dobijene jedan dan nakon izrade (t -test, $p < 0,01$). Ovako visoke negativne vrednosti ZP potvrđuju, dakle, dobru fizičku stabilnost razvijenih parenteralnih nanoemulzija diazepama. Slika 4.2.1c pokazuje promene pH vrednosti i električne provodljivosti nanoemulzija diazepama u toku čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Kod svih formulacija došlo je do značajnog opadanja pH vrednosti u funkciji vremena čuvanja (t -test, $p < 0,001$), što je verovatno posledica oslobađanja slobodnih masnih kiselina usled hidrolize lecitina i triglicerida iz uljane faze. Takođe, kod svih nanoemulzija zapažene su izvesne promene u električnoj provodljivosti, sa

statistički značajnom razlikom jedino kod nanoemulzije sa 20% uljane faze (DZM-NE20) (t -test, $p < 0,001$), pri čemu nije bilo znakova inverzije faza.

4.2.1.2. Nanoemulzije risperidona dobijene variranjem tipa koemulgatora

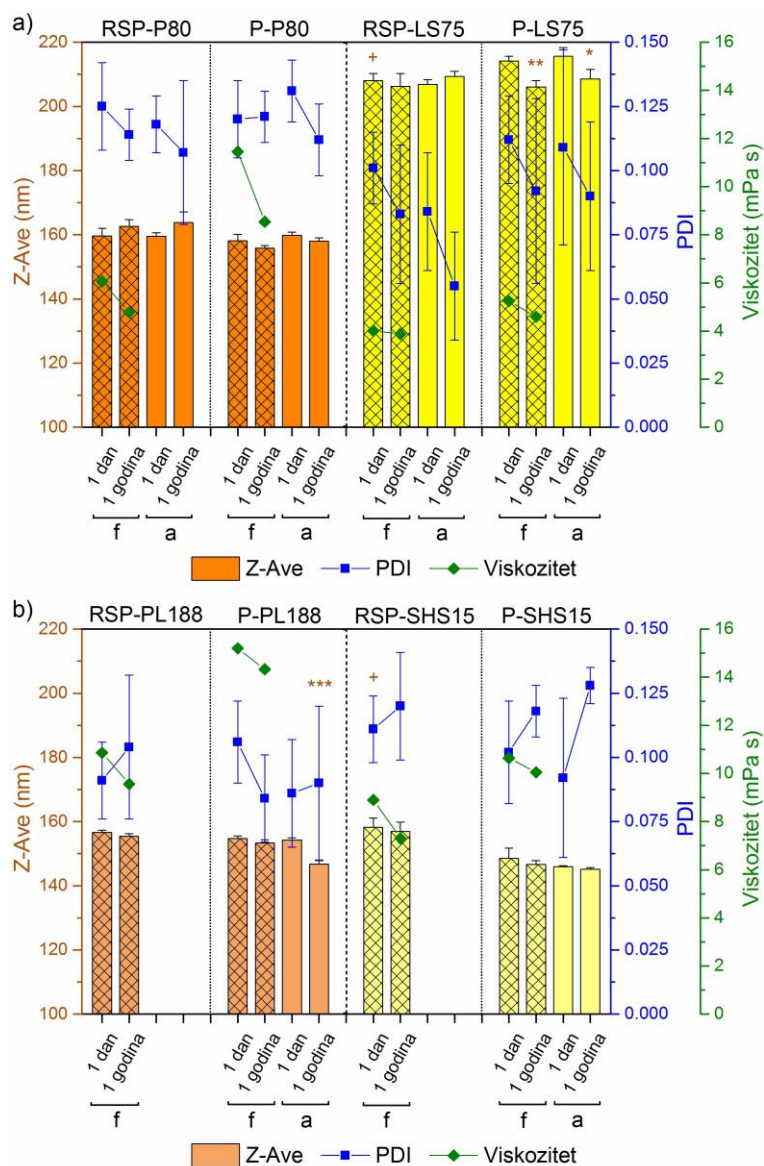
Sudbina leka u organizmu (engl. *in vivo fate*) određena je ne samo osobinama lekovite supstance, kao što su veličina molekula, naelektrisanje i lipofilnost, nego, u značajnom stepenu, i osobinama samog sistema za isporuku leka. Kada su u pitanju parenteralne nanoemulzije kao nosači lekovitih supstanci, prepoznato je, i generalno prihvaćeno, da između fizičko-hemijskih osobina nanoemulzije (veličina kapi, naelektrisanje, hidrofobnost), profila adsorpcije proteina plazme (engl. *plasma protein adsorption pattern*; proteini plazme adsorbovani na površini kapi nanoemulzije nakon systemske primene), i posledične distribucije u različite organe, postoji međusobna veza (Keck i sar., 2013; Wasan i sar., 2007). Ovo ukazuje na to da se modifikacijom fizičko-hemijskih osobina nanoemulzije, naročito kroz promene u sastavu međupovršinskog filma emulgatora/stabilizatora, ili dodatak specifičnog koemulgatora, može značajno izmeniti profil adsorbovanja proteina plazme i, otuda, biodistribucija nanoemulzije, kao i izvesna specifičnost prema ciljnom organu.

Na osnovu podataka o polimernim i čvrstim lipidnim nanočesticama (Blasi i sar., 2013; Dhawan i sar., 2011; Martins i sar., 2012), pretpostavljeno je da bi i nanoemulzije sa veličinom kapi u opsegu 100–200 nm mogle imati produženo vreme cirkulacije u krvi i otuda potencijalno duže vreme kontakta sa KMB, te mogućnost preuzimanja endocitozom od strane moždanih kapilarnih endotelnih ćelija, praćenu bilo oslobađanjem lekovite supstance i njenom difuzijom u mozak, ili transcitozom nanokapi sa inkorporiranom lekovitom supstancom kroz sloj endotelnih ćelija u mozak (Kreuter, 2001; Kreuter, 2005). Uglavnom, nanoemulzije sa prosečnom veličinom kapi manjom od 200 nm, uskom raspodelom veličina ($PDI < 0,15$) i dovoljno visokim negativnim površinskim naelektrisanjem (oko -50 mV) (tabela 4.1.2) dobijene su u okviru eksperimentalnog prostora generalnog faktorskog dizajna primenjenog u ovoj disertaciji, tj. za sve koemulgator/vodena faza kombinacije, na obe ispitivane temperature homogenizacije (tabela 3.5). Kako su u pogledu fizičko-hemijskih osobina sve dizajnirane nanoemulzije bile pogodne za isporuku leka u mozak, optimalne formulacije za inkorporiranje lekovite supstance odabrane su u funkciji najmanje

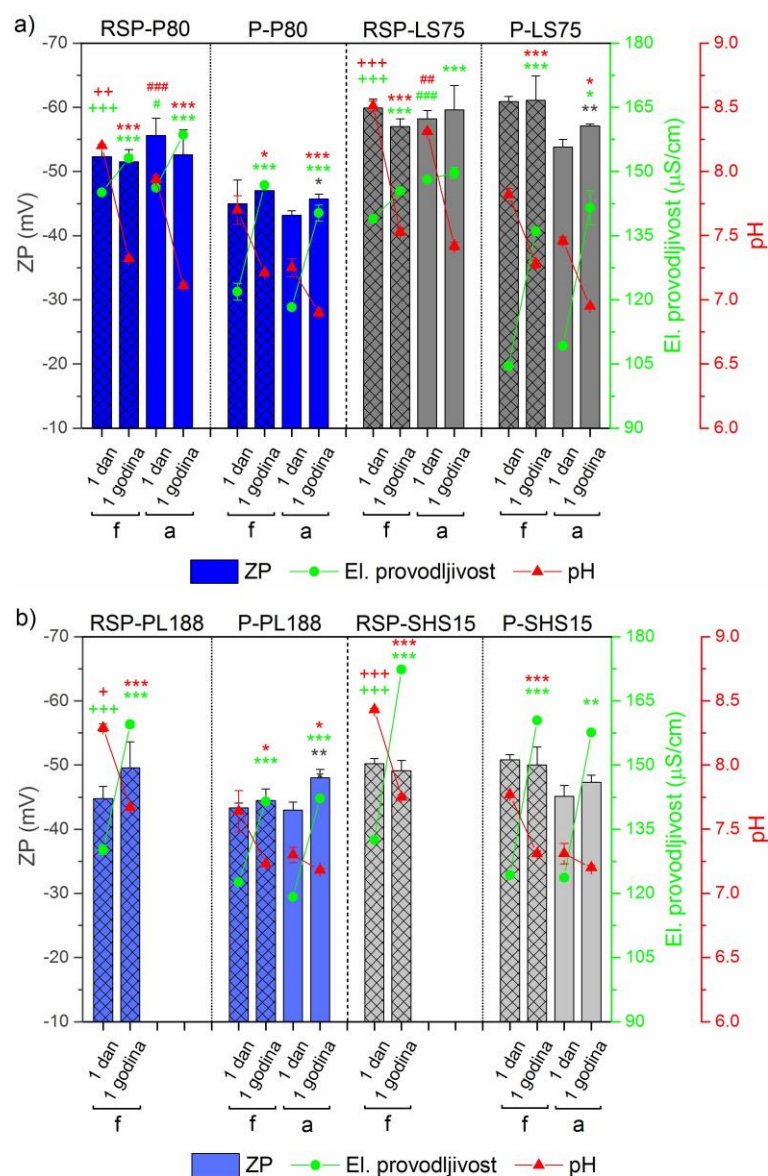
veliĉine kapi, najmanje distribucije veliĉina i najbolje stabilnosti tokom najmanje ĉetiri meseca ĉuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$, kao i nakon sterilizacije parom. Dodatno, znajuĉi da hemija površine ĉestica moŹe imati prevlast nad veliĉinom kapi i površinskim naelektrisanjem u odreĉivanju prolaska kroz KMB (Voigt i sar., 2014), kao relevantan faktor u odabiru praznih nanoemulzija u koje ĉe biti inkorporirana lekovita supstanca, vrsta koemulgatora je takoĉe uzeta u obzir.

U tri formulacije nanoemulzija koje su najviše obećavale, a koje su sadržale SOS kao vodenu fazu i razlikovale se samo po tipu koemulgatora (P80, PL188 ili SHS15), inkorporiran je risperidon (1 mg/g), dobro ispitan i kliniĉki dokazan atipični antipsihotik, kao model u vodi slabo rastvorljive psihofarmakološke lekovite supstance. Ovako formulisane nanoemulzije risperidona (RSP-P80, RSP-PL188, RSP-SHS15; [tabela 3.2](#)) izraĉene su toplim HPH postupkom i sprovedena je njihova sveobuhvatna procena. Pored odabranih nanoemulzija, stabilizovanih kombinacijom lecitina i odgovarajućeg koemulgatora, istim postupkom izraĉena je i kontrolna nanoemulzija risperidona (1 mg/g), takoĉe na bazi lecitina, ali bez dodatog koemulgatora (RSP-LS75, [tabela 3.2](#)). Fiziĉko-hemijske karakteristike (veliĉina kapi, PDI, ZP, viskozitet, pH i elektriĉna provodljivost) opisanih nanoemulzija sa risperidonom (RSP-P80, RSP-PL188, RSP-SHS15, RSP-LS75), kao i odgovarajućih nanoemulzija bez lekovite supstance (P-P80, P-PL188, P-SHS15, P-LS75), jedan dan nakon izrade, nakon godinu dana ĉuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$, kao i nakon sterilizacije parom, sumirane su na [slikama 4.2.3–4.2.5](#). Kao što se moŹe videti, sve izraĉene nanoemulzije risperidona odlikovale su se fiziĉko-hemijskim parametrima pogodnim za parenteralnu primenu (Z-Ave 171 ± 23 nm; PDI $0,11 \pm 0,02$; ZP – 52 ± 6 mV; pH $8,4 \pm 0,2$; i prividni viskozitet 7 ± 3 mPa·s). Dodatna analiza veliĉine kapi LD metodom potvrdila je da su dijometri kapi nanoemulzija risperidona bili u nanometarskom opsegu ($d(0.5)$ oko 170 nm, $d(0.99)$ 190–220 nm), bez ĉestica iznad 1 μm , potvrĉujući dalje njihovu pogodnost za parenteralnu primenu i isporuku leka u mozak. U prilog navedenim nalazima govore i rezultati dobijeni polarizacionom mikroskopijom; sa mikrografija prikazanih na [slici 4.2.6](#) moŹe se videti odsustvo većih mikrometarskih kapi, agregata kapi ili kristala lekovite supstance u uzorcima risperidon-nanoemulzija stabilizovanih lecitinom odnosno kombinacijom lecitina i P80, PL188 ili SHS15 kao koemulgatora.

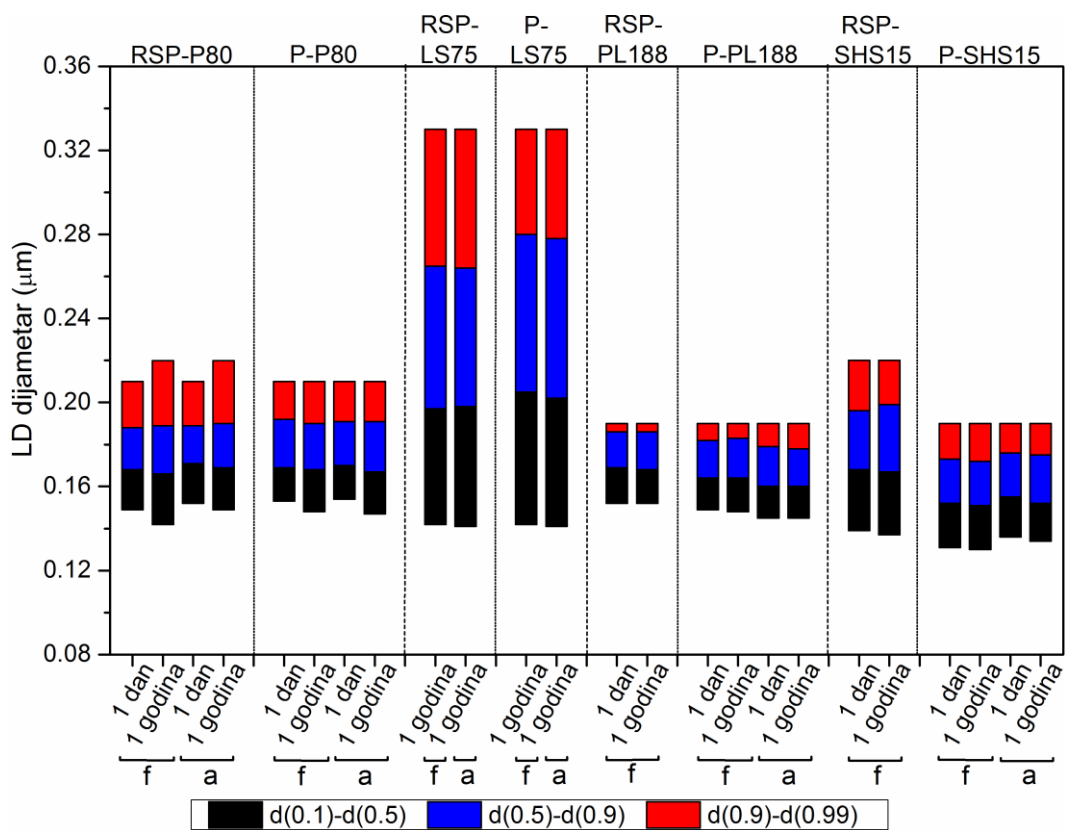
Poređenjem sa odgovarajućim placebo nanoemulzijama može se uočiti da inkorporiranje risperidona nije značajno izmenilo veličinu kapi, raspodelu veličina i površinsko naelektrisanje nanoemulzija stabilizovanih smešom lecitina i različitih koemulgatora, sa jednim izuzetkom (slike 4.2.3 i 4.2.4): prosečna veličina risperidon-nanoemulzije stabilizovane smešom lecitin/SHS15 (RSP-SHS15) bila je malo (oko 10 nm), ali značajno (t -test, $p < 0,05$) veća od odgovarajuće prazne formulacije (P-SHS15), što je ukazivalo na to da je risperidon, verovatno najvećim delom, lokalizovan u uljanom jezgru nanoemulzije. S druge pak strane, prosečna veličina kapi kontrolne nanoemulzije (RSP-LS75) bila je neznatno, mada značajno (t -test, $p < 0,05$) manja u poređenju sa placebo formulacijom (P-LS75) (slika 4.2.3a). Pored toga, moglo se primetiti da je risperidon značajno (t -test, $p < 0,05$) doprineo većoj pH vrednosti, većoj električnoj provodljivosti i nižem viskozitetu (slike 4.2.3 i 4.2.4), što može biti povezano sa eventualnim prisustvom određenog broja molekula leka na ulje–voda međupovršini nanoemulzija. U pogledu stabilnosti, utvrđeno je da su sve ispitivane nanoemulzije risperidona bile stabilne nakon godinu dana čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sa minimalnim varijacijama u izmerenim fizičko-hemijskim parametrima.



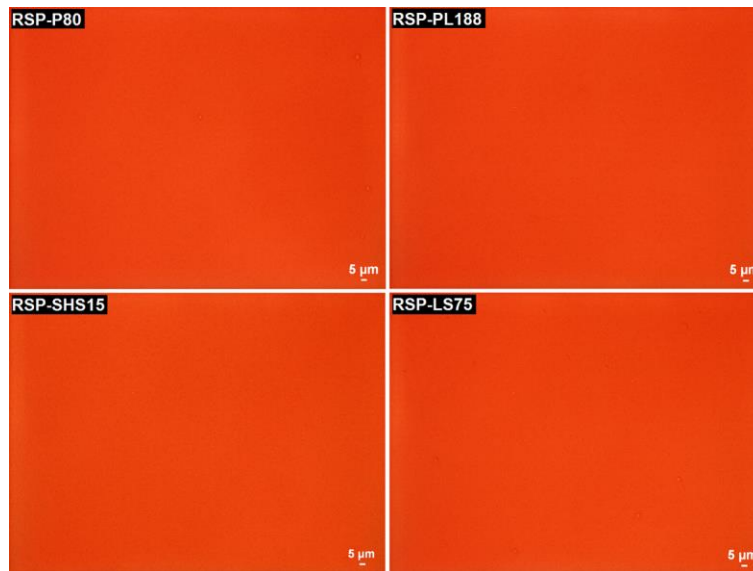
Slika 4.2.3. Prosečna veličina kapi (Z-Ave), indeks polidisperznosti (PDI) i prividni viskozitet optimizovanih nanoemulzija risperidona (RSP-P80, RSP-PL188, RSP-SHS15, RSP-LS75) i odgovarajućih placebo nanoemulzija (P-P80, P-PL188, P-SHS15, P-LS75) jedan dan nakon izrade i nakon godinu dana čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (srednja vrednost \pm standardna devijacija, $n = 3$); f: uzorak nanoemulzije filtriran kroz $0,22\text{-}\mu\text{m}$ filter; a: uzorak nanoemulzije sterilisan parom (u autoklavu, 121°C , 15 min); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ (t -test), u poređenju sa istim uzorkom jedan dan nakon izrade; + $p < 0,05$ (t -test), u poređenju sa odgovarajućim placebo uzorkom jedan dan nakon izrade.



Slika 4.2.4. Zeta potencijal (ZP), pH vrednost i električna provodljivost optimizovanih nanoemulzija risperidona (RSP-P80, RSP-PL188, RSP-SHS15, RSP-LS75) i odgovarajućih placebo nanoemulzija (P-P80, P-PL188, P-SHS15, P-LS75) jedan dan nakon izrade i nakon godinu dana čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (srednja vrednost \pm standardna devijacija, $n = 3$); f: uzorak nanoemulzije filtriran kroz $0,22\text{-}\mu\text{m}$ filter; a: uzorak nanoemulzije sterilisan parom, u autoklavu (121°C , 15 min); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ (t -test), u poređenju sa istim uzorkom jedan dan nakon izrade; # $p < 0,05$; ### $p < 0,01$ i ### $p < 0,001$ (t -test), u poređenju sa filtriranim uzorkom jedan dan nakon izrade; + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$ i +++ $p < 0,001$ (t -test), u poređenju sa odgovarajućim placebo uzorkom jedan dan nakon izrade.



Slika 4.2.5. LD dijimetri nanoemulzija risperidona (RSP-P80, RSP-PL188, RSP-SHS15, RSP-LS75) i odgovarajućih placebo nanoemulzija (P-P80, P-PL188, P-SHS15, P-LS75) jedan dan nakon izrade i nakon godinu dana čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$; f: uzorak nanoemulzije filtriran kroz $0,22\text{-}\mu\text{m}$ filter; a: uzorak nanoemulzije sterilisan parom (u autoklavu, 121°C , 15 min).



Slika 4.2.6. Svetlosne mikrografije nanoemulzija risperidona stabilizovanih lecitinom u kombinaciji sa različitim vrstama koemulgatora – polisorbatom 80 (RSP-P80), poloksamerom 188 (RSP-PL188) i Solutolom HS 15 (RSP-SHS15), i kontrolne nanoemulzije stabilizovane lecitinom, bez koemulgatora (RSP-LS75), pod uveličanjem 400×.

Podaci prikazani na slikama 4.2.3a i 4.2.4a jasno pokazuju da proces sterilizacije parom (u autoklavu) nije doveo do narušavanja fizičke stabilnosti nanoemulzija risperidona stabilizovanih lecitinom ili smešom lecitina i P80 (RSP-LS75 i RSP-P80, respektivno); relevantni parametri stabilnosti, naime, prosečna veličina kapi, homogenost veličina i površinsko naelektrisanje, bili su praktično nepromenjeni u poređenju sa uzorcima filtriranim kroz 0,22- μm filter, i što je još važnije, nisu detektovane značajne promene u navedenim parametrima ni nakon godinu dana čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Analiza veličine kapi sprovedena PCS (slika 4.2.3) i LD metodama (slika 4.2.4) potvrdila je da su tokom jednogodišnjeg perioda čuvanja, dijametri kapi svih ispitivanih uzoraka nanoemulzija sa risperidonom, kako filtriranih tako i autoklaviranih, ostali u nanometarskom opsegu (Z-Ave 160–210 nm, d(0.5) 166–198 nm, d(0.99) 190–330 nm), sa relativno uskom raspodelom veličina (PDI < 0,15), i bez prisustva čestica iznad 1 μm , što dodatno potvrđuje pogodnost razvijenih nanoemulzija za parenteralnu primenu i isporuku lekova u mozak.

Pored toga, nakon godinu dana čuvanja, ispitivane probe, filtrirane i autoklavirane, nanoemulzija risperidona zadržale su visoke negativne vrednosti ZP u opsegu od -50 mV do -63 mV (slika 4.2.4), reflektujući dovoljno veliko negativno površinsko naelektrisanje za repulziju kapi i, time, poboljšanu stabilnost nanoemulzionih sistema. Takođe, utvrđeno je da su svi filtrirani uzorci nanoemulzija risperidona bili stabilni u pogledu viskoziteta, pokazujući samo neznatno smanjenje ovog parametra nakon godinu dana čuvanja (slika 4.2.3). Nasuprot tome, pH svih ispitivanih nanoemulzija risperidona značajno se smanjio (t -test, $p < 0,05$; slika 4.2.4) tokom čuvanja i autoklaviranja, ali su vrednosti i dalje bile između 7 i 8, što potvrđuje njihovu pogodnost za parenteralnu primenu. Takođe, kod svih nanoemulzija risperidona zapaženo je slabo, ali značajno (t -test, $p < 0,05$), povećanje električne provodljivosti u funkciji vremena čuvanja i autoklaviranja (slika 4.2.4), pri čemu nije bilo korelacije između promene ovog parametra i nestabilnosti nanoemulzija. Ako se pak pogledaju placebo nanoemulzije, nakon godinu dana čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$ mogu se videti manje promene u praćenim fizičko-hemijskim parametrima, koje prate slične trendove kao kod odgovarajućih nanoemulzija sa inkorporiranim risperidonom (slike 4.2.3–4.2.5).

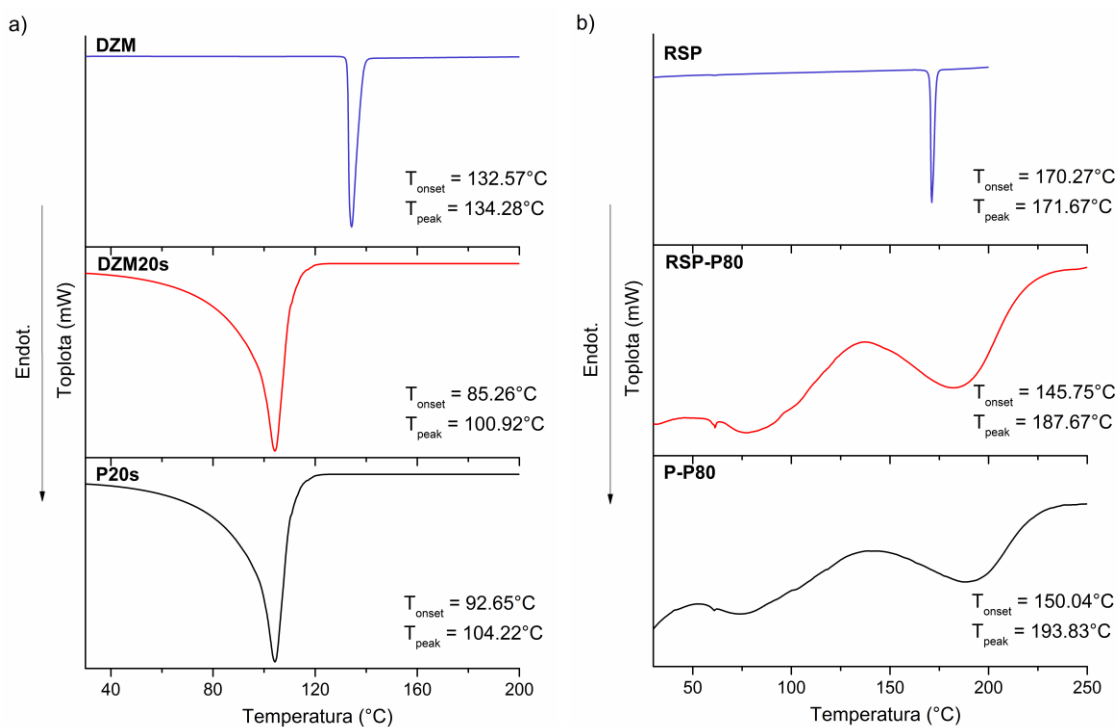
Konačno, uzimajući u obzir sve parametre stabilnosti, može se zaključiti da se nanoemulzije risperidona (kao i njihova placebo) stabilizovane lecitinom, samostalno ili u kombinaciji sa različitim koemulgatorima – P80, PL188, SHS15, a koje sadrže natrijum-oleat kao puferski agens i dodatni stabilizator, mogu lako filtrirati pod aseptičnim uslovima, kao i sterilisati parom, pri čemu su dobijene probe robusne i stabilne tokom najmanje godinu dana čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (studija stabilnosti je još u toku), što ukazuje na mogućnost industrijske proizvodnje razvijenih formulacija nanoemulzija risperidona.

4.2.2. Interakcije lek–nosač i karakterizacija nanoemulzija primenom tehnika DSC, FT-IR i AFM

Efekat inkorporiranja lekovite supstance na termalno ponašanje i strukturalna svojstva razvijenih formulacija nanoemulzija, kao i potencijalne interakcije između inkorporirane model lekovite supstance i drugih komponenata nanoemulzija, ispitivani su primenom DSC tehnike. DSC termogrami dobijeni za model lekovite supstance (diazepam i

risperidon) i odabrane nanoemulzije stabilizovane smešom sojinog lecitina i P80, bez i sa inkorporiranim model lekovitom supstancom, prikazani su na [slici 4.2.7](#).

DSC termogram diazepama ([slika 4.2.7a](#)) pokazuje oštar, endotermni pik na 134,28°C koji odgovara topljenju lekovite supstance. Na DSC termogramu odabrane nanoemulzije diazepama, kao i odgovarajuće placebo nanoemulzije, zabeležen je, pak, širok, asimetričan, endotermni pik na oko 100°C ([slika 4.2.7a](#)), koji najverovatnije odgovara isparavanju vode iz tečnih uzoraka nanoemulzija. Odsustvo pika koji karakteriše topljenje diazepama na DSC termogramu nanoemulzije sa ovom lekovitom supstancom, upućuje da je diazepam verovatno molekularno dispergovan, odnosno rastvoren u uljanoj fazi nanoemulzije. Kako, međutim, pik koji potiče od isparavanja vode zbog velike entalpije može maskirati druge termalne promene u uzorku, te navesti na pogrešan zaključak o obliku u kome se lekovita supstanca nalazi u nanoemulziji, nativni uzorci nanoemulzija su takođe sušeni na vazduhu, a DSC termalne krive osušenih uzoraka nanoemulzija sa i bez risperidona kao model lekovite supstance, kao i samog risperidona, prikazane su na [slici 4.2.7b](#). Na DSC termogramu risperidona zabeležen je oštar, endotermni pik na 171,67°C koji odgovara topljenju lekovite supstance. Na DSC krivama placebo i nanoemulzije sa risperidonom mogao se, pak, uočiti širok, asimetričan, endotermni pik na oko 190°C, što je najverovatnije posledica isparavanja benzil alkohola. Međutim, pik karakterističan za topljenje risperidona nije detektovan na termogramu nanoemulzije risperidona, što ukazuje da je risperidon verovatno molekularno dispergovan, tj. rastvoren u uljanoj fazi nanoemulzije.

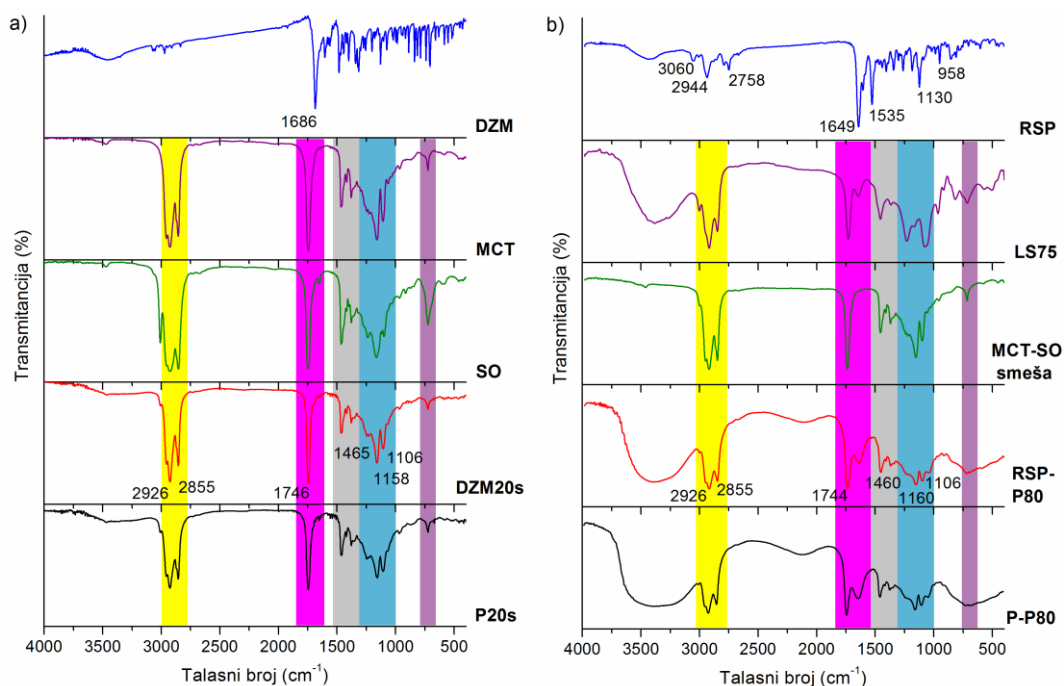


Slika 4.2.7. DSC termogrami diazepama (DZM), odabrane nanoemulzije sa inkorporiranim diazepamom (DZM20s) i odgovarajuće placebo nanoemulzije (P20s) (a); DSC termogrami risperidona (RSP) i odabranih nanoemulzija bez (P-P80) i sa inkorporiranim risperidonom (RSP-P80) (b).

Da bi se upotpunili nalazi dobijeni termalnom analizom i stekao dodatni uvid u moguće intermolekulske interakcije između lekovite supstance i drugih komponenata u nanoemulzionim sistemima i potencijalnu rekristalizaciju inkorporirane model lekovite supstance, kao dodatna metoda karakterizacije primenjena je FT-IR spektroskopija. FT-IR spektri odabranih nanoemulzija sa diazepamom i risperidonom kao model lekovitim supstancama, njihovih odgovarajućih placebo parova, kao i nekih polaznih materijala koji ulaze u sastav nanoemulzija, prikazani su na [slici 4.2.8](#). Na FT-IR spektru diazepama ([slika 4.2.8a](#)) mogu se videti karakteristične apsorpcione trake koje potiču od funkcionalnih grupa prisutnih u strukturi njegovih molekula: C=C istezanje na 1686 cm^{-1} ; istezanje aromatične C=C veze na 1483 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} i 1314 cm^{-1} ; savijanje izvan ravni aromatične C-H veze na 739 cm^{-1} i 707 cm^{-1} ; C-Cl istezanje na 583 cm^{-1} ; simetrično i asimetrično CH₃ istezanje na 2913 cm^{-1} i 2971 cm^{-1} ; simetrične i asimetrične CH₃ deformacione vibracije na 1340 cm^{-1} i 1419 cm^{-1} ; CH₃ uvrtnje na 985 cm^{-1} ; simetrično CH₂ istezanje na 2836 cm^{-1} i CH₂ seckanje na 1442 cm^{-1} ([Neville i](#)

Shurvell, 1990). Na FT-IR spektru risperidona predstavljenom na slici 4.2.8b mogu se uočiti karakteristične apsorpcione trake na 3062 cm^{-1} usled aromatičnog C–H istezanja; 2942 cm^{-1} i 2757 cm^{-1} usled istezanja alifatične C–H veze; 1650 cm^{-1} (oštar pik) što odgovara C=O istezanju aromatičnog ketona; 1612 cm^{-1} i 1535 cm^{-1} koje potiču od C=C istezanja aromatičnog prstena i C–N i C–O ugaonih deformacija oksazolovog prstena; 1448 cm^{-1} usled C=N istezanja; 1415 cm^{-1} usled savijanja alifatične C–H veze; 1351 cm^{-1} što se pripisuje C–N istezanju oksazolovog prstena; 1192 cm^{-1} usled C–N istezanja koje potiče od tercijarnog amina piperidinskog prstena; 1130 cm^{-1} što odgovara C–F istezanju aril fluorida; i trake na 958 cm^{-1} , 862 cm^{-1} i 817 cm^{-1} koje potiču od savijanja aromatične C–H veze (Daniel i sar., 2013; Shukla i sar., 2009).

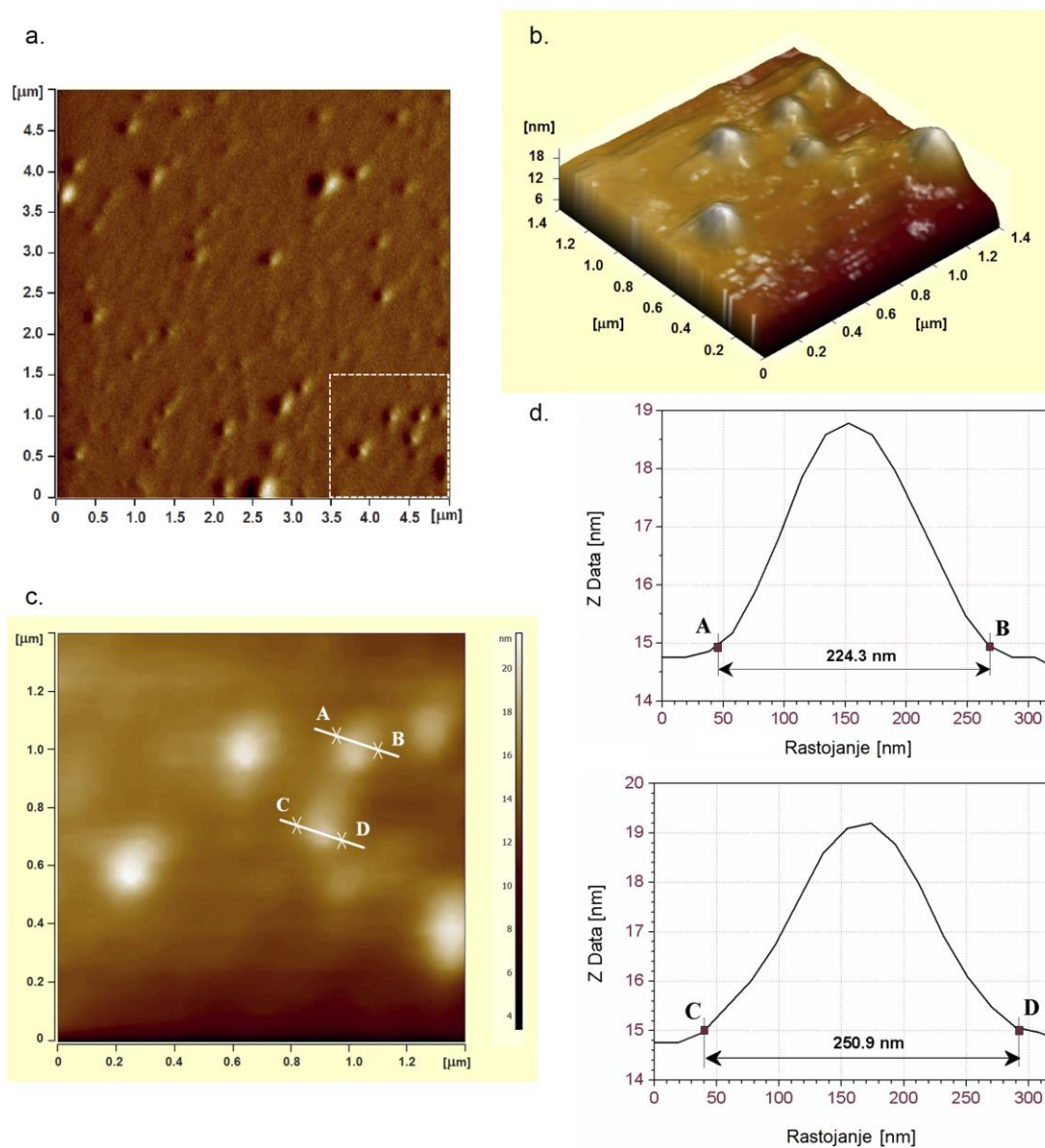
Kada se pogledaju FT-IR spektri odabranih nanoemulzija bez i sa inkorporiranom model lekovitom supstancom (slika 4.2.8), karakteristične vibracione trake zabeležene na oko 2926 cm^{-1} i 2855 cm^{-1} (simetrično i asimetrično CH_2 istezanje), 1746 cm^{-1} odnosno 1744 cm^{-1} (C=O istezanje), 1460 cm^{-1} i 1377 cm^{-1} (CH_2 savijanje), 1158 cm^{-1} odnosno 1160 cm^{-1} (preklopljene vibracije C–O–C i P=O istezanja), 1106 cm^{-1} (P–O–C istezanje) i 726 cm^{-1} (vibracije ljuljanja CH_2 lanca van ravni) mogu se direktno pripisati funkcionalnim grupama prisutnim u MCT, sojinom ulju i lecitinu. Ono što je važnije, na FT-IR spektrima nanoemulzija sa inkorporiranim diazepamom (slika 4.2.8a) ili risperidonom (slika 4.2.8b) nisu zabeleženi specifični pikovi koji odgovaraju lekovitoj supstanci, odnosno opisani pikovi koji potiču od diazepama i risperidona su nestali ili su bili prepokriveni pikovima koji potiču od ulja. Takođe, u poređenju sa FT-IR spektrima odgovarajućih placebo nanoemulzija, na FT-IR spektrima nanoemulzija sa inkorporiranom lekovitom supstancom nisu detektovane nove trake niti je bilo pomeranja postojećih apsorpcionih traka, čime se potvrđuje odsustvo bilo kakve hemijske interakcije između inkorporirane lekovite supstance i drugih komponenata nanoemulzija. Dobijeni rezultati su u potpunoj korelaciji sa rezultatima dobijenim DSC metodom, što ukazuje da su diazepam i risperidon homogeno dispergovani u nanoemulzijama, bez bilo kakve intermolekulske lek–nosač interakcije, ili bilo kakvih naznaka eventualne rekristalizacije inkorporirane model lekovite supstance.



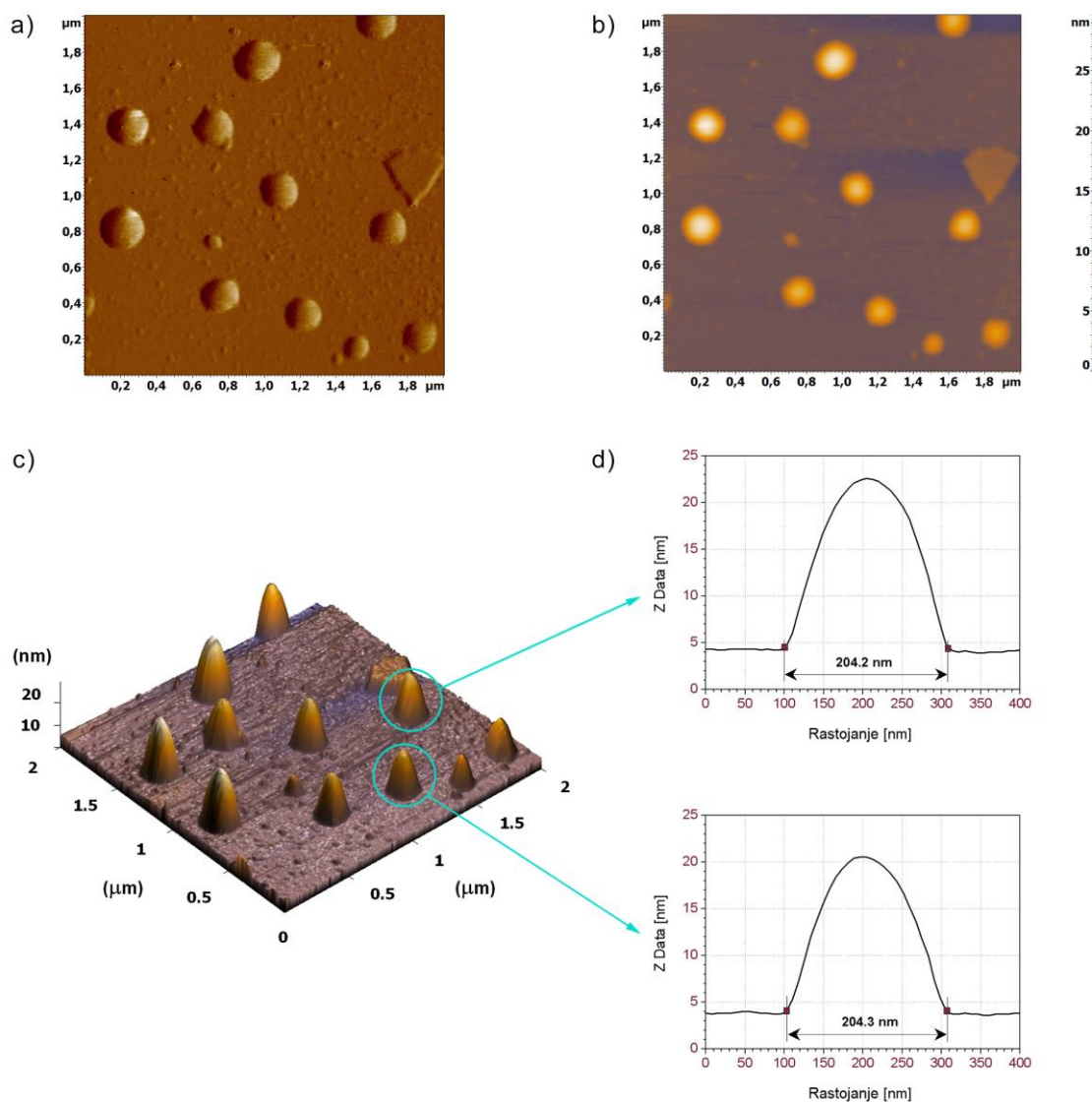
Slika 4.2.8. FT-IR spektri diazepama (DZM), triglicerida srednje dužine lanca (MCT), sojinog ulja (SO), odabrane nanoemulzije diazepama (DZM20s) i odgovarajuće placebo nanoemulzije (P20s) (a); FT-IR spektri risperidona (RSP), sojinog lecitina (LS75), smeše MCT i SO u odnosu 4:1 (MCT–SO smeša), odabrane nanoemulzije risperidona (RSP-P80) i odgovarajuće placebo nanoemulzije (P-P80) (b).

Kako bi se upotpunile informacije o veličini kapi, raspodeli veličina, morfološkim karakteristikama i mogućem procesu agregacije u nanoemulzionim sistemima (Pretz i sar., 2010; Rouzi i sar., 2005; Vitorino i sar., 2011), kao naredni korak u sveobuhvatnoj karakterizaciji razvijenih formulacija nanoemulzija sprovedena je AFM analiza. Slike 4.2.9 i 4.2.10 prikazuju AFM mikrografije – „signal greške“, dvodimenzionalne (2D) i trodimenzionalne (3D) slike topografije – odabranih nanoemulzija sa diazepamom i risperidonom kao model lekovitim supstancama, respektivno. Na slici 4.2.9a predstavljen je „signal greške“ nanoemulzije diazepama (DZM30s) snimljen na površini uzorka od $5 \times 5 \mu\text{m}^2$. Da bi se odredila veličina nanoemulzionih kapi, manja površina uzorka od $1,4 \times 1,4 \mu\text{m}^2$, označena isprekidanim kvadratom na slici 4.2.9a, dalje je analizirana, a 3D i 2D slike topografije ovako odabrane površine uzorka ilustrovane su na slikama 4.2.9b i 4.2.9c, respektivno, dok se profili dve reprezentativne nanokapi mogu videti na slici 4.2.9d. Na slikama 4.2.10a, 4.2.10b i 4.2.10c prikazane su AFM

mikrografije u vidu „signala greške“, 2D topografije i 3D topografije, respektivno, dobijene za površinu od $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ odabranog uzorka nanoemulzije risperidona (RSP-P80), dok su tzv. „profili visine“ dve označene kapi nanoemulzije dati na slici 4.2.10d.



Slika 4.2.9. AFM slike odabrane nanoemulzije diazepama (DZM30s): „signal greške“ na $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ površine uzorka (a), 3D topografija $1,4 \times 1,4 \mu\text{m}^2$ površine uzorka označene isprekidanim kvadratom (b), 2D topografija (c), i „profili visine“ dve odabrane nanoemulziona kapi (d).



Slika 4.2.10. AFM slike odabrane nanoemulzije risperidona (RSP-P80): „signal greške“ na $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ površine uzorka (a), 2D topografija (b), 3D topografija (c), i „profili visine“ dve odabrane nanoemulzione kapi (d).

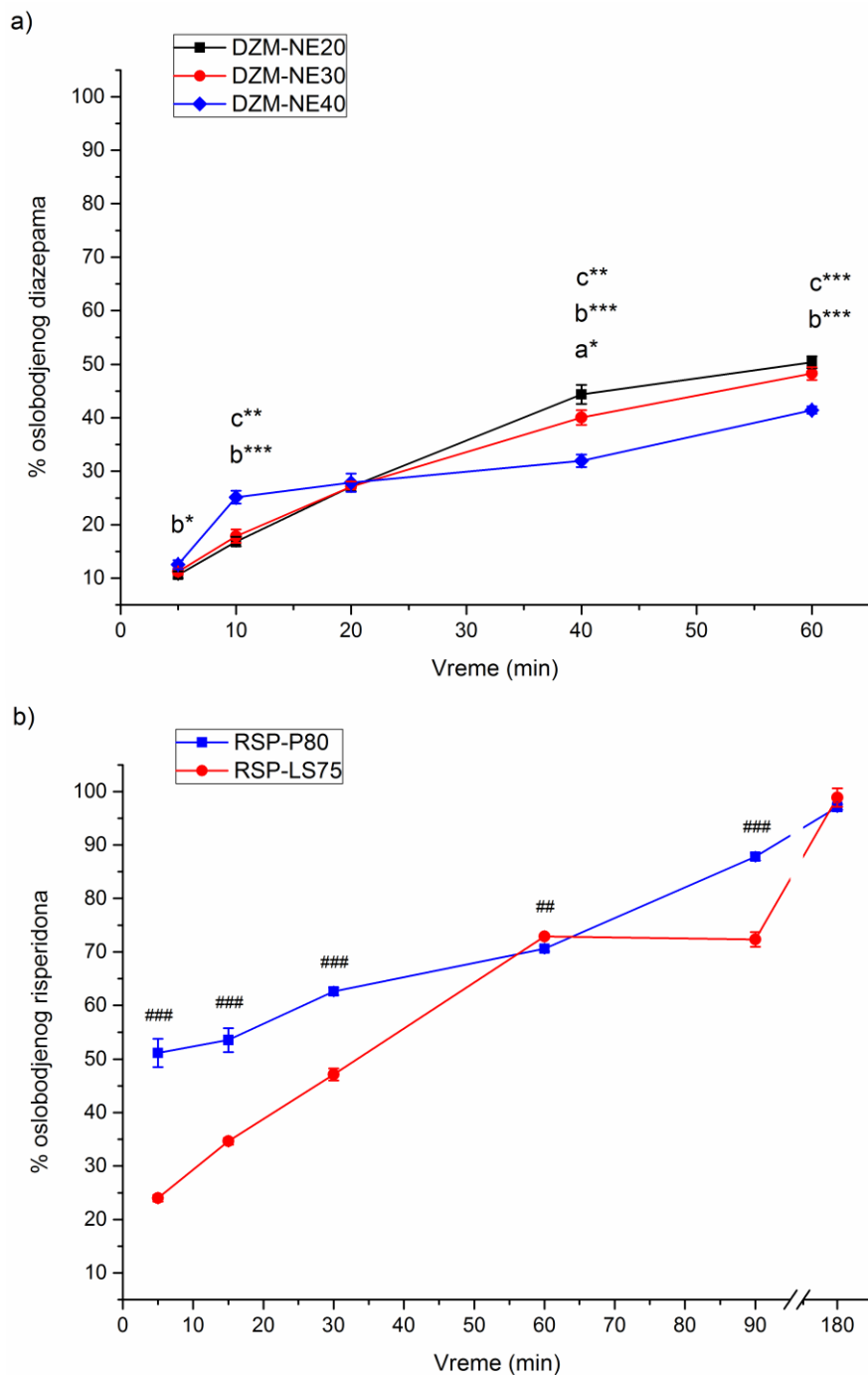
Prikazane AFM fotomikrografije (slike 4.2.9 i 4.2.10) jasno pokazuju da su u ispitivanim uzorcima nanoemulzija diazepama i risperidona prisutne male, sferične, homogene kapi nanovelicina, sa prosečnim dijametrom oko 200–250 nm, pri čemu nije detektovano prisustvo većih kapi, agregata ili nerastvorenih kristala model lekovite supstance, što je bilo u skladu sa nalazima dobijenim PCS i LD metodama.

4.2.3. *In vitro* ispitivanje brzine oslobađanja model lekovite supstance iz nanoemulzija

In vitro ispitivanje brzine oslobađanja model lekovite supstance iz formulisanih parenteralnih nanoemulzija (diazepama iz nanoemulzija sa 20%, 30% i 40% uljane faze, stabilizovanih smešom lecitina i P80, i risperidona iz nanoemulzija sa 20% uljane faze, stabilizovanih lecitinom ili smešom lecitin/P80) sprovedeno je primenom tehnike reverzne dijalize sa vrećicama, u kojoj čist medijum napunjen u dijalizne vrećice predstavlja akceptorsku fazu, a ispitivana nanoemulzija dispergovana u odgovarajućoj zapremini medijuma koji okružuje dijalizne vrećice predstavlja donorsku fazu (Chidambaram i Burgess, 1999). Procenat oslobođene model lekovite supstance iz ispitivanih formulacija nanoemulzija izračunat je iz odnosa koncentracije lekovite supstance u dijaliznim vrećicama (akceptorski medijum), izmerene u prethodno definisanim vremenskim intervalima, i ukupne koncentracije lekovite supstance u okolnom medijumu, tj. *sink* rastvoru (Levy i Benita, 1990), a dobijeni profili oslobađanja prikazani su na slici 4.2.11. Kao što se može videti, *in vitro* oslobađanje diazepama iz ispitivanih parenteralnih nanoemulzija (slika 4.2.11a) odlikovalo se bifaznim profilom (posebno izraženo kod nanoemulzije sa 40% uljane faze), sa inicijalnim bržim oslobađanjem (moguće usled difuzije slobodne lekovite supstance, ili lekovite supstance solubilizovane u miclele iz donorske faze u akceptorski medijum), koje je bilo praćeno sporijim oslobađanjem (verovatno usled oslobađanja lekovite supstance iz uljanih kapi u kontinuiranu donorsku fazu, te difuzije kroz membranu dijalizne vrećice u akceptorski medijum) (Chidambaram i Burgess, 1999). Poređenjem dobijenih profila može se zaključiti da su profili oslobađanja diazepama iz ispitivanih nanoemulzija sa 20% i 30% uljane faze slični ($p < 0,05$ jedino u 40 min), a da se značajne razlike mogu uočiti između nanoemulzija sa 20% i 40%, odnosno 30% i 40% uljane faze (slika 4.2.11a). Rezultati pokazuju da je nakon 60 min ukupni procenat oslobođenog diazepama iz ispitivanih nanoemulzija sa 20% i 30% uljane faze bio značajno veći (ANOVA, $F_{(2,6)} = 63,553$, $p < 0,001$) u poređenju sa nanoemulzijom sa 40% uljane faze ($50,39 \pm 1,12\%$ i $48,27 \pm 1,18\%$ vs. $41,43 \pm 0,67\%$, respektivno). Sveukupno gledano, može se zaključiti da je oslobađanje diazepama iz ispitivanih parenteralnih nanoemulzija relativno brzo i da se sa povećanjem koncentracije uljane

faze smanjuje frakcija oslobođenog diazepama, verovatno usled dužeg zadržavanja lekovite supstance u većoj količini emulzionih kapi.

U slučaju nanoemulzija risperidona (slika 4.2.11b), rezultati ispitivanja brzine oslobađanja pokazali su da između ispitivanih formulacija, različitih samo po prisustvu P80 kao koemulgatora, postoji značajna razlika u profilima oslobađanja lekovite supstance. Inicijalno brzo oslobađanje bilo je naročito izraženo kod RSP-P80 nanoemulzije, stabilizovane smešom lecitin/P80, iz koje se već u prvih pet minuta oslobodilo više od 50% risperidona. Pored toga, procenat oslobođenog risperidona iz ove nanoemulzije bio je u gotovo svim vremenskim tačkama (izuzev 60 min i 180 min) značajno veći (t -test, $p < 0,05$) u poređenju sa RSP-LS75 nanoemulzijom. Kod formulacije RSP-LS75, pak, stabilizovane samo lecitinom, nakon početnog sporijeg oslobađanja, uočeno je povećanje u količini oslobođene lekovite supstance, koja se nakon jednog sata ispitivanja približila količini oslobođenog risperidona iz poredbene nanoemulzije (slika 4.2.11b). Konačno, nakon 180 min, ukupni procenat oslobođenog risperidona bio je gotovo isti za obe ispitivane nanoemulzije risperidona, nezavisno od prisustva koemulgatora/kostabilizatora, i iznosio je skoro pa 100% (RSP-P80: $97,09 \pm 0,51$; RSP-LS75: $98,87 \pm 1,74$).



Slika 4.2.11. Profili brzine oslobađanja diazepamata iz ispitivanih nanoemulzija sa 20% (DZM-NE20), 30% (DZM-NE30) i 40% (DZM-NE40) uljane faze (a); risperidona iz ispitivanih nanoemulzija stabilizovanih lecitinom (RSP-LS75) ili smešom lecitina i polisorbata 80 (RSP-P80) (b) (srednja vrednost \pm standardna devijacija, $n = 3$); $a^*p < 0,05$ za DZM-NE20 vs. DZM-NE30; $b^*p < 0,05$; $b^{***}p < 0,001$ za DZM-NE20 vs. DZM-NE40; $c^{**}p < 0,01$; $c^{***}p < 0,001$ za DZM-NE30 vs. DZM-NE40; $\#p < 0,01$; $\#\#p < 0,001$ za RSP-P80 vs. RSP-LS75.

U cilju sticanja boljeg uvida u kinetiku oslobađanja lekovite supstance iz ispitivanih nanoemulzija, dobijeni eksperimentalni podaci fitovani su u odgovarajuće matematičke modele – nultog reda, prvog reda, Higuchi, Baker–Lonsdale, Korsmeyer–Peppas (Costa i Sousa Lobo, 2001), a izračunati parametri prikazani su u tabeli 4.2.2. Na osnovu vrednosti koeficijenta determinacije (R^2), prilagođenog koeficijenta determinacije (R^2_{adjusted}) i AIC vrednosti (engl. *Akaike Information Criterion*) (Costa i Sousa Lobo, 2001), model koji najbolje opisuje oslobađanje diazepama, a i risperidona, iz ispitivanih nanoemulzija jeste Korsmeyer–Peppas model (najveći R^2 i R^2_{adjusted} , najmanji AIC). Poređenjem konstanti brzine oslobađanja uočeno je da je brzina oslobađanja diazepama iz nanoemulzije sa 40% uljane faze značajno veća u poređenju sa nanoemulzijama sa 20% i 30% ulja (ANOVA, $F_{(2,6)} = 47,886$, $p < 0,001$). Takođe, brzina oslobađanja risperidona iz nanoemulzije stabilizovane lecitinom u kombinaciji sa P80 bila je značajno veća u odnosu na nanoemulziju stabilizovanu samo lecitinom (t -test, $p < 0,001$). Na osnovu vrednosti eksponenta oslobađanja/difuzije (n) koji ukazuje na mehanizam oslobađanja lekovite supstance u Korsmeyer–Peppas modelu (Costa i Sousa Lobo, 2001), može se zaključiti da je kod nanoemulzija diazepama sa 20% i 30% uljane faze dominantan anomalni transport diazepama ($0,43 < n < 0,85$), koji se pripisuje kombinaciji difuzije i erozije kod čvrstih matriksa, a o kome se malo zna u slučaju emulzija. Neki autori pripisuju anomalni transport faznim prelazima surfaktanata, kao što je formiranje lamelarnih ili kubnih faza (Marín-Quintero i sar., 2013). Kod nanoemulzije sa 40% uljane faze je pak prisutno difuzijom-kontrolisano oslobađanje diazepama ($n \leq 0,43$). U slučaju risperidon-nanoemulzija, vrednost eksponenta n ($\leq 0,43$) upućuje da se risperidon iz ispitivanih formulacija nanoemulzija dominantno oslobađa mehanizmom difuzije.

Tabela 4.2.2. Kinetika oslobađanja model lekovite supstance iz ispitivanih formulacija nanoemulzija (diazepam iz nanoemulzija DZM-NE20, DZM-NE30 i DZM-NE40; risperidona iz nanoemulzija RSP-P80 i RSP-LS75)

Kinetički model	Parametar	Formulacija				
		DZM-NE20	DZM-NE30	DZM-NE40	RSP-P80	RSP-LS75
Nultog reda	K	0,972	0,921	0,809	0,719	0,679
	R ²	0,7992	0,7290	-0,2426	-3,6972	0,1204
	R ² _{adjusted}	0,7992	0,7290	-0,2426	-3,6972	0,1204
	AIC	29,33	29,68	33,55	56,00	50,87
Prvog reda	K	0,014	0,013	0,011	0,041	0,021
	R ²	0,9327	0,8839	0,1072	-0,0002	0,8936
	R ² _{adjusted}	0,9327	0,8839	0,1072	-0,0002	0,8936
	AIC	23,87	25,44	31,90	46,71	38,19
Higuchi	K	6,440	6,148	5,592	8,809	7,957
	R ²	0,9637	0,9886	0,8208	-0,1881	0,9313
	R ² _{adjusted}	0,9637	0,9886	0,8208	-0,1881	0,9313
	AIC	20,78	13,84	23,87	47,73	35,55
Baker–Lonsdale	K	0,001	0,001	0,001	0,003	0,002
	R ²	0,9419	0,9733	0,8606	0,5720	0,9729
	R ² _{adjusted}	0,9419	0,9733	0,8606	0,5720	0,9729
	AIC	23,13	18,10	22,61	41,53	29,75
Korsmeyer–Peppas	K	4,409	4,949	8,960	32,079	12,718
	N	0,605	0,560	0,367	0,211	0,397
	R ²	0,9854	0,9970	0,9059	0,9322	0,9753
	R ² _{adjusted}	0,9806	0,9960	0,8745	0,9153	0,9692
	AIC	18,22	9,18	22,65	32,46	31,43

k: konstanta brzine oslobađanja; R²: koeficijent determinacije; R²_{adjusted}: prilagođeni koeficijent determinacije; AIC: Akaikov informacijski kriterijum; n: eksponent oslobađanja/difuzije (n ≤ 0,43 – Fickova difuzija; 0,43 < n < 0,85 – anomalno ponašanje, ne-Fickova difuzija; n ≥ 0,85 – oslobađanje nultog reda (Costa i Sousa Lobo, 2001)).

4.3. Rezultati i diskusija treće faze eksperimentalnog rada

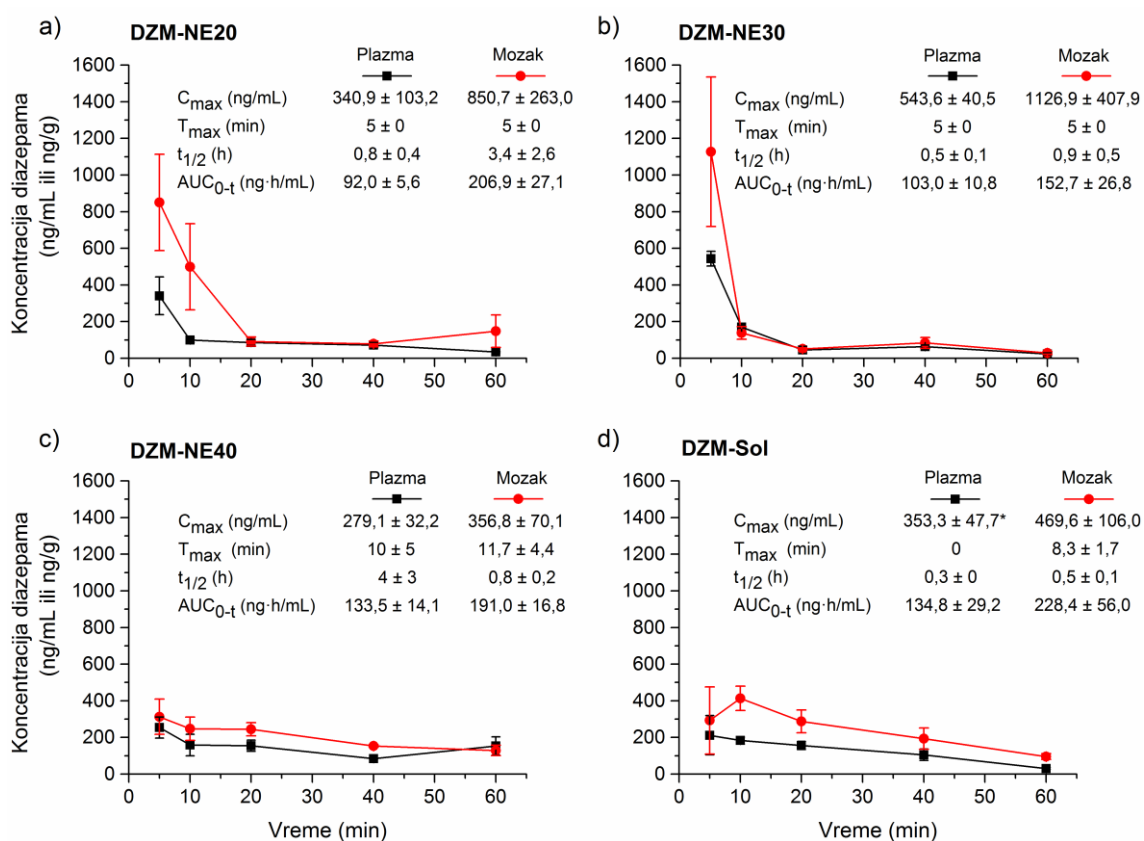
4.3.1. *In vivo* farmakokinetičke i studije biodistribucije

Da bi se dobio uvid u značajan potencijal razvijenih formulacija nanoemulzija kao nosača za parenteralnu primenu slabo rastvorljivih psihofarmakoloških lekova i procenio uticaj samog nanoemulzionog sistema kao nosača na farmakokinetiku inkorporirane model lekovite supstance, odabrani „aktivni“ uzorci nanoemulzija podvrgnuti su farmakokinetičkim ispitivanjima nakon intraperitonealne primene kod pacova. Uzimajući u obzir specifične zahteve koje u pogledu fizičko-hemijskih svojstava nameće parenteralni put primene, kao i podatke o stabilnosti i *in vitro* oslobađanju lekovite supstance, za *in vivo* farmakokinetičke i studije biodistribucije odabrane su one formulacije nanoemulzija koje su imale najbolje karakteristike. Na primeru diazepama i risperidona kao model lekovitih supstanci, tokom ovih studija procenjena je sposobnost razvijenih parenteralnih nanoemulzija da uspešno isporuče slabo rastvorljive lekovite supstance koje deluju na CNS, a čija bi primena bila posebno poželjna u hitnim (urgentnim) stanjima, kada je potrebna brza isporuka leka u mozak.

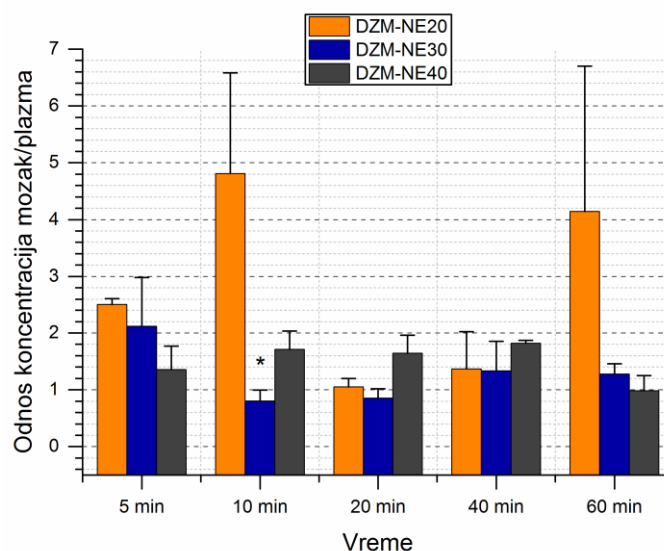
4.3.1.1. Nanoemulzije sa diazepamom kao model lekovitom supstancom

U cilju utvrđivanja da li i kako sadržaj uljane faze u nanoemulzijama utiče na farmakokinetiku inkorporirane model lekovite supstance, uključujući odnose ekspozicije u plazmi i moždanom tkivu, te efikasnost isporuke u mozak, *in vivo* farmakokinetičkim studijama podvrgnute su tri formulacije nanoemulzija diazepama, stabilizovane kombinacijom sojinog lecitina i P80, sa rastućom koncentracijom uljane faze od 20%, 30% i 40% (DZM-NE20, DZM-NE30 i DZM-NE40, respektivno; [tabela 4.2.1](#)). Sadržaj diazepama u odabranim nanoemulzijama određen je spektrofotometrijski naspram odgovarajuće placebo formulacije (slepa proba), a dobijene vrednosti bile su približno 97,5%, 98% i 99% za nanoemulzije sa 20%, 30% i 40% ulja, respektivno. Profili koncentracija diazepama u plazmi i moždanom tkivu pacova nakon intraperitonealne primene navedenih nanoemulzija diazepama i intravenske primene rastvora diazepama (koji je korišćen za validaciju eksperimentalnog protokola), kao i izračunati farmakokinetički parametri prikazani su na [slici 4.3.1](#), dok su odnosi koncentracija diazepama nađenih u mozgu i plazmi nakon intraperitonealne primene

ispitivanih nanoemulzija dati na [slici 4.3.2](#). Vrednosti parametara C_{max} , T_{max} , $t_{1/2}$, AUC_{0-t} , CL ($14,99 \pm 3,42$ L/kg/h) i Vd ($6,07 \pm 1,28$ L/kg) dobijene u plazmi nakon primene rastvora diazepama injektovanjem u repnu venu ([slika 4.3.1d](#)) bile su komparabilne sa vrednostima navedenim u literaturi za isti put primene kod pacova ([Igari i sar., 1982](#); [Kaur i Kim, 2008](#)), što potvrđuje validnost primenjenog dizajna farmakokinetičkih eksperimenata.



Slika 4.3.1. Farmakokinetički profili diazepama u plazmi i moždanom tkivu nakon intraperitonealne primene odabranih nanoemulzija diazepama (DZM-NE20, DZM-NE30 i DZM-NE40) i intravenske primene rastvora diazepama (DZM-Sol) kod pacova ($n = 3$, srednja vrednost \pm standardna greška). *Ekstrapolisana koncentracija u vremenu $t = 0$.



Slika 4.3.2. Mozak–plazma odnosi koncentracija diazepama nakon intraperitonealne primene odabranih nanoemulzija diazepama (DZM-NE20, DZM-NE30 i DZM-NE40) kod pacova ($n = 3$, srednja vrednost \pm standardna greška); $*p < 0,05$ u poređenju sa DZM-NE20 i DZM-NE40 nanoemulzijama (Kruskal–Wallis test; $H = 6,489$; $df = 2$; $p = 0,039$; poređenje parova primenom Mann–Whitney U testa).

Kako grafici za nanoemulzije diazepama pokazuju (slike 4.3.1a–4.3.1c i 4.3.2), prosečne koncentracije diazepama u mozgu bile su veće od onih u plazmi u većini vremenskih tačaka, što nije iznenađujuće ako se uzmu u obzir povoljna fizičko-hemijska svojstva diazepama, pre svega njegova visoka lipofilnost (Worboys i sar., 1997). Shodno tome, ukupni nivoi diazepama u moždanom tkivu ($AUC_{0-1\text{ h, mozak}}$) bili su veći od nivoa nađenih u plazmi ($AUC_{0-1\text{ h, plazma}}$), što je rezultovalo generalnim odnosom ekspozicije u mozgu i plazmi, odnosno mozak–plazma particionim koeficijentom (K_p) > 1 . Između tri ispitivane formulacije nanoemulzija, nanoemulzija sa najmanjim sadržajem uljane faze (DZM-NE20) težila je da ima najveću vrednost za K_p ($2,26 \pm 0,29$), dok su K_p vrednosti za nanoemulzije DZM-NE30 i DZM-NE40 bile neznatno niže ($1,50 \pm 0,28$ i $1,43 \pm 0,03$, respektivno).

Uprkos očiglednim trendovima, statistička analiza je pokazala da ni u jednom od izračunatih farmakokinetičkih parametara nije bilo značajne razlike između tri ispitivane formulacije nanoemulzije diazepama. Pored toga, primetno je da su DZM-NE20 i DZM-NE30 nanoemulzije bile mnogo sličnije jedna drugoj nego DZM-NE40 nanoemulziji (slike 4.3.1a–4.3.1c). Na primer, utvrđeno je da su C_{\max} vrednosti za prve dve, ali ne i za

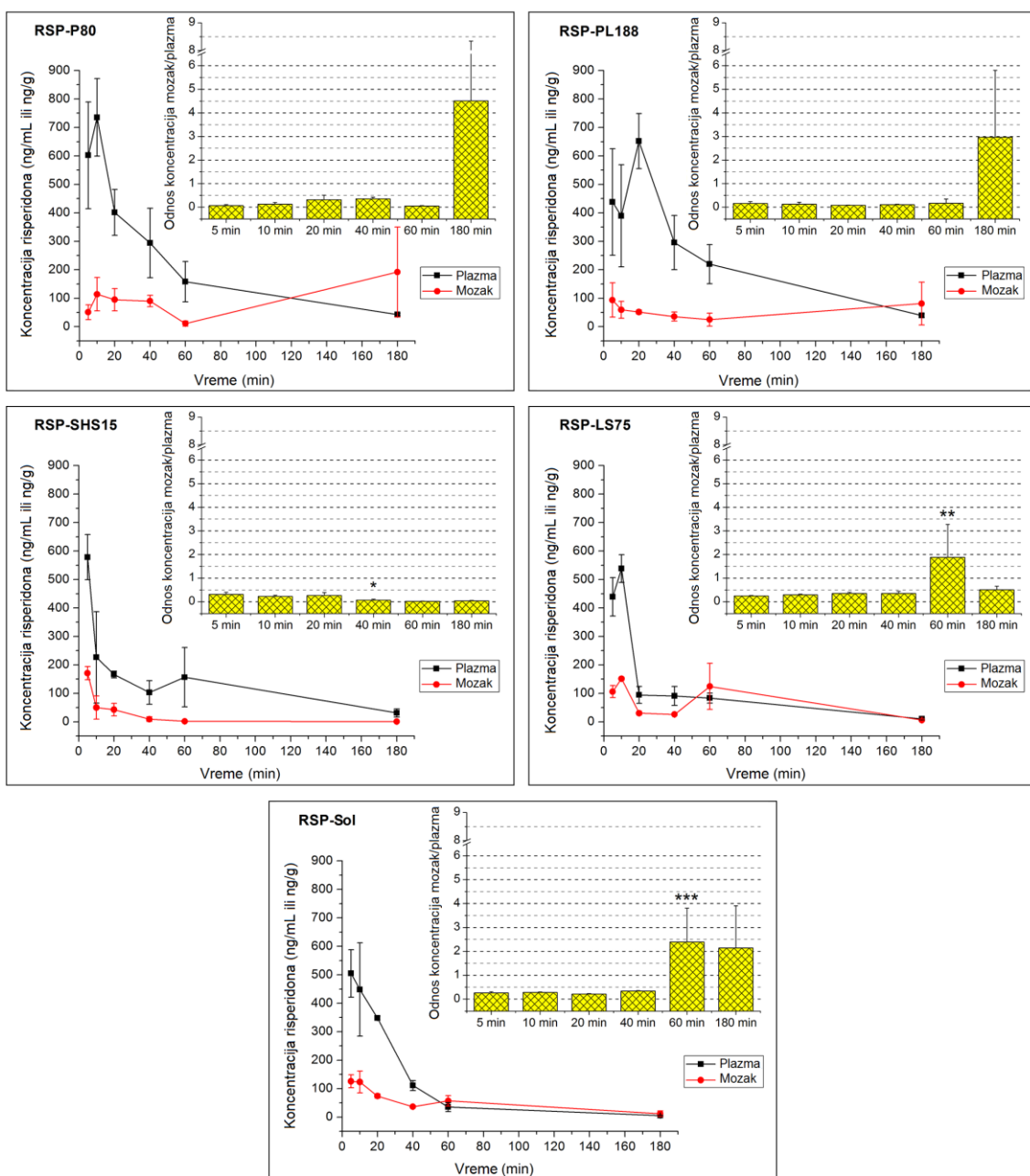
poslednju formulaciju, bile značajno veće u moždanom tkivu u odnosu na plazmu. U oba matriksa, DZM-NE30 nanoemulzija je imala najveći C_{max} , dok su vrednosti ovog parametra bile najniže za DZM-NE40 nanoemulziju i postignute su 5 min (u plazmi) i 7 min (u mozgu) kasnije nego sa dve formulacije nanoemulzija sa nižim sadržajem uljane faze (DZM-NE20 i DZM-NE30), koje su pak pokazale brzu resorpciju u sistemsku cirkulaciju i, posledično, brzu distribuciju u mozak. U skladu sa tim, $t_{1/2}$ DZM-NE40 nanoemulzije u plazmi bilo je neočekivano produženo (4 h), usled trenda povećanih koncentracija diazepama u kasnijim vremenskim tačkama, što je bilo zabeleženo kod dva od tri seta analiziranih podataka.

Ovo naročito ponašanje formulacije sa najvećim sadržajem uljane faze ukazuje da je DZM-NE40 nanoemulzija možda formirala depo diazepama na mestu intraperitonealne primene. Iz ovog depoa, lekovita supstanca je mogla da se oslobađa u kasnijim vremenskim intervalima kontinuirano, mada nepravilno, kao što je pokazano neočekivano velikim varijacijama u parametrima kao što su T_{max} ili $t_{1/2}$ (slika 4.3.1c). Povezane sa ovom mogućnošću su vrednosti apsolutne biološke raspoloživosti diazepama primenjenog u vidu DZM-NE20, DZM-NE30 i DZM-NE40 nanoemulzija (izračunate na osnovu AUC vrednosti dobijene za intravenski rastvor), koje su redom bile 68,3%, 76,4% i 99,1%. Naime, samo se prve dve vrednosti dobro poklapaju sa literaturnim podacima za diazepam primenjen intranazalnim putem kod pacova i zečeva, koji navodno rezultira brзом i efikasnom distribucijom lekovite supstance u mozak (Kaur i Kim, 2008).

Ukratko, rezultati *in vivo* farmakokinetičke studije su pokazali da između ispitivanih formulacija nanoemulzija diazepama sa različitim sadržajem uljane faze (20%, 30% i 40%), primenjenih intraperitonealno kod pacova, postoje diskretne razlike u farmakokinetici inkorporirane lekovite supstance. Ove razlike ogledale su se u brzoj i intenzivnoj distribuciji u mozak diazepama formulisanog u vidu nanoemulzija sa 20% i 30% uljane faze, sa upečatljivo visokim C_{max} vrednostima i očekivanim vrednostima biološke raspoloživosti, što ukazuje na primenljivost navedenih nanoemulzija u urgentnim stanjima.

4.3.1.2. Nanoemulzije sa risperidonom kao model lekovitom supstancom

U daljem toku farmakokinetičkih eksperimenata ispitivan je uticaj same formulacije nanoemulzija u smislu sastava stabilizujućeg sloja na ulje–voda međupovršini, pre svega vrste kostabilizatora/koemulgatora, na farmakokinetičko ponašanje inkorporirane lekovite supstance, a sa krajnjim ciljem rasvetljavanja specifične uloge površinskih svojstava nanoemulzije u ciljnoj isporuci lekovite supstance u mozak. Za tu svrhu odabrane su tri formulacije nanoemulzija risperidona stabilizovane lecitinom u kombinaciji sa P80, PL188 i SHS15 kao koemulgatorima (RSP-P80, RSP-PL188 i RSP-SHS15, respektivno), i jedna kontrolna nanoemulzija risperidona, stabilizovana samo lecitinom bez dodatog koemulgatora (RSP-LS75), te procenjena njihova sistemska dispozicija i efikasnost isporuke inkorporirane lekovite supstance u mozak nakon intraperitonealne primene kod pacova. Sadržaj risperidona u ispitivanim nanoemulzijama određen je spektrofotometrijski prema odgovarajućoj slepoj probi, a vrednosti su iznosile $100,7 \pm 3,9\%$, $100,1 \pm 2,2\%$, $100,7 \pm 1,8\%$ i $100,8 \pm 2,9\%$ za RSP-P80, RSP-PL188, RSP-SHS15 i RSP-LS75, respektivno. Profili koncentracija risperidona u plazmi i moždanom tkivu pacova nakon intraperitonealne primene serije nanoemulzija (RSP-P80, RSP-PL188, RSP-SHS15, RSP-LS75) i rastvora risperidona (RSP-Sol), kao i odnos dobijenih koncentracija u plazmi i mozgu, prikazani su na [slici 4.3.3](#), a izračunati farmakokinetički parametri sumirani su u [tabeli 4.3.1](#).



Slika 4.3.3. Farmakokinetički profili u plazmi i mozgu i mozak-plazma koncentracioni odnosi risperidona nakon intraperitonealne primene odabranih nanoemulzija risperidona (RSP-P80, RSP-PL188, RSP-SHS15, RSP-LS75) i rastvora risperidona (RSP-Sol) kod pacova (srednja vrednost \pm standardna greška, $n = 3$). * $p < 0,05$ u poređenju sa RSP-P80, RSP-LS75 i RSP-Sol (ANOVA; $F_{(4,10)} = 6,581$; $p = 0,007$); ** $p < 0,05$ u poređenju sa RSP-P80 i RSP-SHS15 (Mann-Whitney U test); *** $p < 0,05$ u poređenju sa RSP-P80, RSP-PL188 i RSP-SHS15 nanoemulzijama (Mann-Whitney U test).

Tabela 4.3.1. Farmakokinetički parametri risperidona nakon intraperitonealne primene odabranih nanoemulzija risperidona (RSP-P80, RSP-PL188, RSP-SHS15, RSP-LS75) i rastvora risperidona (RSP-Sol) kod pacova (srednja vrednost \pm standardna greška, n = 3)

Parametar	Tkivo	Formulacija				
		RSP-P80	RSP-PL188	RSP-SHS15	RSP-LS75	RSP-Sol
Plazma						
C_{max} (ng/mL)		780,07 \pm 127,55	781,00 \pm 34,87	614,10 \pm 48,34	573,96 \pm 14,62	639,29 \pm 82,04
T_{max} (h)		0,31 \pm 0,18	0,19 \pm 0,07	0,11 \pm 0,03	0,14 \pm 0,03	0,11 \pm 0,03
AUC_{0-t} (h ng/mL)		567,83 \pm 78,99	642,79 \pm 75,97	366,29 \pm 140,81	265,49 \pm 26,94	268,96 \pm 35,24
CL (L/h/kg)		1,82 \pm 0,23	1,60 \pm 0,19	3,48 \pm 0,97	3,84 \pm 0,37	3,84 \pm 0,45
$t_{1/2}$ (h)		1,53 \pm 0,51	0,87 \pm 0,13	1,11 \pm 0,25	0,73 \pm 0,17	0,92 \pm 0,21
F_{rel} (%)		211,12	238,99	136,19	98,71	–
F_{abs} (%)		77,21	87,40	49,81	36,10	36,57
Mozak						
C_{max} (ng/g)		292,96 \pm 106,76	136,28 \pm 48,16	170,87 \pm 22,92	199,63 \pm 43,54	158,09 \pm 27,17
T_{max} (h)		1,17 \pm 0,92	1,11 \pm 0,94	0,08 \pm 0,00	0,44 \pm 0,28	0,11 \pm 0,03
AUC_{0-t} (h ng/g)		277,06 \pm 155,49	150,29 \pm 101,36	37,25 \pm 10,39	195,39 \pm 96,81	135,57 \pm 29,62
K_p		0,51 \pm 0,32	0,28 \pm 0,21	0,13 \pm 0,05	0,81 \pm 0,46	0,51 \pm 0,13
DTI		1,00	0,54	0,25	1,57	–
R		2,04	1,11	0,27	1,44	–

$F_{rel} = AUC_{0-t, plazma, i.p. nanoemulzija} / AUC_{0-t, plazma, i.p. rastvor}$;

$F_{abs} = AUC_{0-t, plazma, i.p. nanoemulzija} / AUC_{0-t, plazma, i.v. rastvor}$;

$K_p = AUC_{0-t, mozak} / AUC_{0-t, plazma}$; $DTI = K_p, nanoemulzija / K_p, rastvor$;

$R = AUC_{0-t, mozak, nanoemulzija} / AUC_{0-t, mozak, rastvor}$.

Kao što grafici pokazuju (slika 4.3.3), prosečne koncentracije risperidona u plazmi imale su tendenciju da budu veće nakon primene nanoemulzija u odnosu na rastvor u kasnijim vremenskim tačkama (1–3 h nakon injektovanja), ili pak u slučaju RSP-P80 nanoemulzije u svim vremenskim tačkama, sa značajnom razlikom (ANOVA; $F_{(4,10)} = 10,977$; $p = 0,001$) zapaženom 3 h posle injektovanja za RSP-P80, RSP-PL188 i RSP-SHS15 nanoemulzije u poređenju sa kontrolnim RSP-Sol rastvorom. Razlog može biti eventualno formiranje depoa risperidona na mestu injektovanja nakon intraperitonealne

primene nanoemulzija, kao i sporo oslobađanje inkorporiranog risperidona iz uljanog jezgra nanoemulzija u krv, s obzirom da je inkorporiranoj lekovitoj supstanci potrebno određeno vreme da pređe iz uljane faze u vodenu fazu nanoemulzije (Chen i sar., 2010; Lu i sar., 2009). Pored toga, prosečne koncentracije risperidona u plazmi nakon intraperitonealne primene nanoemulzija RSP-P80, RSP-PL188 i RSP-SHS15 bile su veće od koncentracija postignutih primenom kontrolne nanoemulzije RSP-LS75 u većini vremenskih tačaka [značajno u 20 min (ANOVA; $F_{(4,10)} = 16,788$; $p < 0,001$) i 180 min (ANOVA; $F_{(4,10)} = 10,977$; $p = 0,001$) nakon primene za RSP-P80 vs. RSP-LS75 i RSP-PL188Sh vs. RSP-LS75], verovatno zbog manje veličine kapi RSP-P80, RSP-PL188 i RSP-SHS15 nanoemulzija obloženih hidrofilnijim filmom surfaktanata (usled prisustva koemulgatora) u poređenju sa RSP-LS75 formulacijom, što rezultira njihovim produženim zadržavanjem u cirkulaciji i većim izbegavanjem RES ćelija.

Premda u plazmi nisu uočene statistički značajne razlike ni u jednom od ispitivanih farmakokinetičkih parametara (C_{max} , T_{max} , AUC_{0-t} , CL , $t_{1/2}$) risperidona iz različitih nosača, određeni trendovi su se ipak mogli prepoznati (tabela 4.3.1). Na primer, nakon intraperitonealne primene, sve nanoemulzije kao i rastvor risperidona pokazale su slične prosečne C_{max} vrednosti koje su bile postignute za 5–20 min, što ukazuje na relativno brzu resorpciju u sistemsku cirkulaciju i sledstvenu brzu distribuciju u mozak, sa izuzetkom nanoemulzija RSP-P80 i RSP-PL188 kojima je trebalo duže ali varijabilno vreme (10–180 min, od seta do seta) da postignu maksimalne koncentracije risperidona u mozgu. Pored toga, prosečne vrednosti za $AUC_{0-3 h}$ u plazmi imale su tendenciju da budu veće kada je risperidon primenjen u obliku ispitivanih nanoemulzija u poređenju sa i kontrolnom nanoemulzijom (RSP-LS75), i rastvorom (RSP-Sol), ukazujući time na povećanu raspoloživost risperidona iz nanoemulzija koje su sadržale P80, PL188 ili SHS15 kao koemulgatore. Na osnovu prosečnih $AUC_{0-3 h}$ vrednosti, relativne biološke raspoloživosti (F_{rel}) i apsolutne biološke raspoloživosti (F_{abs}) risperidona u plazmi, ispitivane nanoemulzije mogu se poređati po sledećem redosledu: RSP-PL188 > RSP-P80 > RSP-SHS15 > RSP-LS75.

Podaci dobijeni za moždano tkivo pokazali su postojanje velikih interindividualnih varijacija u koncentracijama risperidona u datim vremenskim tačkama (slika 4.3.3), koje su zapravo mogle da maskiraju očigledne razlike između ispitivanih formulacija nanoemulzija i rastvora risperidona. Značajna razlika (ANOVA; $F_{(4,10)} = 6,241$; $p =$

0,009) detektovana je jedino u slučaju RSP-P80 nanoemulzije koja je u mozgu, 40 min nakon primene, pokazala veće prosečne koncentracije risperidona u odnosu na RSP-SHS15 i RSP-LS75 nanoemulzije i rastvor risperidona. Trend povećanih koncentracija risperidona zapažen u mozgu u poslednjoj vremenskoj tački, 3 h nakon primene RSP-P80 i RSP-PL188 nanoemulzija, koji je u oba slučaja postojao kod dva od tri seta podataka, ukazuje da bi ovde mogao biti posredi vremenski-zavistan proces kakav je, između ostalog, receptorom-posredovana endocitoza/transcitoza, koji je promovisao povećano preuzimanje risperidona iz navedenih nanoemulzija u mozak tokom vremena. Slično kao što je predloženo za isporuku nanočestica u mozak (Kreuter, 2001), i kapi nanoemulzija bi mogle da uđu u mozak adsorpcijom na zidove moždanih kapilara, udruženom sa povećanim zadržavanjem kapi u ovim kapilarima, što bi dovelo do stvaranja većeg koncentracionog gradijenta koji dalje povećava transport kroz moždane kapilarne endotelne ćelije. Nanoemulzije kapi pokrivene kombinovanim lecitin/P80 ili lecitin/PL188 filmom bi takođe mogle da budu preuzete u mozak procesom endocitoze i/ili transcitoze zahvaljujući apolipoproteinima plazme adsorbovanim na površini kapi (Kasongo i sar., 2011; Kreuter, 2001; Wohlfart i sar., 2012). Konačno, inhibicija P-glikoprotein–efluksnog sistema prisutnog na KMB, pomoću P80 (Kreuter, 2001; Prabhakar i sar., 2013), i verovatno PL188 (Kabanov i sar., 2003; Wohlfart i sar., 2012), mogla bi takođe da doprinese uočenoj tendenciji povećanja nivoa risperidona u mozgu iz P80- i PL188-kostabilizovanih nanoemulzija.

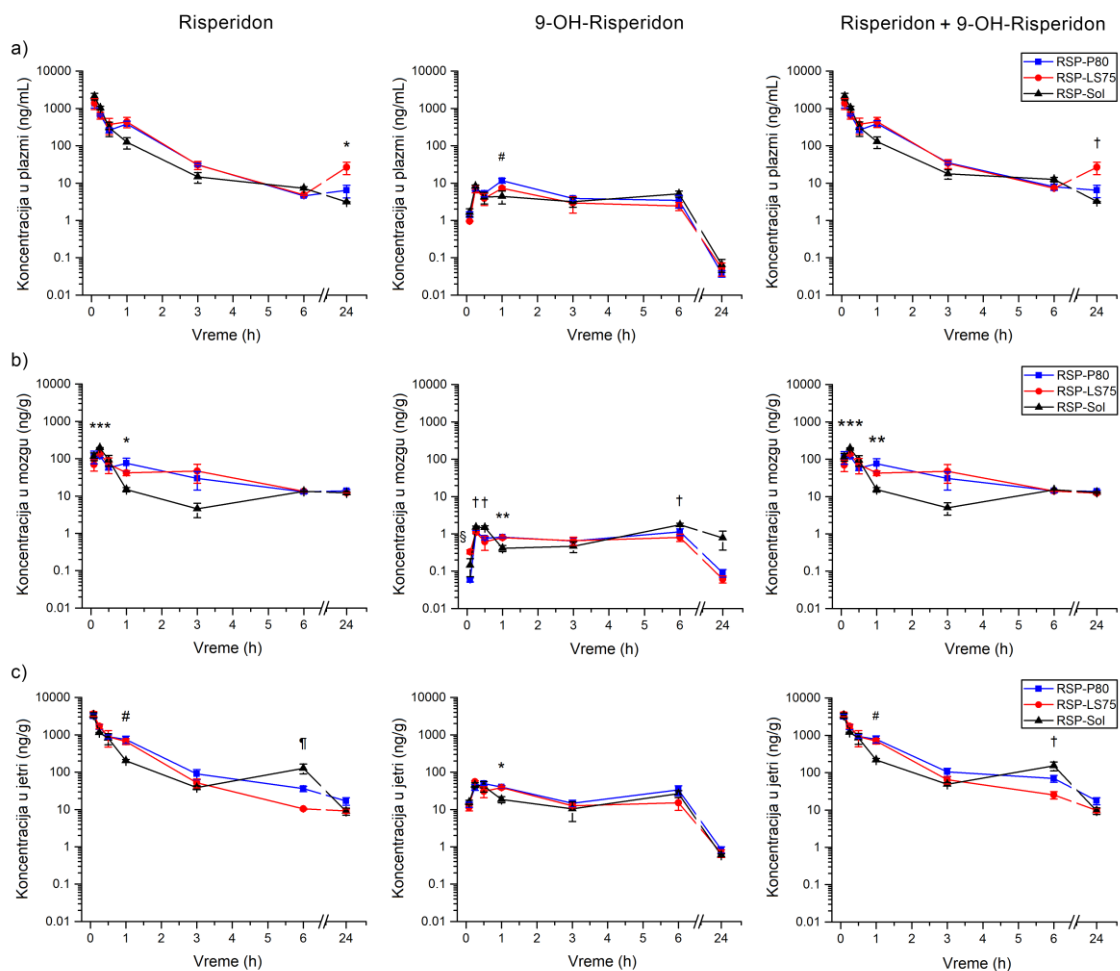
Kao indikator ciljne isporuke u mozak, u svakoj vremenskoj tački izračunat je mozak–plazma odnos koncentracija risperidona dobijenih primenom ispitivanih formulacija nanoemulzija i rastvora risperidona (slika 4.3.3). Bilo je očigledno da prosečne koncentracije risperidona u plazmi nakon intraperitonealne primene nanoemulzija ili rastvora risperidona prevazilaze one u mozgu u većini vremenskih tačaka, što nije iznenađujuće ako se uzme u obzir relativno niska lipofilnost risperidona ($\log P$ 3,04), kao i efluks od strane P-glikoproteina eksprimiranog na KMB (Aravagiri i Marder, 2002; Bundgaard i sar., 2012). Pa ipak, činjenica da je mozak–plazma koncentracioni odnos imao tendenciju da bude > 1 kada je risperidon primenjen u vidu nanoemulzija RSP-LS75 (1 h nakon primene) i RSP-P80 ili RSP-PL188 (3 h nakon primene), ukazivala je na potencijal razvijenih nanoemulzionih nosača u ciljnoj isporuci risperidona u mozak.

Kada se uporede četiri formulisane nanoemulzije risperidona i rastvor risperidona u pogledu izračunatih farmakokinetičkih parametara u mozgu (C_{max} , T_{max} , AUC_{0-t}), može se videti da između ispitivanih formulacija nije postojala statistički značajna razlika. Ipak, važno je napomenuti da je u slučaju nanoemulzija najveća prosečna vrednost za $AUC_{0-3 h}$ u mozgu postignuta sa formulacijom RSP-P80, zatim RSP-LS75 i RSP-PL188, i na kraju RSP-SHS15 nanoemulzijom (tabela 4.3.1). Kako su sve ove nanoemulzije bile veoma slične u pogledu izmerenih fizičko-hemijskih parametara – Z-Ave, PDI i ZP (tabela 4.1.2), uočeni trend bi se primarno mogao pripisati razlikama u specifičnim površinskim svojstvima uzrokovanim prisustvom koemulgatora sa različitim strukturama, pre svega različitom dužinom polioksietilenskih lanaca, i, posledično, različitim ponašanjem na ulje–voda međupovršini. Ovi nalazi upućuju da je niti veličina kapi, niti površinsko naelektrisanje, već sama površina čestica, tj. sastav stabilisućeg sloja na međupovršini bio ključni faktor odgovoran za prolazak kroz KMB i uočene razlike u farmakokinetičkim profilima risperidona.

Generalno, ukupni nivo risperidona u mozgu ($AUC_{0-3 h, mozak}$) bio je niži od ukupnog nivoa u plazmi ($AUC_{0-3 h, plazma}$), što je rezultovalo sveukupnim mozak–plazma odnosom ekspozicije, odnosno mozak–plazma particionim koeficijentom (K_p), manjim od 1 (tabela 4.3.1). Iako je nanoemulzija bez koemulgatora u svom sastavu (RSP-LS75) težila da ima najveću K_p vrednost, ne bi se moglo tvrditi da ova nanoemulzija isporučuje risperidon u mozak značajno bolje od drugih formulacija. S tim u vezi, terapijska raspoloživost, takođe poznata kao relativna mera preuzimanja (R), predstavljala je još jedan parametar koji je pri proceni uzet u razmatranje. Kao što R vrednosti navedene u tabeli 4.3.1 pokazuju, raspoloživost risperidona u mozgu nakon primene nanoemulzija, izuzev RSP-SHS15, bila je povećana u poređenju sa intraperitonealnim rastvorom. Veće preuzimanje u mozak moglo bi biti posledica proste difuzije kroz KMB slobodnog risperidona oslobođenog iz nanoemulzije i endocitoze/transcitoze nanoemulzionih kapi sa inkorporiranim risperidonom. Osim toga, prosečni $AUC_{0-3 h}$ u mozgu bio je 2 puta veći sa RSP-P80 nanoemulzijom nego sa rastvorom i 1,4–7,4 puta veći nego za ostale ispitivane nanoemulzije, što ukazuje da P80 može biti obećavajući surfaktant za poboljšanu isporuku risperidona u mozak. Iako su, međutim, razvijene nanoemulzije, skrojene po meri (engl. *tailor-made*), pokazale određenu sposobnost da ciljno isporuče lekovitu supstancu u mozak, bila su neophodna detaljnija ispitivanja kako bi se potpuno

razjasnila njihova sudbina u organizmu (engl. *biofate*), kao i mogući uticaj na terapijsku efikasnost risperidona.

Cilj je dakle bio da se dobije dublji uvid u potencijal parenteralnih nanoemulzija kao nosača za poboljšanu isporuku lekovite supstance u mozak kroz utvrđivanje veza između fizičko-hemijskih osobina lekovite supstance inkorporirane u nosač i njene farmakokinetike, biodistribucije i farmakodinamike. U tom smislu, odabrane su dve formulacije nanoemulzija risperidona, RSP-P80 i RSP-LS75, koje su se razlikovale jedino po prisustvu koemulgatora, P80, a koje su u pogledu isporuke lekovite supstance u mozak, na osnovu gore opisanih preliminarnih eksperimenata, najviše obećavale, te detaljno dodatno ispitane u pogledu farmakokinetičkog ponašanja i *in vivo* efektivnosti. *In vivo*, antipsihotični efekat risperidona povezan je kako sa risperidonom tako i sa njegovim glavnim aktivnim metabolitom, 9-OH-risperidonom, koji sa roditeljskim jedinjenjem deli sličan farmakološki profil (Aravagiri i sar., 1998; Ejsing i sar., 2005; Spina i sar., 2001); otuda je za procenu moguće veze između bihejvioralnog odgovora i farmakokinetičkog ponašanja primenjenih formulacija risperidona upotrebljena koncentracija ukupnog aktivnog oblika risperidona (suma risperidona i 9-OH-risperidona). Krive koncentracija u funkciji vremena za risperidon, 9-OH-risperidon i aktivni oblik u celini u plazmi, moždanom tkivu i jetri pacova nakon primene navedenih nanoemulzija i rastvora risperidona intraperitonealnim putem prikazani su na slici 4.3.4, dok su izračunati farmakokinetički parametri i odnosi koncentracija u tkivu i plazmi sumirani u tabeli 4.3.2 i na slici 4.3.5 respektivno.



Slika 4.3.4. Profili koncentracija risperidona, 9-hidroksirisperidona (nastao kao metabolit nakon tretmana risperidonom) i ukupnog aktivnog oblika risperidona (suma risperidona i 9-hidroksirisperidona) u plazmi (a), moždanom tkivu (b) i jetri (c) nakon intraperitonealne primene nanoemulzija risperidona (RSP-P80, RSP-LS75) i rastvora risperidona (RSP-Sol) kod pacova (srednja vrednost \pm standardna greška, $n = 3$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ za RSP-P80 i RSP-LS75 u poređenju sa RSP-Sol; # $p < 0,05$ za RSP-P80 vs. RSP-Sol; † $p < 0,05$ za RSP-LS75 vs. RSP-Sol; § $p < 0,05$ za RSP-P80 vs. RSP-LS75; ¶ $p < 0,05$ za RSP-P80 i RSP-LS75 u poređenju sa RSP-Sol i za RSP-P80 vs. RSP-LS75.

Tabela 4.3.2. Farmakokinetički parametri risperidona, 9-hidroksirisperidona (nastao kao metabolit nakon tretmana risperidonom) i sume risperidona i 9-hidroksirisperidona (ukupni aktivni oblik) nakon intraperitonealne primene nanoemulzija (RSP-P80 i RSP-LS75) i rastvora risperidona (RSP-Sol) kod pacova (srednja vrednost \pm standardna greška, n =3)

Tkivo	Farmakokinetički parametar	Risperidon			9-OH-Risperidon			Risperidon + 9-OH-Risperidon		
		RSP-P80	RSP-LS75	RSP-Sol	RSP-P80	RSP-LS75	RSP-Sol	RSP-P80	RSP-LS75	RSP-Sol
Plazma	C_{max} (ng/mL)	1367,74	1379,29	2104,59	11,69	8,51	8,29	1369,18	1380,24	2106,28
		$\pm 343,18$	$\pm 444,01$	$\pm 411,53$	$\pm 1,71$	$\pm 0,96$	$\pm 0,69$	$\pm 343,33$	$\pm 444,00$	$\pm 411,91$
	T_{max} (h)	0,083	0,083	0,083	1	0,75	0,50	0,083	0,083	0,083
		± 0	± 0	± 0	± 0	$\pm 0,25$	$\pm 0,25$	± 0	± 0	± 0
	$AUC_{0-24 h}$ (h ng/mL)	1068,03	1363,34	887,60	64,66	45,72	72,44	1132,69	1409,07	960,04
		$\pm 145,16$	$\pm 216,87$	$\pm 69,41$	$\pm 15,87$	$\pm 9,04$	$\pm 13,54$	$\pm 138,11$	$\pm 217,23$	$\pm 93,58$
	CL (L/h/kg)	0,97	0,77	1,14	–	–	–	0,91	0,75	1,05
	($CL = D / AUC_{0-24 h}$)	$\pm 0,12$	$\pm 0,13$	$\pm 0,08$				$\pm 0,10$	$\pm 0,12$	$\pm 0,07$
	$t_{1/2}$ (h)	5,88	17,28	6,41	3,01	3,52	3,51	5,57	14,25	6,03
		$\pm 0,63$	$\pm 7,86$	$\pm 0,42$	$\pm 0,07$	$\pm 0,52$	$\pm 0,60$	$\pm 0,57$	$\pm 5,28$	$\pm 0,62$
	$AUMC_{0-24 h}$ (h ² ng/mL)	2484,94	6964,56	1544,31	271,12	197,84	373,58	2756,06	7162,40	1917,89
		$\pm 594,07$	$\pm 2085,29^*$	$\pm 64,82$	$\pm 86,72$	$\pm 49,36$	$\pm 66,41$	$\pm 599,03$	$\pm 2131,49$	$\pm 127,56$
	MRT (h)	2,28	5,10	1,76	4,04	4,25	5,18	2,39	5,06	2,02
		$\pm 0,27$	$\pm 1,43^{\#}$	$\pm 0,16$	$\pm 0,42$	$\pm 0,20$	$\pm 0,17$	$\pm 0,28$	$\pm 1,37^{\#}$	$\pm 0,20$
	F_{rel} (%)	120,33	153,60	–	89,25	63,12	–	117,98	146,77	–
	f_u (%) ^a	3,63	4,04	2,27	–	–	–	–	–	–
		$\pm 0,96$	$\pm 1,99$	$\pm 0,54$						

Tabela 4.3.2. (nastavak)

Tkivo	Farmakokinetički parametar	Risperidon			9-OH-Risperidon			Risperidon + 9-OH-Risperidon		
		RSP-P80	RSP-LS75	RSP-Sol	RSP-P80	RSP-LS75	RSP-Sol	RSP-P80	RSP-LS75	RSP-Sol
Mozak	C _{max} (ng/g)	145,19	134,92	196,10	1,24	1,09	1,85	145,81	136,01	197,59
		± 29,37	± 7,77	± 3,79	± 0,17	± 0,05	± 0,10**	± 29,10	± 7,83	± 3,91
	T _{max} (h)	0,44	0,25	0,25	2,17	2,17	4,17	0,44	0,25	0,25
		± 0,28	± 0	± 0	± 1,92	± 1,92	± 1,83	± 0,28	± 0	± 0
	AUC _{0-24 h} (h ng/g)	491,61	485,00	372,26	15,74	12,06	27,88	507,57	497,06	400,14
		± 18,84	± 73,07	± 16,54	± 2,84	± 1,50*	± 4,06	± 20,83	± 71,59	± 12,48
	AUMC _{0-24 h} (h ² ng/g)	4142,04	3926,10	3578,23	96,11	69,68	282,16	4243,34	3995,78	3860,40
		± 185,19	± 207,95	± 169,62	± 18,59	± 10,09*	± 88,80	± 198,03	± 201,01	± 104,27
	MRT (h)	8,42	8,39	9,63	6,10	5,76	9,71	8,36	8,31	9,66
		± 0,06	± 1,03	± 0,41	± 0,23	± 0,24	± 1,77 [†]	± 0,05	± 0,98	± 0,36
f _u (%) ^a	17,61	15,50	15,10	–	–	–	–	–	–	
	± 2,74	± 1,30	± 0,61							
K _p	0,47	0,38	0,43	0,25	0,27	0,40	0,46	0,38	0,42	
	± 0,05	± 0,11	± 0,04	± 0,02	± 0,02	± 0,07	± 0,05	± 0,11	± 0,04	
K _{p,uu}	2,30	1,47	2,84	–	–	–	–	–	–	
	± 0,26	± 0,42	± 0,30							
R	1,32	1,30	–	0,56	0,43	–	1,27	1,24	–	
DTI	1,11	0,90	–	0,63	0,68	–	1,09	0,90	–	

Tabela 4.3.2. (nastavak)

Tkivo	Farmakokinetički parametar	Risperidon			9-OH-Risperidon			Risperidon + 9-OH-Risperidon		
		RSP-P80	RSP-LS75	RSP-Sol	RSP-P80	RSP-LS75	RSP-Sol	RSP-P80	RSP-LS75	RSP-Sol
Jetra	C _{max} (ng/g)	3210,31	3645,57	3396,20	52,25	55,85	56,61	3223,98	3657,05	3411,82
		± 469,83	± 525,78	± 520,23	± 3,99	± 3,64	± 3,55	± 471,68	± 523,61	± 519,16
	T _{max} (h)	0,083	0,083	0,083	2,25	0,25	0,42	0,083	0,083	0,083
		± 0	± 0	± 0	± 1,88	± 0	± 0,08	± 0	± 0	± 0
	AUC _{0-24 h} (h ng/g)	2777,48	2294,28	2732,63	475,68	270,58	362,24	3253,16	2564,86	3094,87
		± 271,99	± 335,08	± 454,60	± 112,29	± 51,03	± 71,31	± 167,38	± 293,94	± 495,56
	AUMC _{0-24 h} (h ² ng/g)	7830,97	4160,63	10748,88	2465,51	1254,88	1918,60	10296,48	5415,51	12667,47
		± 1011,86	± 84,29	± 2665,81	± 620,13	± 352,33	± 390,75	± 1005,47	± 324,45	± 2938,63
MRT (h)	2,84	1,89	3,80	5,15	4,49	5,28	3,18	2,19	3,98	
	± 0,29	± 0,26*	± 0,42	± 0,07	± 0,38	± 0,11	± 0,33	± 0,36*	± 0,38	
K _p	2,64	1,74	3,18	7,39	5,94	5,08	2,92	1,88	3,32	
	± 0,25	± 0,31	± 0,69	± 0,08*	± 0,06	± 0,70	± 0,24	± 0,29	± 0,70	
R	1,02	0,84	–	1,31	0,75	–	1,05	0,83	–	
DTI	0,83	0,55	–	1,46	1,17	–	0,88	0,57	–	

$F_{rel} = AUC_{0-t, plazma, nanoemulzija} / AUC_{0-t, plazma, rastvor}$; $K_p = AUC_{0-t, tkivo} / AUC_{0-t, plazma}$; $R = AUC_{0-t, tkivo, nanoemulzija} / AUC_{0-t, tkivo, rastvor}$; $DTI = K_p, nanoemulzija / K_p, rastvor$.

^a*ex vivo* određene slobodne frakcije risperidona; *in vitro* slobodne frakcije risperidona bile su: $f_{u, plazma} = 0,0235 \pm 0,002$, $f_{u, mozak} = 0,1076 \pm 0,0044$.

* $p < 0,05$ u poređenju sa RSP-Sol (AUMC_{0-24 h}, plazma: ANOVA, $F_{(2,6)} = 5,348$; $p = 0,046$; AUC_{0-24 h}, mozak: ANOVA, $F_{(2,6)} = 7,663$; $p = 0,022$; AUMC_{0-24 h}, mozak: ANOVA, $F_{(2,6)} = 7,181$; $p = 0,026$; MRT, jetra (risperidon): ANOVA, $F_{(2,6)} = 8,449$; $p = 0,018$; MRT, jetra (aktivni oblik): ANOVA, $F_{(2,6)} = 6,330$; $p = 0,033$; K_p, jetra: ANOVA, $F_{(2,6)} = 8,143$; $p = 0,020$); ** $p < 0,01$ u poređenju sa RSP-P80 i RSP-LS75 (ANOVA, $F_{(2,6)} = 11,184$; $p = 0,009$); # $p < 0,05$ u poređenju sa RSP-P80 i RSP-Sol (MRT, plazma (risperidon): Kruskal–Wallis test, $H = 6,489$; $df = 2$; $p = 0,039$; MRT, plazma (aktivni oblik): Kruskal–Wallis test, $H = 5,956$; $df = 2$; $p = 0,051$; poređenje parova primenom Mann–Whitney *U* testa); † $p < 0,05$ u poređenju sa RSP-P80 i RSP-LS75 (MRT, mozak: Kruskal–Wallis test, $H = 5,956$; $df = 2$; $p = 0,051$; poređenje parova primenom Mann–Whitney *U* testa).

Kao što grafici pokazuju (slika 4.3.4), nakon primene dve nanoemulzije risperidona, RSP-P80 i RSP-LS75, i rastvora risperidona, RSP-Sol, najveće prosečne koncentracije risperidona, njegovog 9-hidroksi metabolita, i, stoga, ukupne aktivne forme, nađene su u jetri, zatim u plazmi, i onda u mozgu, što je rezultovalo istim poretkom vrednosti za ukupnu ekspoziciju leka ($AUC_{0-24\text{ h}}$) u ovim tkivima: jetra > plazma > mozak (tabela 4.3.2). Dodatno, kod svih formulacija, koncentracije metabolički formiranog 9-OH-risperidona bile su za najmanje jedan red veličine niže od koncentracija roditeljskog risperidona u svim matriksima. Shodno tome, profili koncentracija–vreme (slika 4.3.4) i farmakokinetički parametri (tabela 4.3.2) ukupnog aktivnog oblika risperidona sledili su obrazac sličan samom risperidonu, što ukazuje na to da je 9-OH-risperidon nakon intraperitonealne primene ispitivanih nanoemulzija risperidona i rastvora risperidona kod pacova mogao neznatno da doprinese farmakološkoj aktivnosti risperidona.

U plazmi (slika 4.3.4a), prosečne koncentracije risperidona i sume risperidona i 9-OH-risperidona naginjale su ka većim vrednostima sa nanoemulzijama nego sa rastvorom u kasnijim vremenskim tačkama (1–24 h nakon injektovanja, osim u 6 h), sa značajnom razlikom uočenom 24 h posle primene za risperidon formulisan u obe nanoemulzije, RSP-P80 i RSP-LS75 (Kruskal–Wallis test, $H = 7,200$; $df = 2$; $p = 0,027$), ili u slučaju aktivnog oblika sa RSP-LS75 nanoemulzijom (ANOVA, $F_{(2,6)} = 7,720$; $p = 0,022$), u poređenju sa kontrolnim rastvorom. Kao što je prethodno objašnjeno, razlog bi mogao biti eventualno formiranje depoa risperidona na mestu injektovanja nakon intraperitonealne primene nanoemulzija ili sporije oslobađanje inkorporiranog risperidona iz uljane u vodenu fazu nanoemulzije, a odatle u krv (Chen i sar., 2010; Lu i sar., 2009), što je očigledno povezano sa metaboličkom degradacijom (tj. shemom lipolize) nanoemulzija u organizmu (Wulf-Pérez i sar., 2012). Osim toga, prosečne koncentracije 9-OH-risperidona u plazmi nakon primene dve nanoemulzije risperidona nisu se značajno razlikovale od koncentracija dobijenih nakon primene rastvora risperidona u većini vremenskih tačaka, izuzev u 1 h, gde je koncentracija 9-OH-risperidona nastalog nakon primene RSP-P80 nanoemulzije bila značajno veća (ANOVA, $F_{(2,6)} = 6,290$; $p = 0,034$) od koncentracije dobijene sa rastvorom risperidona. Kada se uporede maksimalne koncentracije u plazmi (C_{\max}) i vremena za postizanje maksimalnih koncentracija (T_{\max}) risperidona, 9-OH-risperidona ili ukupnog aktivnog oblika, između ispitivanih nanoemulzija i rastvora risperidona nisu uočene značajne

razlike (tabela 4.3.2). Sa svim formulacijama, maksimalne koncentracije risperidona u plazmi postignute su u okviru 5 min nakon primene, što ukazuje na relativno brzu resorpciju u sistemsku cirkulaciju i sledstvenu brzu distribuciju u jetru (pik u 5 min) i moždano tkivo (pik u 15 min), izuzev sa RSP-P80 nanoemulzijom kojoj je bilo potrebno duže ali varijabilno vreme (5–60 min, od seta do seta) da postigne maksimalnu koncentraciju risperidona u mozgu. Kada je u pitanju metabolit 9-OH-risperidon, nastao nakon primene ispitivanih formulacija risperidona, primećeno je da se C_{max} u plazmi postiže očekivano sporije (između 15 min i 1 h), što je rezultovalo sporijom distribucijom u moždano tkivo i jetru, takođe (tabela 4.3.2).

U moždanom tkivu (slika 4.3.4b), prosečne koncentracije risperidona i njegovog ukupnog aktivnog oblika bile su u početnim vremenskim tačkama niže (5–30 min nakon primene, značajno u 15 min, risperidon: ANOVA, $F_{(2,6)} = 39,055$; $p < 0,001$; aktivni oblik: ANOVA, $F_{(2,6)} = 38,560$; $p < 0,001$), a u kasnijim vremenskim tačkama više (1–3 h nakon primene, značajno u 1 h, risperidon: Kruskal–Wallis test, $H = 5,956$; $df = 2$, $p = 0,051$; aktivni oblik: ANOVA, $F_{(2,6)} = 11,032$; $p = 0,01$) nakon primene RSP-P80 i RSP-LS75 nanoemulzija u poređenju sa rastvorom risperidona, ali su ove razlike nestale nakon 6 h od primene. Što se pak tiče koncentracija 9-OH-risperidona u mozgu, značajne razlike su detektovane kod RSP-LS75 nanoemulzije sa kojom su dobijene veće koncentracije od RSP-P80 nanoemulzije 5 min nakon primene (ANOVA, $F_{(2,6)} = 8,134$; $p = 0,02$) i rastvora risperidona 1 h nakon primene (ANOVA, $F_{(2,6)} = 14,959$; $p = 0,005$), dok su nivoi bili značajno niži od onih dobijenih sa rastvorom risperidona 15 min (ANOVA, $F_{(2,6)} = 5,751$; $p = 0,040$), 30 min (ANOVA, $F_{(2,6)} = 7,200$; $p = 0,025$) i 6 h nakon primene (ANOVA, $F_{(2,6)} = 6,049$; $p = 0,036$). Iako su se određeni trendovi mogli prepoznati, velika interindividualna varijabilnost u koncentracijama risperidona i, naročito, 9-OH-risperidona, zabeležena u mozgu u različitim vremenskim tačkama nakon primene, zapravo je mogla da maskira očigledne razlike između ispitivanih formulacija risperidona.

U jetri (slika 4.3.4c), tendencija većih prosečnih koncentracija risperidona i, samim tim, ukupnog aktivnog oblika, zapažena je nakon intraperitonealne primene RSP-P80 i RSP-LS75 nanoemulzija u poređenju sa rastvorom u većini vremenskih tačaka, sa značajnom razlikom za RSP-P80 vs. RSP-Sol, 1 h nakon primene (risperidon: ANOVA, $F_{(2,6)} = 5,984$; $p = 0,037$; aktivni oblik: ANOVA, $F_{(2,6)} = 6,541$; $p = 0,031$). Međutim, u 6 h,

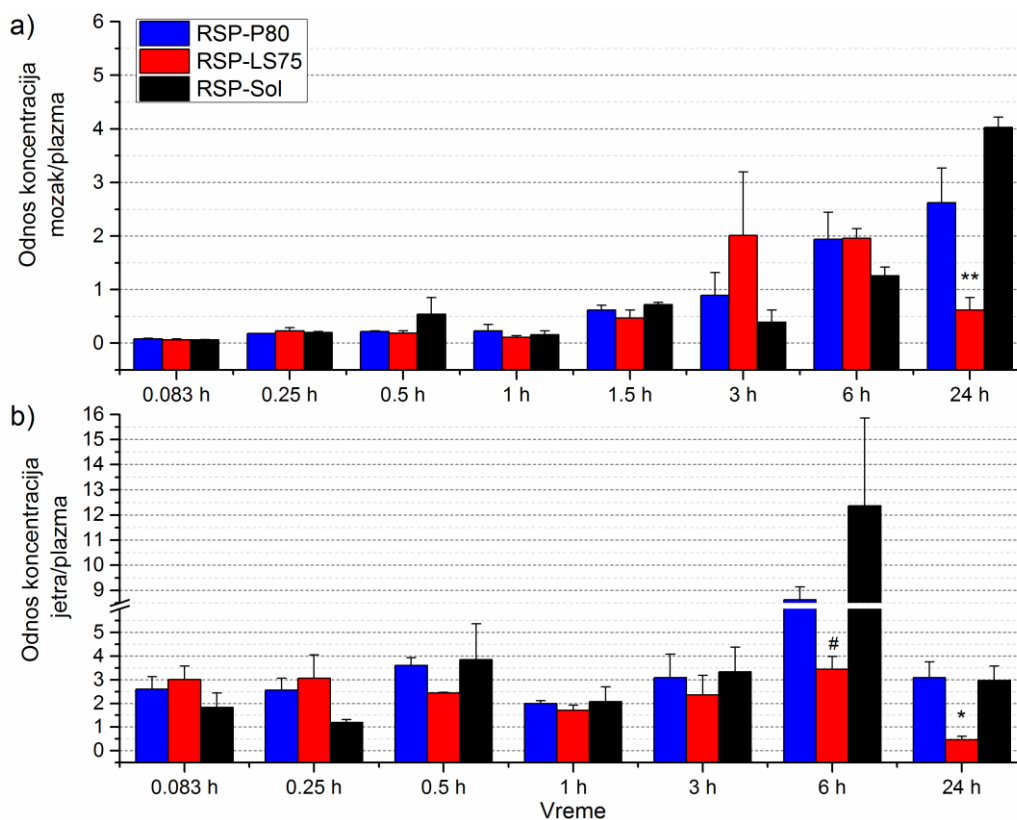
prosečne koncentracije risperidona i ukupnog aktivnog oblika u jetri bile su značajno niže kod pacova tretiranih nanoemulzijama risperidona u poređenju sa onima koji su dobili rastvor risperidona (risperidon: Kruskal–Wallis test, $H = 7,200$; $df = 2$; $p = 0,027$ za RSP-P80 i RSP-LS75 vs. RSP-Sol; aktivni oblik: ANOVA, $F_{(2,6)} = 8,876$; $p = 0,016$ za RSP-LS75 vs. RSP-Sol), a u slučaju risperidona, takođe značajno niže u pacova koji su primili RSP-LS75 nanoemulziju u odnosu na pacove tretirane RSP-P80 formulacijom (Kruskal–Wallis test, $H = 7,200$; $df = 2$; $p = 0,027$). U pogledu koncentracija 9-OH-risperidona u jetri, trend većih koncentracija zapažen je sa nanoemulzijama risperidona u poređenju sa rastvorom (osim u 5 min), sa značajnom razlikom između RSP-P80 i RSP-Sol, i RSP-LS75 i RSP-Sol, 1 h nakon primene (ANOVA, $F_{(2,6)} = 11,589$; $p = 0,009$).

Što se tiče farmakokinetičkih parametara, podaci dobijeni za plazmu pokazali su trend većih $AUC_{0-24 h}$ i značajno ($p < 0,05$) većih $AUMC_{0-24 h}$ i MRT vrednosti kada je risperidon primenjen u vidu ispitivanih nanoemulzija u poređenju sa rastvorom, dok su respektivni klirensi bili niži, što je dovelo do oko 20% i 50% povećanja relativne biološke raspoloživosti risperidona i, stoga, ukupnog aktivnog oblika, sa RSP-P80 i RSP-LS75 nanoemulzijom, respektivno. Ovakav rezultat bi se mogao pripisati dovoljno malim (< 200 nm) nanoemulzionim kapima pokrivenim kombinovanim lecitin/natrijum-oleat (kod RSP-LS75) ili lecitin/natrijum-oleat/P80 (kod RSP-P80) filmom, iz čega proističe njihovo produženo vreme cirkulacije u krvi i veće izbegavanje RES u jetri, što je potkrepljeno farmakokinetičkim profilima ispitivanih formulacija risperidona u jetri. Redosled prosečnih $AUC_{0-24 h}$, $AUMC_{0-24 h}$ i MRT risperidona i aktivnog oblika u plazmi bio je: RSP-LS75 > RSP-P80 > RSP-Sol, dok su u jetri najveće prosečne $AUMC_{0-24 h}$ i MRT vrednosti zapažene sa RSP-Sol, zatim RSP-P80, i na kraju RSP-LS75 formulacijom (tabela 4.3.2).

Iako u moždanom tkivu značajne razlike nisu nađene ni u jednom od ispitivanih farmakokinetičkih parametara (C_{max} , T_{max} , $AUC_{0-24 h}$, $AUMC_{0-24 h}$, MRT) risperidona i ukupnog aktivnog oblika izračunatih za dve nanoemulzije i rastvor risperidona, izvesni trendovi su se ipak mogli uočiti. Na primer, prosečne C_{max} i MRT vrednosti u mozgu imale su tendenciju da budu niže, a vrednosti $AUC_{0-24 h}$ i $AUMC_{0-24 h}$ da budu više kada je risperidon primenjen u vidu ispitivanih nanoemulzija u poređenju sa rastvorom (tabela 4.3.2), ukazujući time na povećanu biološku raspoloživost risperidona iz

primenjenih formulacija nanoemulzija. Kao što je već diskutovano, ovaj trend mogao bi se verovatno pripisati specifičnom ponašanju na ulje–voda međupovršini RSP-P80 i RSP-LS75 nanoemulzija, uzrokovanom prisustvom P80 i natrijum-oleata, obećavajućih funkcionalnih ekscipijenasa za koje se pretpostavlja da promovišu preuzimanje lekovite supstance u mozak.

Kao indikator ciljne isporuke u mozak, u svakoj vremenskoj tački izračunati su mozak–plazma odnosi koncentracija ukupnog aktivnog oblika risperidona iz različitih formulacija (slika 4.3.5a). Bilo je očigledno da prosečne koncentracije sume risperidona i 9-OH-risperidona u plazmi nakon intraperitonealne primene RSP-P80 i RSP-LS75 nanoemulzija, kao i rastvora risperidona, nadmašuju koncentracije u mozgu u većini vremenskih tačaka, u skladu sa prethodnim nalazima, što nije iznenađujuće ako se uzme u obzir relativno niska lipofilnost risperidona ($\log P$ 3,04) i njegovog metabolita 9-OH-risperidona ($\log P$ 2,32), kao i njihov efluks od strane P-glikoproteina na KMB (Aravagiri i Marder, 2002; Bundgaard i sar., 2012). Pa ipak, činjenica da je odnos koncentracija aktivnog oblika risperidona u mozgu i plazmi težio da bude veći od jedan kada je risperidon primenjen u vidu RSP-LS75 (u 3 h i 6 h) ili RSP-P80 nanoemulzije (6 h i 24 h nakon doziranja) mogla bi da ukaže na potencijal ovih nanonosaa za ciljnu isporuku risperidona u mozak. Pored toga, slika 4.3.5b pokazuje da su dve ispitivane nanoemulzije risperidona, kao i rastvor risperidona, imale veće prosečne koncentracije aktivnog oblika risperidona u jetri u odnosu na plazmu, sa prosečno nižim jetra–plazma odnosima koncentracija za formulacije nanoemulzija u poređenju sa rastvorom (0,5–6 h nakon primene), što ukazuje na nižu penetraciju u jetru ukupnog aktivnog oblika risperidona kada je risperidon inkorporiran u nanoemulzije (videti K_p i DTI vrednosti u tabeli 4.3.2).



Slika 4.3.5. Mozak–plazma (a) i jetra–plazma (b) odnosi koncentracija ukupnog aktivnog oblika risperidona nakon intraperitonealne primene nanoemulzija risperidona (RSP-P80, RSP-LS75) i rastvora risperidona (RSP-Sol) kod pacova (srednja vrednost \pm standardna greška, $n = 3$); * $p < 0,05$ u poređenju sa RSP-P80 i RSP-Sol (ANOVA, $F_{(2,6)} = 8,123$; $p = 0,02$); ** $p < 0,01$ u poređenju sa RSP-P80 i RSP-Sol (ANOVA, $F_{(2,6)} = 17,284$; $p = 0,003$); # $p < 0,05$ u poređenju sa RSP-Sol (ANOVA, $F_{(2,6)} = 7,314$; $p = 0,025$).

Generalno, sa svim ispitivanim formulacijama risperidona, ukupni nivoi u mozgu ($AUC_{0-24\text{ h, mozak}}$) risperidona, njegovog 9-OH-metabolita i ukupnog aktivnog oblika bili su niži od nivoa nađenih u plazmi ($AUC_{0-24\text{ h, plazma}}$), što je rezultovalo sveukupnim mozak–plazma odnosom ekspozicije, tj. mozak–plazma particionim koeficijentom ($K_{p, \text{mozak}}$) nižim od jedan (tabela 4.3.2). Međutim, u skladu sa „hipotezom slobodnog leka“ (Gupta i sar., 2006; Liu i sar., 2009; Loryan i sar., 2016), predloženo je da nevezani (slobodni) oblik risperidona pre nego ukupni (vezani plus nevezani) risperidon može da se distribuira u mozak i izazove farmakološki efekat. Prema tome, da bi se bolje opisao transport kroz KMB i direktno kvantifikovala efikasnost penetracije u mozak

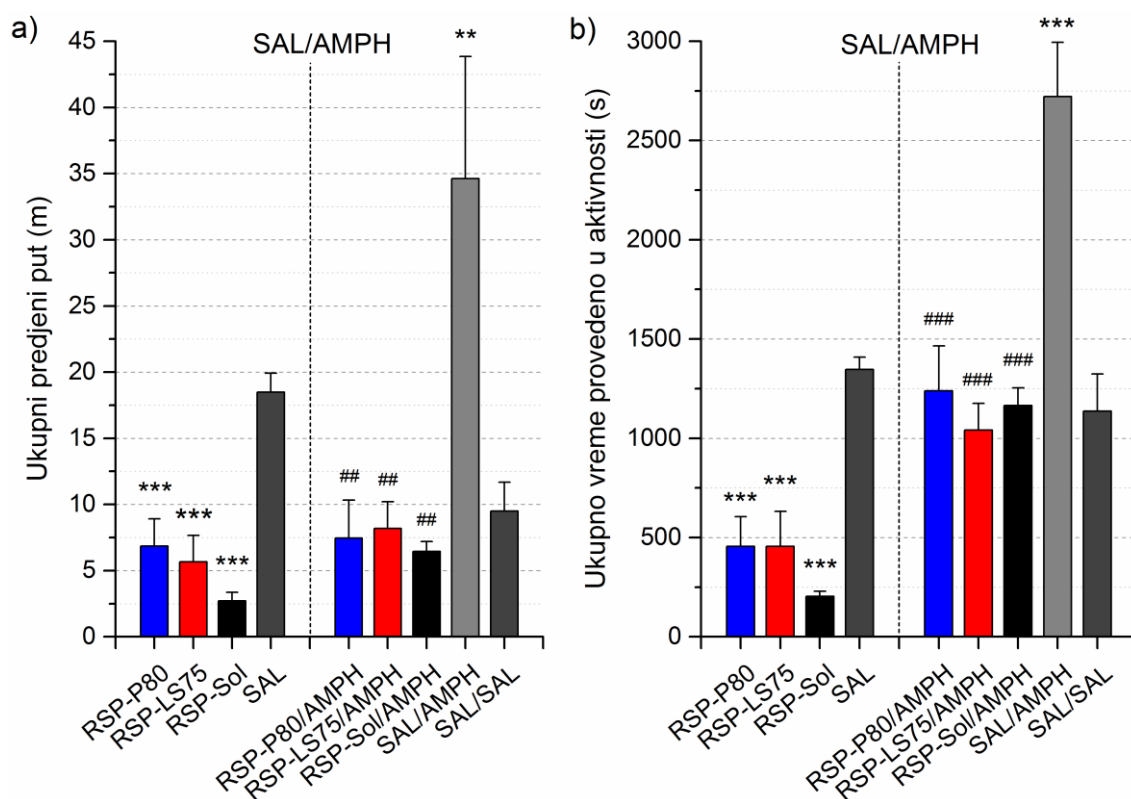
risperidona primenjenog u vidu nanoemulzija ili rastvora, izračunat je nevezani mozak–plazma particioni koeficijent ($K_{p,uu, \text{mozak}}$), koji kompenzuje vezivanje za proteine plazme i vezivanje u moždanom tkivu. Kao što podaci u tabeli 4.3.2 pokazuju, trend većih slobodnih frakcija risperidona u plazmi i mozgu, ali nižeg slobodnog penetracionog faktora u mozgu ($K_{p,uu, \text{mozak}}$) mogao se uočiti kada je risperidon primenjen u vidu nanoemulzija u poređenju sa rastvorom. Štaviše, suprotno očekivanjima, utvrđeno je da je $K_{p,uu}$ u mozgu za obe nanoemulzije, kao i za rastvor risperidona, bio iznad jedinice (tabela 4.3.2), što ukazuje da u transport risperidona kroz KMB može biti uključen i aktivni proces preuzimanja (Bungaard i sar., 2012; Loryan i sar., 2016).

Na kraju su dve nanoemulzije risperidona i rastvor risperidona upoređene u pogledu efikasnosti isporuke u mozak primenom parametra R (relativna stopa/brzina preuzimanja). Kao što vrednosti u tabeli 4.3.2 pokazuju, raspoloživost risperidona u mozgu, a time i ukupnog aktivnog oblika, nakon primene RSP-P80 i RSP-LS75 nanoemulzija bila je oko 1,3 puta veća u poređenju sa rastvorom, što je značilo da P80-kostabilizovana nanoemulzija i nanoemulzija bez koemulgatora isporučuju risperidon u mozak bolje od rastvora risperidona. Veća penetracija u mozak može biti posledica proste difuzije kroz KMB slobodnog leka, oslobođenog iz formulacija nanoemulzija, kao i receptorom-posredovane endocitoze/transcitoze nanoemulzionih kapi sa inkorporiranim risperidonom. Pored toga, smanjeno preuzimanje aktivnog oblika risperidona u jetru, zapaženo u slučaju kada je risperidon bio nanoinkapsuliran (tabela 4.3.2), moglo bi da doprinese vrednosti ovih nanoemulzija kao obećavajućih nosača za ciljnu isporuku lekovite supstance u mozak.

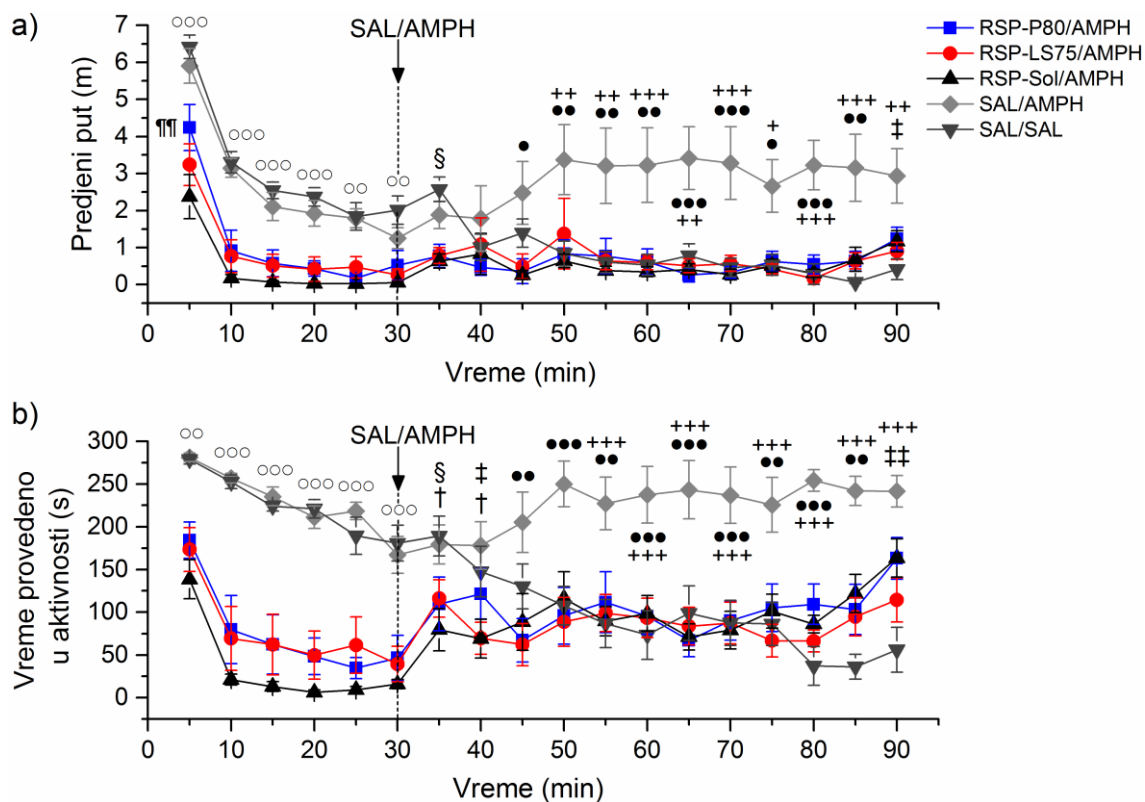
4.3.2. *In vivo* farmakodinamska studija na primeru nanoemulzija risperidona

Kao potpora farmakokinetičkim nalazima, a u cilju detaljnog razjašnjavanja da li bihevioralni efekti lekovite supstance primenjene parenteralno u vidu nanoemulzija mogu biti odraz profila koncentracija u plazmi i moždanom tkivu, sprovedena je farmakodinamska studija na pacovima. Tom prilikom, primenom modela amfetaminom-indukovane hiperlokomocije, na primeru dve nanoemulzije risperidona (RSP-P80 i RSP-LS75), u poređenju sa rastvorom (RSP-Sol), izvršena je karakterizacija antipsihotične efektivnosti, a sa krajnjim ciljem da se proceni potencijal formulisanih

nanoemulzija za lečenje akutnih psihotičnih epizoda ili akutne agitacije u službi urgentne medicine. Farmakološki efekti izazvani naznačenim tretmanima risperidonom prikazani su na slikama 4.3.6 i 4.3.7.



Slika 4.3.6. Efekti odabranih nanoemulzija risperidona (RSP-P80, RSP-LS75) i rastvora risperidona (RSP-Sol) na bazalnu i amfetaminom-indukovanu lokomotornu aktivnost, izraženo kao ukupni pređeni put (a) i ukupno vreme provedeno u aktivnosti (b), nakon intraperitonealne primene kod pacova (srednja vrednost \pm standardna greška, $n = 7-8$); ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ u poređenju sa kontrolnom (SAL ili SAL/SAL) grupom; ## $p < 0,01$ i ### $p < 0,001$ u poređenju sa AMPH grupom (SAL/AMPH).



Slika 4.3.7. Efekti odabranih nanoemulzija risperidona (RSP-P80, RSP-LS75) i rastvora risperidona (RSP-Sol) na bazalnu i amfetaminom-indukovanu lokomotornu aktivnost, izraženo kao pređeni put u petominutnim intervalima (a) i vreme provedeno u aktivnosti u petominutnim intervalima (b), nakon intraperitonealne primene kod pacova (srednja vrednost \pm standardna greška, $n = 7-8$); $^{\circ\circ}p < 0,01$ i $^{\circ\circ\circ}p < 0,001$ za RSP-P80, RSP-LS75, i RSP-Sol vs. SAL; $^{\text{¶¶}}p < 0,01$ za RSP-P80 vs. RSP-Sol; $^{\text{§}}p < 0,05$ za RSP-Sol/AMPH vs. SAL/SAL; $^{\text{†}}p < 0,05$ za RSP-Sol/AMPH vs. SAL/AMPH; $^{\text{‡}}p < 0,05$ i $^{\text{‡‡}}p < 0,01$ za RSP-LS75/AMPH vs. SAL/AMPH; $^{\bullet}p < 0,05$, $^{\bullet\bullet}p < 0,01$ i $^{\bullet\bullet\bullet}p < 0,001$ za RSP-P80/AMPH, RSP-LS75/AMPH i RSP-Sol/AMPH vs. SAL/AMPH; $^{++}p < 0,01$ i $^{+++}p < 0,001$ za SAL/SAL vs. SAL/AMPH.

Kao što grafici pokazuju, obe nanoemulzije i rastvor risperidona su nakon intraperitonealne primene kod pacova dovele do značajnog smanjenja bazalne (BLA) i amfetaminom-indukovane lokomotorne aktivnosti (AILA), praćeno parametrima pređeni put (slike 4.3.6a i 4.3.7a) i vreme provedeno u aktivnosti (slike 4.3.6b i 4.3.7b), u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim grupama. Jednofaktorska ANOVA je potvrdila da postoji značajan efekat vrste tretmana na pokretljivost pacova, odnosno, sve grupe koje su primile risperidon (RSP-P80, RSP-LS75; RSP-Sol) prešle su značajno

manje rastojanje i provele su značajno kraće vreme u aktivnosti u poređenju sa pacovima tretiranim fiziološkim rastvorom (SAL grupa) u prvoj, BLA fazi (ukupno pređeno rastojanje: $F_{(3,27)} = 17,132$; $p < 0,001$; ukupno vreme u aktivnosti: $F_{(3,27)} = 16,331$; $p < 0,001$), odnosno pacovima tretiranim fiziološkim rastvorom i amfetaminom (SAL/AMPH grupa) u drugoj, AILA fazi (ukupno pređeno rastojanje: $F_{(4,34)} = 6,752$; $p < 0,001$; ukupno vreme u aktivnosti: $F_{(4,34)} = 13,093$; $p < 0,001$) (slika 4.3.6).

Analiziranjem pređenog rastojanja i vremena provedenog u aktivnosti tokom petominutnih intervala u BLA fazi, dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem je otkrila značajan efekat vrste tretmana (pređeno rastojanje: $F_{\text{tretman } (3,28)} = 18,232$; $p < 0,001$; vreme u aktivnosti: $F_{\text{tretman } (3,28)} = 17,455$; $p < 0,001$), vremena proteklog od davanja tretmana (pređeno rastojanje: $F_{\text{vreme } (5,140)} = 143,834$; $p < 0,001$; vreme u aktivnosti: $F_{\text{vreme } (5,140)} = 79,123$; $p < 0,001$), kao i značajnu tretman \times vreme interakciju (pređeno rastojanje: $F_{\text{interakcija } (15,140)} = 3,040$; $p < 0,001$; vreme u aktivnosti: $F_{\text{interakcija } (15,140)} = 2,555$; $p = 0,002$). Sve procedure višestrukog poređenja parova (Bonferoni *t*-test) pokazale su značajne ($p < 0,05$) razlike između grupa tretiranih risperidonom (RSP-P80 i RSP-LS75 nanoemulzije, RSP-Sol) i kontrolne SAL grupe u svakom intervalu (slika 4.3.7). Tokom prvih 5 min, pacovi tretirani nanoemulzijom RSP-P80 prešli su značajno ($p < 0,01$) duži put od pacova tretiranih rastvorom RSP-Sol (slika 4.3.7a); iako se dodatne razlike između risperidon-grupa u BLA fazi nisu mogle detektovati, može se zaključiti sa slike 4.3.7a, i posebno 4.3.7b, da rastvor risperidona ispoljava izraženiji sedativni efekat nego risperidon u nanoemulzijama. Ovaj nalaz bi mogao da ukaže na eventualno blaži sedativni neželjeni efekat nanoemulzija, bez kompromitovanja njihovog antipsihotičnog potencijala (kao što je pokazano u AILA fazi).

Kada su efekti nanoemulzija risperidona i rastvora risperidona na amfetaminom-indukovanu hiperlokomociju kod pacova analizirani tokom vremena (AILA faza, petominutni intervali), značajne razlike su zapažene za tretman kao nezavisni faktor (pređeno rastojanje: $F_{\text{tretman } (4,35)} = 7,117$; $p < 0,001$; vreme provedeno u aktivnosti: $F_{\text{tretman } (4,35)} = 12,933$; $p < 0,001$), kao i za interakciju tretman \times vreme (pređeno rastojanje: $F_{\text{interakcija } (44,385)} = 2,555$; $p < 0,001$; vreme u aktivnosti: $F_{\text{interakcija } (44,385)} = 2,297$; $p < 0,001$). U prvom intervalu AILA faze (30–35 min), dvofaktorska ANOVA praćena Bonferoni *post hoc* poređenjima pokazala je značajno ($p < 0,05$) niže vrednosti za vreme provedeno u aktivnosti kod RSP-Sol/AMPH grupe u poređenju sa SAL/SAL

grupom i SAL/AMPH grupom, potvrđujući izražen sedativni efekat RSP-Sol, što ide u prilog izraženoj sedaciji komentarisanoj za ovu formulaciju risperidona u BLA fazi. U sledećem stupnju (35–40 min), značajna ($p < 0,05$) razlika postojala je u vremenu provedenom u aktivnosti između SAL/AMPH grupe i RSP-Sol/AMPH i RSP-LS75/AMPH grupa; međutim, nijedna od navedenih grupa se nije razlikovala od SAL/SAL grupe, te ovaj nalaz nije bilo moguće nedvosmisleno interpretirati. Između 40 min i 85 min, sve risperidon-grupe (RSP-P80, RSP-LS75 i RSP-Sol) prešle su značajno ($p < 0,05$) manje rastojanje i provele su značajno ($p < 0,05$) kraće vreme u aktivnosti u poređenju sa SAL/AMPH grupom. Konačno, u poslednjem intervalu (85–90 min), značajna razlika je nađena jedino između SAL/AMPH grupe i RSP-LS75/AMPH grupe za oba posmatrana parametra, pređeni put ($p < 0,05$) (slika 4.3.7a) i vreme provedeno u aktivnosti ($p < 0,01$) (slika 4.3.7b), što ukazuje na tendenciju RSP-LS75 nanoemulzije da potencijalno ostvari produžen antipsihotični efekat.

Ukratko, nakon intraperitonealne primene, obe ispitivane nanoemulzije risperidona (RSP-P80 i RSP-LS75) indukovale su brzu, efikasnu i stabilnu redukciju spontane lokomotorne aktivnosti i, što je još važnije, hiperlokomotorne aktivnosti izazvane amfetaminom kod pacova, sa komparabilnim ili čak povoljnijim profilima u poređenju sa rastvorom risperidona (RSP-Sol). Uočene diskretne razlike u bihevioralnim performansama risperidona nakon njegovog inkorporiranja u parenteralne nanoemulzije ogledale su se u manje izraženoj sedaciji, a u slučaju nanoemulzije bez dodatog koemulgatora, i produženom antipsihotičnom dejstvu, u poređenju sa rastvorom risperidona. Navedeni nalazi, zajedno sa povoljnim fizičko-hemijskim i farmakokinetičkim svojstvima, mogli bi da ukažu na potencijalnu prednost razvijenih nanoemulzija risperidona nad trenutno dostupnim formulacijama na tržištu, u lečenju agitiranih i nekooperativnih akutnih psihotičnih pacijenata.

5. ZAKLJUČAK

Zaključak prve faze eksperimentalnog rada

- Nakon odabira odgovarajućih visoko bezbednih, biokompatibilnih i funkcionalnih ekscipijenasa, primenom metodologije eksperimentalnog dizajna formulisane su i metodom homogenizacije pod visokim pritiskom (500 bar, 9/10 ciklusa) na hladno (25°C) ili toplo (50°C) uspešno izrađene parenteralne nanoemulzije kao perspektivni nosači za slabo rastvorljive psihofarmakološke lekovite supstance. Razvijene formulacije nanoemulzija, bez i sa inkorporiranom model lekovitom supstancom, izrađene su sa smešom MCT i sojinog ulja u odnosu 4:1 (m/m) kao uljanom fazom, fosfatnim puferom odgovarajuće pH vrednosti ili ultračistom vodom koja je sadržala natrijum-oleat kao vodenom fazom, dok su lecitin i P80, PL188 ili SHS15, upotrebljeni kao emulgatori, odnosno koemulgatori.
- Fizičko-hemijska karakterizacija i procena stabilnosti dizajniranih nanoemulzija pokazale su zadovoljavajući nanometarski opseg veličina kapi (Z-Ave 107–220 nm, d(0.5) 145–200 nm), relativno usku raspodelu veličina (PDI < 0,15), visoko površinsko naelektrisanje (ZP –30 mV do –60 mV), nizak viskozitet (3–15 mPa·s) i pH vrednost između 7 i 8, sa manjim varijacijama u navedenim parametrima tokom dva, odnosno četiri meseca čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$, kao i nakon sterilizacije parom (121°C, 15 min), potvrđujući njihovu pogodnost za parenteralnu primenu. Generalno, nanoemulzije izrađene sa sojinim lecitinom bile su robusnije i stabilnije od nanoemulzija sa lecitinom iz jajeta; isto tako su nanoemulzije izrađene sa natrijum-oleatom (kao dodatnim stabilizatorom i puferskim sredstvom) u vodenoj fazi bile manje podložne promenama od nanoemulzija sa fosfatnim puferom, te se mogu smatrati obećavajućim nosačima za parenteralnu primenu i isporuku slabo rastvorljivih lekovitih supstanci.
- Primena koncepta eksperimentalnog dizajna tokom procesa razvoja nanoemulzija omogućila je adekvatnu procenu istovremenog uticaja različitih formulacionih i procesnih faktora – sadržaja ulja, vrste lecitina, vrste koemulgatora, vrste vodene faze, prisustva lekovite supstance, i temperature homogenizacije, na kritične atribute kvaliteta izrađenih nanoemulzija. Rezultati

sprovedenog punog faktorskog i generalnog faktorskog dizajna su pokazali da ne samo ispitivani pojedinačni faktori, već interakcije između ovih faktora, značajno utiču na veličinu kapi, PDI, ZP i viskozitet razvijenih nanoemulzionih sistema. Na osnovu rezultata eksperimentalnog dizajna i preliminarnih studija stabilnosti bilo je moguće definisati optimalni sastav formulacije i uslova izrade nanoemulzija koje su u pogledu fizičko-hemijskih svojstava zadovoljavale kriterijume parenteralnog puta primene.

Zaključak druge faze eksperimentalnog rada

- Oslanjajući se na rezultate punog faktorskog dizajna i sprovedene studije kratkoročne stabilnosti (dva meseca na $25 \pm 2^\circ\text{C}$), homogenizacijom pod visokim pritiskom (500 bar, 25°C , 9 ciklusa) uspešno su izrađene parenteralne nanoemulzije sa rastućom koncentracijom uljane faze (20%, 30% i 40% smeše MCT i sojinog ulja, 4:1, m/m), te većim kapacitetom za inkorporiranje lekovite supstance, stabilizovane kombinacijom lecitina i P80, uz upotrebu diazepama kao model lekovite supstance. Fizičko-hemijske karakteristike, pre svega mala prosečna veličina kapi ($Z\text{-Ave } 206 \pm 7 \text{ nm}$), relativno uska raspodela veličina (PDI $0,116 \pm 0,012$), visoke vrednosti površinskog naelektrisanja (ZP oko -50 mV) i nizak prividni viskozitet ($12 \pm 9 \text{ mPa}\cdot\text{s}$), kao i stabilnost tokom godinu dana čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$, ukazuju na pogodnost formulisanih nanoemulzija sa 20%, 30% i 40% uljane faze za parenteralnu primenu i isporuku slabo rastvorljivih lekovitih supstanci.
- U funkciji najboljih fizičko-hemijskih osobina i stabilnosti tokom četiri meseca čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$ kao i nakon sterilizacije parom, među nanoemulzijama dobijenim u okviru eksperimentalnog prostora generalnog faktorskog dizajna odabrane su tri najpogodnije formulacije, koje su zapravo sadržale natrijum-oleat u vodenoj fazi i P80, PL188 ili SHS15 kao koemulgatore, i u njih inkorporiran risperidon kao model slabo rastvorljive psihofarmakološke lekovite supstance. Razvijene nanoemulzije risperidona, kao i kontrolna nanoemulzija, takođe na bazi lecitina, ali bez dodatog koemulgatora, izrađene toplim postupkom homogenizacije pod visokim pritiskom (500 bar, 50°C , 10 ciklusa), odlikovale su se fizičko-hemijskim parametrima pogodnim za parenteralnu

primenu (Z-Ave 171 ± 23 nm; $d(0.99)$ 190–220 nm; PDI $0,11 \pm 0,02$; ZP – 52 ± 6 mV; pH $8,4 \pm 0,2$; i prividni viskozitet 7 ± 3 mPa·s). U pogledu stabilnosti, sve ispitivane probe/uzorci nanoemulzija risperidona, filtrirane ($0,22 \mu\text{m}$) i autoklavirane (121°C , 15 min), bile su robusne i stabilne tokom najmanje godinu dana čuvanja na $25 \pm 2^\circ\text{C}$, što ukazuje na mogućnost industrijske proizvodnje i dodatno potvrđuje pogodnost razvijenih formulacija nanoemulzija kao nosača za parenteralnu primenu u vodi slabo rastvorljivih lekovitih supstanci.

- Karakterizacija razvijenih nanoemulzija primenom AFM tehnike potvrdila je rezultate merenja veličine kapi, pokazujući da su u ispitivanim uzorcima nanoemulzija sa diazepamom i risperidonom kao model lekovitim supstancama prisutne male, sferične, homogene kapi nanovelicina, sa prosečnim dijametrom oko 200–250 nm, pri čemu nije detektovano prisustvo većih kapi, agregata ili nerastvorenih kristala model lekovite supstance.
- Nalazi dobijeni termalnom analizom razvijenih nanoemulzija sa diazepamom i risperidonom kao model lekovitim supstancama pokazali su odsustvo pikova karakterističnih za topljenje inkorporirane lekovite supstance, što ukazuje da su diazepam i risperidon verovatno molekularno dispergovani, odnosno rastvoreni u uljanoj fazi nanoemulzija. Poređenjem FT-IR spektara odgovarajućih placebo nanoemulzija i nanoemulzija sa inkorporiranim diazepamom i risperidonom kao model lekovitim supstancama nisu detektovani specifični pikovi koji potiču od lekovite supstance, ni nove trake, niti je bilo pomeranja postojećih apsorpcionih traka, čime je potvrđeno odsustvo bilo kakve hemijske interakcije između inkorporirane lekovite supstance i drugih komponenata nanoemulzija. Rezultati dobijeni FT-IR spektroskopskom analizom bili su saglasni sa rezultatima DSC metode, što je ukazivalo da su diazepam i risperidon homogeno dispergovani u nanoemulzijama, bez bilo kakve intermolekulske lek–nosač interakcije, ili bilo kakvih naznaka eventualne rekristalizacije inkorporirane model lekovite supstance.
- *In vitro* ispitivanje brzine oslobađanja model lekovite supstance iz formulisanih parenteralnih nanoemulzija – diazepam iz nanoemulzija sa 20%, 30% i 40% uljane faze, stabilizovanih smešom lecitina i P80; i risperidona iz nanoemulzija sa 20% uljane faze, stabilizovanih lecitinom ili smešom lecitin/P80 –

sprovedeno primenom tehnike reverzne dijalize sa vrećicama, pokazalo je bifazne profile oslobađanja, sa 40–50% oslobođenog diazepama nakon 60 min i preko 95% oslobođenog risperidona nakon 180 min, pri čemu se kinetika oslobađanja može opisati Korsmeyer–Peppas modelom. Mada su u profilima brzine oslobađanja model lekovitih supstanci inkorporiranih u nanoemulzije postojale određene značajne razlike zavisno od sastava formulacije, generalno se može zaključiti da je oslobađanje diazepama, kao i risperidona, iz razvijenih parenteralnih nanoemulzija relativno brzo; da se sa povećanjem koncentracije uljane faze smanjuje frakcija oslobođenog diazepama; a da inicijalne razlike u količini oslobođenog risperidona između nanoemulzija stabilizovanih lecitinom sa i bez P80 kao koemulgatora, nestaju u funkciji vremena (nakon 60 min). Takođe, dobijeni *in vitro* profili brzine oslobađanja diazepama i risperidona iz ispitivanih nanoemulzionih sistema relativno dobro koreliraju sa farmakokinetičkim rezultatima dobijenim nakon intraperitonealne primene ovih nanoemulzija kod pacova.

Zaključak treće faze eksperimentalnog rada

- Sprovedenjem *in vivo* farmakokinetičkih ispitivanja formulisanih nanoemulzija sa diazepamom i risperidonom kao model lekovitim supstancama, nakon intraperitonealne primene kod pacova, omogućena je *in vivo* procena dispozicije razvijenih nanoemulzija i procena uticaja samog nanoemulzionog sistema kao nosača (sadržaj uljane faze, vrsta koemulgatora/kostabilizatora) na farmakokinetiku, te efikasnost isporuke u mozak inkorporirane model lekovite supstance, čime je dobijen uvid u značajan potencijal razvijenih formulacija nanoemulzija kao nosača za parenteralnu primenu slabo rastvorljivih psihofarmakoloških lekova, čija bi primena bila posebno poželjna u stanjima hitnosti/urgentnim stanjima, kada je potrebna brza isporuka leka u mozak.
- *In vivo* farmakokinetička studija odabranih nanoemulzija diazepama, stabilizovanih kombinacijom lecitina i P80, sa različitom, rastućom koncentracijom uljane faze (20%, 30% i 40%, m/m), pokazala je suptilne razlike u farmakokinetici inkorporirane model lekovite supstance. U skladu sa karakteristikama samog nosača, kao i fizičko-hemijskim svojstvima model

lekovite supstance (visoka lipofilnost), dobijeno je da su prosečne koncentracije diazepama u moždanom tkivu, i shodno tome njegovih ukupnih nivoa ($AUC_{0-1\text{ h}}$, mozak), generalno veće od onih u plazmi, što je rezultovalo mozak–plazma particionim koeficijentom, $K_p > 1$, pri čemu je nanoemulzija sa najmanjim sadržajem uljane faze (20%, m/m) težila da ima najveću vrednost za K_p , dok su K_p vrednosti za nanoemulzije sa 30% i 40% uljane faze bile neznatno niže. Osim toga, nanoemulzije diazepama sa nižim sadržajem uljane faze (20% i 30%, m/m) odlikovale su se brzom resorpcijom u sistemsku cirkulaciju i, posledično, brzom i intenzivnom inicijalnom distribucijom u moždano tkivo pacova, sa izrazito visokim maksimalnim koncentracijama i očekivanim vrednostima biološke raspoloživosti, što ukazuje na njihovu aplikabilnost u urgentnim stanjima.

- U slučaju nanoemulzija risperidona, farmakokinetička studija je pokazala da između ispitivanih formulacija stabilizovanih lecitinom u kombinaciji sa P80, PL188 ili SHS15 kao koemulgatorima, i kontrolne nanoemulzije stabilizovane samo lecitinom bez dodatog koemulgatora, postoje određene razlike u inače nepravilnim, nepredvidivim farmakokinetičkim profilima inkorporirane lekovite supstance, u plazmi i naročito moždanom tkivu pacova. Ovakvi rezultati su najverovatnije posledica različitih površinskih svojstava nanoemulzionih kapi, tj. različitog sastava međupovršinskog filma (usled prisustva koemulgatora sa različitim strukturama), što ukazuje da je površina kapi nanoemulzija, pre nego veličina kapi ili naelektrisanje, odlučujući faktor u određivanju prolaska risperidona kroz KMB. Generalno, nakon intraperitonealne primene kod pacova, ispitivane nanoemulzije risperidona, komparabilno sa rastvorom, pokazale su, uz par izuzetaka, relativno brzu resorpciju u sistemsku cirkulaciju i sledstvenu brzu distribuciju u mozak. Na osnovu vrednosti farmakokinetičkih parametara ($AUC_{0-3\text{ h}}$, relativna i apsolutna biološka raspoloživost, mozak–plazma particioni koeficijent, relativna mera preuzimanja), moglo se zaključiti da je raspoloživost risperidona u mozgu veća sa nanoemulzijama u poređenju sa rastvorom, pretpostavlja se usled proste difuzije kroz KMB risperidona oslobođenog iz nanoemulzija kao i endocitoze/transcitoze nanoemulzionih kapi sa inkorporiranim supstancom. Osim toga, raspoloživost risperidona u mozgu

nakon primene nanoemulzije kostabilizovane sa P80 bila je 1,4–7,4 puta veća u poređenju sa drugim nanoemulzijama i rastvorom leka, što ukazuje da bi ova nanoemulzija, uz nanoemulziju stabilizovanu samo lecitinom bez koemulgatora, mogla biti najperspektivnija u isporuci risperidona u mozak.

- Potencijal razvijenih, *tailor-made* nanoemulzija da poboljšaju isporuku lekovite supstance u mozak nakon parenteralne primene potvrđen je kroz dodatna sistematična ispitivanja dve nanoemulzije risperidona, stabilizovane lecitinom, pri čemu je jedna bila kostabilizovana sa P80, a kroz povezivanje njihovih fizičko-hemijskih osobina, farmakokinetičkih i profila distribucije u tkiva, i antipsihotične efikasnosti. Shodno karakteristikama samog nosača, kao i fizičko-hemijskim svojstvima model lekovite supstance (relativno niska lipofilnost, supstrat za *P*-glikoprotein), najveće prosečne koncentracije risperidona, njegovog 9-hidroksi metabolita, i, stoga, ukupne aktivne forme, nakon primene dve nanoemulzije i rastvora risperidona, nađene su u jetri, zatim u plazmi, i onda u mozgu, što je rezultovalo istim poretkom vrednosti za ukupnu ekspoziciju leka ($AUC_{0-24\text{ h}}$) u ovim matriksima (jetra > plazma > mozak). Bihejvioralna analiza je pokazala da su ispitivane formulacije nanoemulzija risperidona suprimirale bazalnu aktivnost i ostvarile značajan, brz i stabilan antagonizam amfetaminom-indukovane hiperlokomocije kod pacova, sa tendencijom manje izražene sedacije i, u slučaju nanoemulzije stabilizovane samo lecitinom (bez dodatog koemulgatora), produženog antipsihotičnog dejstva, u poređenju sa rastvorom risperidona, što dalje ukazuje na njihovu obećavajuću primenu u akutnim psihotičnim stanjima. *In vivo* farmakokinetička studija upotpunila je bihejvioralne rezultate, pokazujući diskretne razlike u farmakokinetici risperidona nakon njegovog inkorporiranja u parenteralne nanoemulzije. Ove promene su se ogledale u većem $AUC_{0-24\text{ h}}$, dužem srednjem vremenu zadržavanja i smanjenom klirensu u plazmi, nižem $AUC_{0-24\text{ h}}$ i kraćem zadržavanju u jetri, povećanom $AUC_{0-24\text{ h}}$ u mozgu, što je bilo praćeno povećanom (20–50%) relativnom biološkom raspoloživošću, smanjenom distribucijom u jetru i poboljšanim preuzimanjem u mozak ukupnog aktivnog oblika risperidona (risperidon + 9-hidroksi risperidon) nakon intraperitonealne primene nanoemulzija risperidona u poređenju sa rastvorom risperidona kod

pacova. Sa aspekta ciljne isporuke u mozak, moglo se zaključiti da su ispitivane nanoemulzije poboljšale sposobnost risperidona da penetrira KMB, što ih čini potencijalno korisnijim od konvencionalnih nosača u lečenju akutnih psihotičnih epizoda ili akutne agitacije u službi urgentne medicine. Pored povoljnih osobina samih nanoemulzija (povećana solubilizacija lekovite supstance i biološke raspoloživosti, fizička stabilnost, jednostavan *scale-up*, isplativa proizvodnja), navedena zapažanja čine povećanu isporuku risperidona u mozak nakon parenteralne primene nanoemulzija izvodljivom, čime bi se eventualno mogao poboljšati klinički ishod agitiranih i nekooperativnih akutnih psihotičnih pacijenata.

Posmatrani zajedno, prikazani nalazi pokazuju da prilikom opisivanja veze između fizičko-hemijskih svojstava, sudbine u organizmu i bihevioralnog ponašanja razvijenih nanoemulzija sa inkorporiranom lekovitom supstancom, brojne parametre treba uzeti u obzir. Naime, na sposobnost nanoemulzija da isporuče lekovitu supstancu (u ovom slučaju, diazepam i risperidon) u mozak, njihovu farmakokinetiku, distribuciju u tkiva i, posledično, farmakodinamski efekat (pr. terapijska efikasnost, toksičnost) mogu uticati osobine same lekovite supstance, hemija površine nanoemulzionih kapi, eventualne modifikacije površine *in vivo* (pr. obrazac adsorbovanja proteina plazme), kao i funkcionalni status metaboličkih enzima i transportnih proteina, što je svakako neophodno razmotriti prilikom dizajniranja nanoemulzija kao nosača slabo rastvorljivih lekovitih supstanci. Pored toga, dodatne studije su neophodne kako bi se validirao zapažen potencijal razvijenih nanoemulzija da ciljno isporuče lekovitu supstancu u mozak i procenilo da li ove formulacije mogu postati važan deo novih strategija u racionalnom dizajniranju odgovarajućih nosača za slabo rastvorljive centralno-aktivne lekovite supstance u predkliničkim istraživanjima, posebno kada formulacija konvencionalnog oblika rastvora nije izvodljiva.

6. LITERATURA

- Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., Agboola, S., 2014. Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. *J. Food. Eng.* 122, 15–27.
- Ahlin, P., Kristl, J., Pečar, S., Štrancar, J., Šentjurc, M., 2003. The effect of lipophilicity of spin-labeled compounds on their distribution in solid lipid nanoparticle dispersions studied by electron paramagnetic resonance. *J. Pharm. Sci.* 92, 58–66.
- Akkar, A., Müller, R.H., 2003. Formulation of intravenous carbamazepine emulsions by SolEmuls technology. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 55, 305–312.
- Anton, N., Gayet, P., Benoit, J., Saulnier, P., 2007. Nanoemulsions and nanocapsules by the PIT method: an investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. *Int. J. Pharm.* 344, 44–52.
- Araújo, F.A., Kelmann, R.G., Araújo, B.V., Finatto, R.B., Teixeira, H.F., Koester, L.S., 2011. Development and characterization of parenteral nanoemulsions containing thalidomide. *Eur. J. Pharm. Sci.* 42, 238–245.
- Aravagiri, M., Marder, S.R., 2002. Brain, plasma and tissue pharmacokinetics of risperidone and 9-hydroxyrisperidone after separate oral administration to rats. *Psychopharmacology* 159, 424–431.
- Aravagiri, M., Yuwiler, A., Marder, S.R., 1998. Distribution after repeated oral administration of different dose levels of risperidone and 9-hydroxy-risperidone in the brain and other tissues of rat. *Psychopharmacology (Berl)* 139, 356–363.
- Baker, M.T., Naguib, M., 2005. Propofol: the challenges of formulation. *Anesthesiology* 103, 860–876.
- Baspinar, Y., Keck, C.M., Borchert, H.H., 2010. Development of a positively charged prednicarbate nanoemulsion. *Int. J. Pharm.* 383, 201–208.
- Batrakova, E.V., Kabanov, A.V., 2008. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J. Control. Release* 130, 98–106.
- Benita, S., Levy M.Y. 1993. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. *J. Pharm. Sci.* 82, 1069–1079.

- Blasi, P., Schoubben, A., Traina, G., Manfroni, G., Barberini, L., Alberti, P.F., Cirotto, C., Ricci, M., 2013. Lipid nanoparticles for brain targeting III. Long-term stability and in vivo toxicity. *Int. J. Pharm.* 454, 316–323.
- Bock, T., Kleinebudde, P., Müller, B.W., 1998. Manufacture of emulsions by means of high-pressure homogenization: Influence of homogenization parameters, oils and surfactants. In: Müller, R.H., Benita, S., Böhm, B.H.L. (Eds.), *Emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs*. Medpharm Scientific Publ., Stuttgart, pp. 201–236.
- Bouchemal, K., Briancon, S., Perrier, E., Fessi, H., 2004. Nanoemulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent oil and surfactant optimization. *Int. J. Pharm.* 280, 241–251.
- Brown, C.K., Friedel, H.D., Barker, A.R., Buhse, L.F., Keitel, S., Cecil, T.L., Kraemer, J., Morris, J.M., Reppas, C., Stickelmeyer, M.P., Yomota, C., Shah, V.P., 2011. FIP/AAPS joint workshop report: dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms. *AAPS PharmSciTech.* 12, 782–794.
- Bundgaard, C., Jensen, C.J., Garmer, M., 2012. Species comparison of in vivo P-glycoprotein-mediated brain efflux using *mdr1a*-deficient rats and mice. *Drug Metab. Dispos.* 40, 461–466.
- Burgess, D.J., Crommelin, D.J., Hussain, A.S., Chen, M.L., 2004. Assuring quality and performance of sustained and controlled release parenterals: EUFEPS workshop report. *AAPS PharmSci.* 6, 100–111.
- Buys, M., Scheepers, P.A., Levin, A.I., 2015. Lipid emulsion therapy: nonnutritive uses of lipid emulsions in anaesthesia and intensive care. *South. Afr. J. Anaesth. Analg.* 21, 124–130.
- Cannon, J.B., Shi, J., Gupta, P., 2008. Emulsions, microemulsions, and lipid-based drug delivery systems for drug solubilization and delivery—Part I: Parenteral applications. In: Liu, R. (Ed.), *Water-insoluble drug formulation*. CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, London, New York, pp. 195–226.
- Carbone, C., Tomasello, B., Ruozi, B., Renis, M., Puglisi, G., 2012. Preparation and optimization of PIT solid lipid nanoparticles via statistical factorial design. *Eur. J. Med. Chem.* 49, 110–117.

- Carpentier, Y.A., Dupont, I.E., 2000. Advances in intravenous lipid emulsions. *World J. Surg.* 24, 1493–1497.
- Chen, H., Shi, S., Zhao, M., Zhang, L., He, H., Tang, X., 2010. A lyophilized etoposide submicron emulsion with a high drug loading for intravenous injection: preparation, evaluation, and pharmacokinetics in rats. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 36, 1444–1453.
- Chen, Y., Liu, L., 2012. Modern methods for delivery of drugs across the blood–brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 640–665.
- Chidambaram, N., Burgess, D.J., 1999. A novel in vitro release method for submicron sized dispersed systems. *AAPS PharmSci.* 1, 1–9.
- Constantinides, P.P., Chaubal, M.V., Shorr, R., 2008. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 17, 757–767.
- Constantinides, P.P., Han, J., Davis, S.S., 2006. Advances in the use of tocols as drug delivery vehicles. *Pharm. Res.* 23, 243–255.
- Constantinides, P.P., Lambert, K.J., Tustian, A.K., Schneider, B., Lalji, S., Ma, W., Wentzel, B., Kessler, D., Worah, D., Quay, S.C., 2000. Formulation development and antitumor activity of a filter-sterilizable emulsion of paclitaxel. *Pharm. Res.* 17, 175–182.
- Constantinides, P.P., Tustian, A., Kessler, D.R., 2004. Tocol emulsions for drug solubilization and parenteral delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1243–1255.
- Cortés-Muñoz, M., Chevalier-Lucia, D., Dumay, E., 2009. Characteristics of submicron emulsions prepared by ultra-high pressure homogenisation: effect of chilled or frozen storage. *Food Hydrocolloids* 23, 640–654.
- Costa, P., Sousa Lobo, J.M., 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13, 123–133.
- Cupaioli, F.A., Zucca, F.A., Boraschi, D., Zecca, L., 2014. Engineered nanoparticles. How brain friendly is this new guest? *Prog. Neurobiol.* 119–120, 20–38.
- Daniel, J.S.P., Veronez, I.P., Rodrigues, L.L., Trevisan, M.G., Garcia, J.S., 2013. Risperidone – solid-state characterization and pharmaceutical compatibility using thermal and non-thermal techniques. *Thermochim. Acta* 568, 148–155.
- Davis, S.S., Washington, C., West, P., Illum, L., Liversidge, G., Sternson, L., Kirsh, R., 1987. Lipid emulsions as drug delivery systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 507, 75–88.

- Deckelbaum, R.J., Calder, P.C., Carpentier, Y.A., 2004. Using different intravenous lipids: underutilized therapeutic approaches? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 7, 113–115.
- Dhawan, S., Kapil, R., Singh, B., 2011. Formulation development and systematic optimization of solid lipid nanoparticles of quercetin for improved brain delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 63, 342–351.
- Driscoll, D.F., 2015. Commercial lipid emulsions and all-in-one mixtures for intravenous infusion – composition and physicochemical properties. *World Rev. Nutr. Diet.* 112, 48–56.
- Driscoll, D.F., Bacon, M.N., Bistran, B.R., 2000. Physicochemical stability of two different types of intravenous lipid emulsion as total nutrient admixtures. *J. Parenter. Enteral Nutr.* 24, 15–22.
- Ejsing, T.B., Pedersen, A.D., Linnet, K., 2005. P-glycoprotein interaction with risperidone and 9-OH-risperidone studied in vitro, in knock-out mice and in drug-drug interaction experiments. *Hum. Psychopharmacol.* 20, 493–500.
- Fang, J.Y., Leu, Y.L., Chang, C.C., Lin, C.H., Tsai, Y.H., 2004. Lipid nano/submicron emulsions as vehicles for topical flurbiprofen delivery. *Drug Deliv.* 11, 97–105.
- Floury, J., Bellettre, J., Legrand, J., Desrumaux, A., 2004a. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A. Study of the Flow Pattern. *Chem. Eng. Sci.* 59, 843–853.
- Floury, J., Desrumaux, A., Lardières, J., 2000. Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 127–134.
- Floury, J., Legrand, J., Desrumaux, A., 2004b. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part B. study of droplet break-up and recoalescence phenomena. *Chem. Eng. Sci.* 59, 1285–1294.
- Floyd, A.G., 1999. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. *Pharm. Sci. Technol. Today* 2, 134–143.
- Fox, C.B., 2009. Squalene emulsions for parenteral vaccine and drug delivery. *Molecules* 14, 3286–3312.

- Friedman, D., Benita, S., 1987. A mathematical model for drug release from o/w emulsions: application to controlled release morphine emulsions. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 13, 2067–2085.
- Gao, K., Sun, J., Liu, K., Liu, X., He, Z., 2008. Preparation and characterization of a submicron lipid emulsion of docetaxel: submicron lipid emulsion of docetaxel. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 34, 1227–1237.
- Gupta, A., Chatelain, P., Massingham, R., Jonsson, E.N., Hammarlund-Udenaes, M., 2006. Brain distribution of cetirizine enantiomers: comparison of three different tissue-to-plasma partition coefficients: $K(p)$, $K(p,u)$, and $K(p,uu)$. *Drug Metab. Dispos.* 34, 318–323.
- Han, J., Washington, C., 2005. Partition of antimicrobial additives in an intravenous emulsion and their effect on emulsion physical stability. *Int. J. Pharm.* 288, 263–271.
- Haskell, R.J., 1998. Characterization of submicron systems via optical methods. *J. Pharm. Sci.* 87, 125–129.
- Hedeman, H., Brøndsted, H., Müllertz, A., Frokjaer, S., 1996. Fat emulsions based on structured lipids (1,3-specific triglycerides): an investigation of the in vivo fate. *Pharm. Res.* 13, 725–728.
- Henry, J.V.L., Fryer, P.J., Frith, W.J., Norton, I.T., 2009. Emulsification mechanism and storage instabilities of hydrocarbon-in-water sub-micron emulsions stabilised with Tweens (20 and 80), Brij 96v and sucrose monoesters. *J. Colloid Interface Sci.* 338, 201–206.
- Hippalgaonkar, K., Majumdar, S., Kansara, V., 2010. Injectable lipid emulsions—advancements, opportunities and challenges. *AAPS PharmSciTech.* 11, 1526–1540.
- Hoeller, S., Sperger, A., Valenta, C., 2009. Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation. *Int. J. Pharm.* 370, 181–186.
- Hörmann, K., Zimmer, A., 2016. Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions — A review. *J. Control. Release* 223, 85–98.

- Igari, Y., Sugiyama, Y., Sawada, Y., Iga, T., Hanano, M., 1982. Tissue distribution of ^{14}C -diazepam and its metabolites in rats. *Drug Metab. Dispos.* 10, 676–679.
- Izquierdo, P., Esquena, J., Tadros, T.F., Dederen, J.C., Feng, J., Garcia-Celma, M.J., Azemar, N., Solans, C., 2004. Phase behavior and nano-emulsion formation by the phase inversion temperature method. *Langmuir* 20, 6594–6598.
- Izquierdo, P., Feng, J., Esquena, J., Tadros, T.F., Dederen, J.C., Garcia, M.J., Azemar, N., Solans, C., 2005. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method. *J. Colloid. Interface. Sci.* 285, 388–394.
- Jahnke, S., 1998. The theory of high-pressure homogenization. In: Müller, R.H., Benita, S., Böhm, B.H.L. (Eds.), *Emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs*. Medpharm Scientific Publ., Stuttgart, pp. 177–200.
- Jumaa, M., Kleinebudde, P., Müller, B.W., 1998. Mixture experiments with the oil phase of parenteral emulsions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 46, 161–167.
- Jumaa, M., Müller, B.W., 1998a. The stabilization of parenteral fat emulsion using non-ionic ABA copolymer surfactant. *Int. J. Pharm.* 174, 29–37.
- Jumaa, M., Müller, B.W., 1998b. The effect of oil components and homogenization conditions on the physicochemical properties and stability of parenteral fat emulsions. *Int. J. Pharm.* 163, 81–89.
- Jumaa, M., Müller, B.W., 2002. Parenteral emulsions stabilized with a mixture of phospholipids and PEG-660–12-hydroxy-stearate: evaluation of accelerated and long-term stability. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 54, 207–212.
- Kabanov, A.V., Batrakova, E.V., Miller, D.W., 2003. Pluronic block copolymers as modulators of drug efflux transporter activity in the blood–brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 151–164.
- Kalvass, J.C., Maurer, T.S., 2002. Influence of nonspecific brain and plasma binding on CNS exposure: implications for rational drug discovery. *Biopharm. Drug Dispos.* 23, 327–338.
- Kandadi, P., Syed, M.A., Goparaboina, S., Veerabrahma, K., 2011. Brain specific delivery of pegylated indinavir submicron lipid emulsions. *Eur. J. Pharm.* 42, 423–432.
- Kasongo, K.W., Jansch, M., Müller, R.H., Walker, R.B., 2011. Evaluation of the in vitro differential protein adsorption patterns of didanosine-loaded nanostructured

- lipid carriers (NLCs) for potential targeting to the brain. *J. Liposome Res.* 21, 245–254.
- Kaur, P., Kim, K., 2008. Pharmacokinetics and brain uptake of diazepam after intravenous and intranasal administration in rats and rabbits. *Int. J. Pharm.* 364, 27–35.
- Kawakami, S., Yamashita, F., Hashida, M., 2000. Disposition characteristics of emulsions and incorporated drugs after systemic or local injection. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 45, 77–88.
- Keck, C.M., Jansch, M., Müller, R.H., 2013. Protein adsorption patterns and analysis on iv nanoemulsions-the key factor determining the organ distribution. *Pharmaceutics* 5, 36–68.
- Kelmann, R.G., Kuminek, G., Teixeira, H.F., Koester, L.S., 2007. Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. *Int. J. Pharm.* 342, 231–239.
- Klang, S.H., Parnas, M., Benita, S., 1998. Emulsions as drug carriers - possibilities, limitations and future perspectives. In: Müller, R.H., Benita, S., Böhm, B.H.L. (Eds.), *Emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs*. Medpharm Scientific Publ., Stuttgart, pp. 31–65.
- Klang, V., Matsko, N., Raupach, K., El-Hagin, N., Valenta, C., 2011. Development of sucrose stearate-based nanoemulsions and optimization through γ -cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79, 58–67.
- Klang, V., Matsko, N.B., Valenta, C., Hofer, F., 2012. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. *Micron* 43, 85–103.
- Klang, V., Valenta, C., 2011. Lecithin-based nanoemulsions. *J. Drug Del. Sci. Tech.* 21, 55–76.
- Kotta, S., Khan, A.W., Ansari, S.H., Sharma, R.K., Ali, J., 2015. Formulation of nanoemulsion: a comparison between phase inversion composition method and high-pressure homogenization method. *Drug Deliv.* 22, 455–466.
- Kreuter, J., 2001. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47, 65–81.

- Kreuter, J., 2005. Application of nanoparticles for the delivery of drugs to the brain. *Int. Congr. Ser.* 1277, 85–94.
- Kulkarni, A.D., Patel, H.M., Surana, S.J., Belgamwar, V.S., Pardeshi, C.V., 2016. Brain-blood ratio: implications in brain drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 13, 85–92.
- Kumar, M., Misra, A., Babbar, A.K., Mishra, A.K., Mishra, P., Pathak, K., 2008. Intranasal nanoemulsion based brain targeting drug delivery system of risperidone. *Int. J. Pharm.* 358, 285–291.
- Kumar, M., Pathak, K., Misra, A. 2009. Formulation and characterization of nanoemulsion-based drug delivery system of risperidone. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 35, 387–95.
- Kurihara, A., Shibayama, Y., Yasuno, A., Ikeda, M., Hisaoka, M., 1996. Lipid emulsions of palmitoylrhizoxin: effects of particle size on blood dispositions of emulsion lipid and incorporated compound in rats. *Biopharm. Drug Dispos.* 17, 343–353.
- Lenzo, N.P., Martins, I., Mortimer, B.C., Redgrave, T.G., 1988. Effects of phospholipid composition on the metabolism of triacylglycerol, cholesteryl ester and phosphatidylcholine from lipid emulsions injected intravenously in rats. *Biochim. Biophys. Acta* 960, 111–118.
- Leong, T.S., Wooster, T.J., Kentish, S.E., Ashokkumar, M., 2009. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrason. Sonochem.* 16, 721–727.
- Levy, M.Y., Benita, S., 1990. Drug release from submicronized o/w emulsion: a new in vitro kinetic evaluation model. *Int. J. Pharm.* 66, 29–37.
- Levy, M.Y., Benita, S., 1991. Short- and long-term stability assessment of a new injectable diazepam submicron emulsion. *J. Parenter. Sci. Technol.* 45, 101–107.
- Li, J., Qiao, Y., Wu, Z., 2017. Nanosystem trends in drug delivery using quality-by-design concept. *J. Control. Release* 256, 9–18.
- Li, X., Du, L., Wang, C., Liu, Y., Mei, X., Jin, Y., 2011. Highly efficient and lowly toxic docetaxel nanoemulsions for intravenous injection to animals. *Pharmazie* 66, 479–483.

- Li, Y., Jin, W., Yan, H., Liu, H., Wang, C., 2013. Development of intravenous lipid emulsion of vinorelbine based on drug-phospholipid complex technique. *Int. J. Pharm.* 454, 472–477.
- Liu, F., Liu, D., 1995. Long-circulating emulsions (oil-in-water) as carriers for lipophilic drugs. *Pharm. Res.* 12, 1060–1064.
- Liu, X., Vilenski, O., Kwan, J., Apparsundaram, S., Weikert, R., 2009. Unbound brain concentration determines receptor occupancy: a correlation of drug concentration and brain serotonin and dopamine reuptake transporter occupancy for eighteen compounds in rats. *Drug Metab. Dispos.* 37, 1548–1556.
- Loryan, I., Melander, E., Svensson, M., Payan, M., König, F., Jansson, B., Hammarlund-Udenaes, M., 2016. In-depth neuropharmacokinetic analysis of antipsychotics based on a novel approach to estimate unbound target-site concentration in CNS regions: link to spatial receptor occupancy. *Mol. Psychiatry* 21, 1527–1536.
- Lu, Y., Zhang, Y., Yang, Z., Tang, X., 2009. Formulation of an intravenous emulsion loaded with a clarithromycin–phospholipid complex and its pharmacokinetics in rats. *Int. J. Pharm.* 366, 160–169.
- Ma, W.C., Zhang, Q., Li, H., Larregieu, C.A., Zhang, N., Chu, T., Jin, H., Mao, S.J., 2013. Development of intravenous lipid emulsion of α -asarone with significantly improved safety and enhanced efficacy. *Int. J. Pharm.* 450, 21–30.
- Madhusudhan, B., Rambhau, D., Apte, S.S., Gopinath, D., 2007. 1-O-alkylglycerol stabilized carbamazepine intravenous o/w nanoemulsions for drug targeting in mice. *J. Drug Target.* 15, 154–161.
- Mahdi Jafari, S., He, Y., Bhandari, B., 2006. Nano-emulsion production by sonication and microfluidization—a comparison. *Int. J. Food Prop.* 9, 475–485.
- Mahon, E., Salvati, A., Baldelli Bombelli, F., Lynch, I., Dawson, K.A., 2012. Designing the nanoparticle-biomolecule interface for “targeting and therapeutic delivery”. *J. Control. Release* 161, 164–174.
- Marín-Quintero, D., Fernández-Campos, F., Calpena-Campmany, A.C., Montes-López, M.J., Clares-Naveros, B., Del Pozo-Carrascosa, A., 2013. Formulation design and optimization for the improvement of nystatin-loaded lipid intravenous emulsion. *J. Pharm. Sci.* 102, 4015–4023.

- Mason, T.G., Wilking, J.N., Meleson, K., Chang, C.B., Graves, S.M., 2006. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *J. Phys. Condens. Matter* 18, R635–R666.
- McClements, D.J., 2011. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter* 7, 2297–2316.
- McClements, D.J., 2012. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences and similarities. *Soft Matter* 8, 1719–1729.
- McClements, D.J., 2013. Edible lipid nanoparticles: digestion, absorption, and potential toxicity. *Prog. Lipid Res.* 52, 409–423.
- Młynarczyk, M., Sznitowska, M., Watrobska-Swietlikowska, D., 2008. Antimicrobial activity of parabens in submicron emulsions stabilized with lecithin. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 34, 355–362.
- Müller, R.H., Göppert, T.M., 2007. Protein adsorption patterns on parenteral lipid formulations: key factor determining the in vivo fate. In: Wasan, K.M. (Ed.), *Role of lipid excipients in modifying oral and parenteral drug delivery: basic principles and biological examples*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp. 124–159.
- Müller, R.H., Harden, D., Keck, C.M., 2012. Development of industrially feasible concentrated 30% and 40% nanoemulsions for intravenous drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 38, 420–430.
- Müller, R.H., Schmidt, S., Buttle, I., Akkar, A., Schmitt, J., Brömer, S., 2004. SolEmuls® – novel technology for the formulation of i.v. emulsions with poorly soluble drugs. *Int. J. Pharm.* 269, 293–302.
- Musa, S.H., Basri, M., Masoumi, H.R., Karjiban, R.A., Malek, E.A., Basri, H., Shamsuddin, A.F., 2013. Formulation optimization of palm kernel oil esters nanoemulsion-loaded with chloramphenicol suitable for meningitis treatment. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 112, 113–119.
- Neville, G.A., Shurvell, H.F., 1990. Fourier transform Raman and infrared vibrational study of diazepam and four closely related 1,4-benzodiazepines. *J. Raman Spectrosc.* 21, 9–19.

- Nielloud, F., Mestres, J.P., Fortuné, R., Draussin, S., Marti-Mestres, G., 2003. Formulation of oil-in-water submicron emulsions in the dermatological field using experimental design. *Polym. Int.* 52, 610–3.
- Nordén, T.P., Siekmann, B., Lundquist, S., Malmsten, M., 2001. Physicochemical characterisation of a drug-containing phospholipid-stabilised o/w emulsion for intravenous administration. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13, 393–401.
- Obradović, A.Lj., Joksimović, S., Poe, M.M., Ramerstorfer, J., Varagic, Z., Namjoshi, O., Batinić, B., Radulović, T., Marković, B., Roth, B.L., Sieghart, W., Cook, J.M., Savić, M.M., 2014. Sh-I-048A, an in vitro non-selective super-agonist at the benzodiazepine site of GABAA receptors: the approximated activation of receptor subtypes may explain behavioral effects. *Brain Res.* 1554, 36–48.
- Pey, C.M., Maestro, A., Solé, I., González, C., Solans, C., Gutiérrez, J.M., 2006. Optimization of nano-emulsions prepared by low-energy emulsification methods at constant temperature using a factorial design study. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects* 288, 144–50.
- Prabhakar, K., Afzal, S.M., Surender, G., Kishan, V., 2013. Tween 80 containing lipid nanoemulsions for delivery of indinavir to brain. *Acta Pharm. Sin. B* 3, 345–353.
- Pretz, C., Hauser, A., Hause, G., Kramer, A., Mäder, K., 2010. Application of atomic force microscopy and ultrasonic resonator technology on nanoscale: distinction of nanoemulsions from nanocapsules. *Eur. J. Pharm. Sci.* 39, 141–151.
- Qi, K., Seo, T., Jiang, Z., Carpentier, Y.A., Deckelbaum, R.J., 2006. Triglycerides in fish oil affect the blood clearance of lipid emulsions containing long- and medium-chain triglycerides in mice. *J. Nutr.* 136, 2766–2772.
- Rabinow, B.E., 2004. Nanosuspensions in drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 785–796.
- Rahman, Z., Zidan, A.S., Khan, M.A., 2010. Non-destructive methods of characterization of risperidone solid lipid nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 76, 127–137.
- Rathore, A.S., 2009. Roadmap for implementation of quality by design (QbD) for biotechnology products. *Trends Biotechnol.* 27, 546–553.
- Rossi, J., Leroux, J.-C., 2006. Principles in the development of intravenous lipid emulsions. U: Wasan, K.M. (Ed.), Role of lipid excipients in modifying oral and

parenteral drug delivery: basic principles and biological examples. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp. 88–123.

- Rozentur, E., Nassar, T., Benita, S., 2010. Materials for nanoemulsions and their influence on the biofate. In: Torchilin, V., Amiji, M.M. (Eds.), Handbook of materials for nanomedicine. Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., Singapore, pp. 515–554.
- Ruozi, B., Tosi, G., Forni, F., Fresta, M., Vandelli, MA., 2005. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: two techniques for rapid characterization of liposomes. *Eur. J. Pharm. Sci.* 25, 81–89.
- Sadurní, N., Solans, C., Azemara, N., García-Celma, M.J., 2005. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* 26, 438–445.
- Sajjadi, S., 2006. Nanoemulsion formation by phase inversion emulsification: on the nature of inversion. *Langmuir* 22, 5597–5603.
- Samiun, W.S., Basri, M., Masoumi, H.R.F., Khairudin, N., 2016. The prediction of the optimum compositions of a parenteral nanoemulsion system loaded with a low water solubility drug for the treatment of schizophrenia by artificial neural networks. *RSC Adv.* 6, 14068–14076.
- Saptarshi, S.R., Duschl, A., Lopata, A.L., 2013. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J. Nanobiotechnology* 11, 26.
- Sasikumar, A., Kamalasanan, K., 2017. Nanomedicine for prostate cancer using nanoemulsion: A review. *J. Control. Release.* 260, 111–123.
- Seidlitz, A., Weitschies, W., 2012. In-vitro dissolution methods for controlled release parenterals and their applicability to drug-eluting stent testing. *J. Pharm. Pharmacol.* 64, 969–985.
- Shah, L., Gattacceca, F., Amiji, M.M., 2014. CNS delivery and pharmacokinetic evaluations of DALDA analgesic peptide analog administered in Nano-sized oil-in-water emulsion formulation. *Pharm. Res.* 31, 1315–1324.
- Shah, V.P., DeMuth, J., Hunt, D.G., 2015. Performance test for parenteral dosage forms. *Dissolution Technol.* 22, 16–21.

- Shen, J., Burgess, D.J., 2012. Accelerated in-vitro release testing methods for extended-release parenteral dosage forms. *J. Pharm. Pharmacol.* 64, 986–996.
- Shi, S., Chen, H., Cui, Y., Tang, X., 2009. Formulation, stability and degradation kinetics of intravenous cinnarizine lipid emulsion. *Int. J. Pharm.* 373, 147–155.
- Shinde, R.L., Jindal, A.B., Devarajan, P.V., 2011. Microemulsions and nanoemulsions for targeted drug delivery to the brain. *Curr. Nanosci.* 7, 119–133.
- Shukla, D., Chakraborty, S., Singh, S., Mishra, B., 2009. Fabrication and evaluation of taste masked resinate of risperidone and its orally disintegrating tablets. *Chem. Pharm. Bull.* 57, 337–345.
- Sila-on, W., Vardhanabhuti, N., Ongpipattanakul, B., Kulvanich, P., 2008. Influence of incorporation methods on partitioning behavior of lipophilic drugs into various phases of a parenteral lipid emulsion. *AAPS PharmSciTech.* 9, 681–692.
- Silva, H.D., Cerqueira, M.A., Vicente, A.A., 2012. Nanoemulsions for food applications: development and characterization. *Food Bioprocess Technol.* 5, 854–867.
- Singh, Y., Meher, J.G., Raval, K., Khan, F.A., Chaurasia, M., Jain, N.K., Chourasia, M.K., 2017. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J. Control. Release* 252, 28–49.
- Solè, I., Pey, C.M., Maestro, A., González, C., Porrás, M., Solans, C., Gutiérrez, J.M., 2010. Nano-emulsions prepared by the phase inversion composition method: preparation variables and scale up. *J. Colloid Interface Sci.* 344, 417–23.
- Spahn, D.R., 1999. Blood substitutes. Artificial oxygen carriers: perfluorocarbon emulsions. *Crit. Care* 3, R93–R97.
- Spina, E., Avenoso, A., Facciola, G., Salemi, M., Scordo, M.G., Ancione, M., Madia, A.G., Perucca, E., 2001. Relationship between plasma risperidone and 9-hydroxyrisperidone concentrations and clinical response in patients with schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 153, 238–243.
- Strickley, R.G., 2004. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm. Res.* 21, 201–220.
- Sznitowska, M., Gajewska, M., Janicki, S., Radwanska, A., Lukowski, G., 2001a. Bioavailability of diazepam from aqueous-organic solution, submicron emulsion

- and solid lipid nanoparticles after rectal administration in rabbits. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52, 159–163.
- Sznitowska, M., Janicki, S., Dabrowska, E., Zurowska-Pryczkowska, K., 2001b. Submicron emulsions as drug carriers; Studies on destabilization potential of various drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 12, 175–179.
- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., Solans, C., 2004. Formation and stability of nano-emulsions. *Adv. Colloid Interface Sci.* 108–109, 303–318.
- Takegami, S., Kitamura, K., Kawada, H., Matsumoto, Y., Kitade, T., Ishida, H., Nagata, C., 2008. Preparation and characterization of a new lipid nano-emulsion containing two cosurfactants, sodium palmitate for droplet size reduction and sucrose palmitate for stability enhancement. *Chem. Pharm. Bull.* 56, 1097–1102.
- Takino, T., Konishi, K., Takakura, Y., Hashida, M., 1994. Long circulating emulsion carrier systems for highly lipophilic drugs. *Biol. Pharm. Bull.* 17, 121–125.
- Tamilvanan, S., 2004. Oil-in-water lipid emulsions: implications for parenteral and ocular delivering systems. *Prog. Lipid Res.* 43, 489–533.
- Tamilvanan, S., 2009. Formulation of multifunctional oil-in-water nanosized emulsions for active and passive targeting of drugs to otherwise inaccessible internal organs of the human body. *Int. J. Pharm.* 381, 62–76.
- Tamilvanan, S., Schmidt, S., Müller, R.H., Benita, S., 2005. In vitro adsorption of plasma proteins onto the surface (charges) modified-submicron emulsions for intravenous administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 59, 1–7.
- Teitelbaum, D.H., Guenter, P., Griebel, D., Abrams, S.A., Bark, S., Baker, M., Berry, K.L., Bistran, B.R., Brenna, J.T., Bonnot, D., Carpentier, Y.A., Deckelbaum, R.J., Hise, M., Koletzko, B., Mirtallo, J.M., Mulberg, A.E., O'Reilly, R.C., Shaffer, J., von Kleist, E., Zaloga, G.P., Ziegler, T.R., 2015. Proceedings From FDA/A.S.P.E.N. Public Workshop: Clinical Trial Design for Intravenous Fat Emulsion Products, October 29, 2013. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* 39, 768–786.
- Trotta, M., Pattarino, F., Ignoni, T., 2002. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 53, 203–208.

- United States Pharmacopeia 39 and National Formulary 34 (USP39–NF34), 2016. Globule size distribution in lipid injectable emulsions <729>. The United States Pharmacopoeial Convention. Rockville, MD.
- van Hoogevest, P., Wendel, A., 2014. The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116, 1088–1107.
- van Nieuwenhuyzen, W., Szuhaj, B.F., 1998. Effects of lecithins and proteins on the stability of emulsions, *Fett/Lipid* 100, 282–291.
- Verma, S., Lan, Y., Gokhale, R., Burgess, D.J., 2009. Quality by design approach to understand the process of nanosuspension preparation. *Int. J. Pharm.* 377, 185–198.
- Vitorino, C., Carvalho, F.A., Almeida, A.J., Sousa, J.J., Pais, A.A.C.C., 2011. The size of solid lipid nanoparticles: an interpretation from experimental design. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 84, 117–130.
- Voigt, N., Henrich-Noack, P., Kockentiedt, S., Hintz, W., Tomas, J., Sabel, B.A., 2014. Surfactants, not size or zeta-potential influence blood-brain barrier passage of polymeric nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87, 19–29.
- Wang, J.J., Sung, K.C., Hu, O.Y.P., Yeh, C.H., Fang, J.Y., 2006. Submicron lipid emulsion as a drug delivery system for nalbuphine and its prodrugs. *J. Control. Release* 115, 140–149.
- Washington, C., 1989. Evaluation of non-sink dialysis methods for the measurement of drug release from colloids: effects of drug partition. *Int. J. Pharm.* 56, 71–74.
- Washington, C., 1996. Stability of lipid emulsions for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 20, 131–145.
- Washington, C., 1998. Drug release and interfacial structure in emulsions. In: Müller, R.H., Benita, S., Böhm, B.H.L. (Eds.), *Emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs*. Medpharm Scientific Publ., Stuttgart, pp. 101–117.
- Welin-Berger, K., Bergenstahl, B., 2000. Inhibition of Ostwald ripening in local anesthetic emulsions by using hydrophobic excipients in the disperse phase. *Int. J. Pharm.* 200, 249–260.

- Werling, J., Graham, S., Owen, H., Nair, L., Gonyon, T., Carter, P.W., 2008. Physicochemical stability of phospholipid-dispersed suspensions of crystalline itraconazole. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 1104–1113.
- Wohlfart, S., Gelperina, S., Kreuter, J., 2012. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *J. Control. Release* 161, 264–273.
- Wong, H.L., Wu, X.Y., Bendayan, R., 2012. Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 686–700.
- Wooster, T.J., Golding, M., Sanguansri, P., 2008. Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability. *Langmuir* 24, 12758–12765.
- Worboys, P.D., Bradbury, A., Houston, J.B., 1997. Kinetics of drug metabolism in rat liver slices. III. Relationship between metabolic clearance and slice uptake rate. *Drug Metab. Dispos.* 25, 460–467.
- Wu, W.H., 2007. Parenteral nanoemulsions—Composition, preparation and cellular uptake, Ph.D. Thesis. Freiburg: University of Freiburg.
- Wulff-Pérez, M., de Vicente, J., Martín-Rodríguez, A., Gálvez-Ruiz, M.J., 2012. Controlling lipolysis through steric surfactants: new insights on the controlled degradation of submicron emulsions after oral and intravenous administration. *Int. J. Pharm.* 423, 161–166.
- Yilmaz, E., Borchert, H.H., 2005. Design of a phytosphingosine-containing, positively-charged nanoemulsion as a colloidal carrier system for dermal application of ceramides. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60, 91–98.
- Yu, L.X., Amidon, G., Khan, M.A., Hoag, S.W., Polli, J., Raju, G.K., Woodcock, J., 2014. Understanding pharmaceutical quality by design. *AAPS J.* 16; 771–783.
- Yuan, Y., Gao, Y., Zhao, J., Mao, L., 2008. Characterization and stability evaluation of b-carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Res. Int.* 41, 61–68.
- Zainol, S., Basri, M., Basri, H.B., Shamsuddin, A.F., Abdul-Gani, S.S., Karjiban, R.A., Abdul-Malek, E., 2012. Formulation optimization of a palm-based nanoemulsion system containing levodopa. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 13049–13064.

- Zhang, X., Sun, X., Li, J., Zhang, X., Gong, T., Zhang, Z., 2011. Lipid nanoemulsions loaded with doxorubicin-oleic acid ionic complex: characterization, in vitro and in vivo studies. *Pharmazie* 66, 496–505.
- Zhao, H., Lu, H., Gong, T., Zhang, Z., 2013. Nanoemulsion loaded with lycobetaine-oleic acid ionic complex: physicochemical characteristics, in vitro, in vivo evaluation, and antitumor activity. *Int. J. Nanomedicine* 8, 1959–1973.
- Zhou, H., Yue, Y., Liu, G., Li, Y., Zhang, J., Gong, Q., Yan, Z., Duan, M., 2010. Preparation and characterization of a lecithin nanoemulsion as a topical delivery system. *Nanoscale Res. Lett.* 5, 224–230.

7. PRILOZI

7.1. Publikovani i saopšteni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

1. Đorđević SM, Santrač A, Cekić ND, Marković BD, Divović B, Ilić TM, Savić MM, Savić SD. Parenteral nanoemulsions of risperidone for enhanced brain delivery in acute psychosis: Physicochemical and *in vivo* performances. *International Journal of Pharmaceutics* 2017; pii: S0378–5173 (17) 30463–5, *in press, corrected proof*, doi: [10.1016/j.ijpharm.2017.05.051](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.051) (IF 3,649/2016).
2. Đorđević SM, Cekić ND, Savić MM, Isailović TM, Ranđelović DV, Marković BD, Savić SR, Timić Stamenić T, Daniels R, Savić SD. Parenteral nanoemulsions as promising carriers for brain delivery of risperidone: Design, characterization and *in vivo* pharmacokinetic evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* 2015; 493 (1–2): 40–54 (IF 3,994/2015).
3. Đorđević SM, Radulović TS, Cekić ND, Ranđelović DV, Savić MM, Krajišnik DR, Milić JR, Savić SD. Experimental design in formulation of diazepam nanoemulsions: Physicochemical and pharmacokinetic performances. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013; 102 (11): 4159–4172 (IF 3,007/2013).

Rad u međunarodnom časopisu (M23)

1. Đorđević SM, Cekić ND, Isailović TM, Milić JR, Vuleta GM, Lazić ML, Savić SD. Nanoemulzije dobijene variranjem tipa emulgatora i udela masne faze: Uticaj formulacije i procesnih parametara na karakteristike i fizičku stabilnost. *Hemijska Industrija* 2013; 67 (5): 795–809 (IF 0,562/2013).

Rad u časopisu nacionalnog značaja (M52)

1. Cekić ND, Đorđević SM, Savić SR, Savić SD. A full factorial design in the formulation of diazepam parenteral nanoemulsions: Physicochemical characterization and stability evaluation. *Advanced Technologies* 2015; 4 (1): 69–77.

Rad u naučnom časopisu (M53)

1. Đorđević S, Isailović T, Cekić N, Vuleta G, Savić S. Parenteralne nanoemulzije diazepam: fizičko-hemijska karakterizacija i *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja. Arhiv za farmaciju 2016; 66: 24–41.

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33)

1. Djordjevic S, Santrac A, Divovic B, Stankovic T, Savic M, Cekic N, Savic S. Risperidone-loaded polysorbate 80-costabilized parenteral nanoemulsions: pharmacokinetic and pharmacodynamic profile. 11th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, Belgrade/Serbia, September, 22–24, 2016.
2. Đorđević S, Santrač A, Divović B, Isailović T, Cekić N, Savić M, Savić S. Lecithin-based parenteral nanoemulsions of risperidone: physicochemical and pharmacokinetic study. 10th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Glasgow/United Kingdom, April 4–7, 2016.
3. Đorđević S, Isailović T, Cekić N, Savić M, Savić SR, Ranđelović D, Savić SD. Parenteral nanoemulsions for risperidone brain delivery: design, characterization and *in vivo* evaluation. 1st European Conference on Pharmaceutics: Drug Delivery, Reims/France, April 13–14, 2015.
4. Đorđević S, Radulović T, Cekić N, Savić M, Vuleta G, Savić S. Diazepam parenteral nanoemulsions: Full factorial design, characterization and *in vivo* pharmacokinetic study. 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Lisbon/Portugal, March 31–April 3, 2014.

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)

1. Đorđević S, Cekić N, Stamenković V, Mitrović J, Milićević I, Isailović T, Savić S. Parenteral diazepam-loaded nanoemulsions with 20, 30 and 40% of oil phase: Physicochemical and biopharmaceutical characterization. II Congress of

Pharmacists of Montenegro with the International Participation, Budva/Montenegro, May 28–31, 2015; P216–217.

2. Djordjevic S, Cekic N, Pantelic I, Vuleta G, Milic J, Savic S. Alkyl polyglucoside vs. lecithin-based nanoemulsions: Preparation, characterization and stability evaluation. 9th World Surfactant Congress and Business Convention (CESIO), Barcelona/Spain, June 10–12, 2013; P35.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64)

1. Đorđević S, Cekić N, Isailović T, Daniels R, Savić S. Dizajn parenteralnih nanoemulzija: efekat formulacionih parametara i procesa sterilizacije na karakteristike i fizičku stabilnost. VI Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd/Srbija, Oktobar 15–19, 2014; P398–399.

7.2. Biografija autora

Sanela Savić je rođena 13. januara 1987. godine u Leskovcu. Osnovnu školu u Velikoj Grabovnici i Srednju medicinsku školu u Leskovcu, smer farmaceutski tehničar, završila je kao nosilac diplome „Vuk Karadžić“ i đak generacije. Školske 2006/2007. godine upisala je integrisane akademske studije na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu, na studijskom programu Farmacija, a diplomirala je 29. juna 2011. godine kao student generacije, sa prosečnom ocenom 9,94. Doktorske akademske studije na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu, modul Farmaceutska tehnologija, upisala je školske 2011/2012. godine.

Školske 2010/2011. godine bila je dobitnik stipendije Fonda za mlade talente Republike Srbije „Dositeja“, kao jedan od 1000 najboljih studenata završnih godina studija. Kao najbolji student integrisanih akademskih studija bila je 2011. godine dobitnik godišnje nagrade Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta. Iste godine dobila je nagradu Naučnog fonda „Profesor Ivan Berkeš“ za vrhunski doprinos u oblastima farmacije i medicinske biohemije. Takođe je dobitnik Povelje Univerziteta u Beogradu za najboljeg studenta generacije Farmaceutskog fakulteta u školskoj 2010/2011. godini (nagrada „Student generacije“). Godine 2013. dobila je nagradu grada Leskovca za mlade talente u oblasti obrazovanja i naučnoistraživačkog rada. Godine 2014. dobila je stipendiju Nemačke službe za akademsku razmenu (DAAD) za tromesečni istraživački boravak u Nemačkoj, na Institutu za farmaceutsku tehnologiju Eberhard–Karls Univerziteta u Tbingenu. Takođe, dobitnik je prve nagrade za najbolju poster prezentaciju u okviru Sekcije za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju na VI Kongresu farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, 15–19. oktobar, 2014. godine.

Tokom 2011/2012. godine obavila je pripravnički staž i položila stručni ispit za magistra farmacije. Februara 2014. godine prošla je obuku za rad sa eksperimentalnim životinjama predviđenu za naučnog istraživača – pohađala i položila kurs „Principi rada sa eksperimentalnim životinjama“ – i upisana je u Registar za oglede na životinjama, čime je stekla pravo da u sklopu naučnoistraživačkog rada obavlja oglede na životinjama.

Od decembra 2011. do jula 2016. godine bila je zaposlena na realizaciji projekta iz oblasti tehnološkog razvoja pod nazivom „Razvoj mikro- i nanosistema kao nosača za lekove sa antiinflamatornim delovanjem i metoda za njihovu karakterizaciju“ (TR 34031), Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, najpre kao istraživač–pripravnik, a od novembra 2014. godine u zvanju istraživač–saradnik. Učestvovala je i u realizaciji bilateralnog projekta između Republike Srbije i SR Nemačke „Formulacija mikro-, nano-, i emulzionih sistema bez surfaktanata za slabo rastvorljive lekove: razvoj i optimizacija *ex vivo* i *in vivo* metoda procene“, pri čemu je 2015. godine mesec dana boravila na stručnom usavršavanju na Institutu za farmaceutsku tehnologiju, Eberhard–Karls Univerziteta u Tbingenu (Nemačka), kod prof. dr Rolfa Danijelsa. Tokom 2012–2016. godine učestvovala je u izvođenju praktične nastave na predmetima Farmaceutska tehnologija 1, Farmaceutska tehnologija 2 i Osnovi farmaceutske biotehnologije na studijskom programu Farmacija, integrisane akademske srudije, na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu. Od avgusta 2016. godine zaposlena je u kompaniji DCP Hemigal d.o.o u Leskovcu, u Sektoru za istraživanje i razvoj.

Autor je i koautor 3 poglavlja u istaknutim monografijama od međunarodnog značaja (M13), 5 radova u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), jednog rada u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), 3 rada u međunarodnim časopisima (M23), jednog rada u časopisu nacionalnog značaja (M52), jednog rada u naučnom časopisu (M53), 12 saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u celini (M33), 7 saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u izvodu (M34), 2 saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64) i jednog tehničkog rešenja (M85).

7.3. Izjava o autorstvu

Potpisana: Sanela Savić

broj indeksa: 37/2011

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Parenteralne nanoemulzije sa slabo rastvorljivim psihofarmakološkim lekovima: formulacija, optimizacija i in vivo procena dispozicije

- 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, 7. 9. 2017.

Sanela Savić

7.4. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Ime i prezime autora: Sanela Savić

Broj indeksa: 37/2011

Studijski program: Doktorske akademske studije, modul Farmaceutska tehnologija

Naslov rada: Parenteralne nanoemulzije sa slabo rastvorljivim psihofarmakološkim lekovima: formulacija, optimizacija i in vivo procena dispozicije

Mentor rada: prof. dr Snežana Savić

Potpisana: Sanela Savić

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, 7.9.2017.

Sanela Savić

7.5. Izjava o korišćenju

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

Parenteralne nanoemulzije sa slabo rastvorljivim psihofarmakološkim lekovima: formulacija, optimizacija i *in vivo* procena dispozicije

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, 7.9.2017.

Carolina Cabut